



Régulation de la traduction des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques et rôle de l'ARN non codant NEAT1 lors du stress hypoxique

Anne-Claire Godet

► To cite this version:

Anne-Claire Godet. Régulation de la traduction des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques et rôle de l'ARN non codant NEAT1 lors du stress hypoxique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. $\langle$ NNT : 2020TOU30061 $\rangle$. $\langle$ tel-03048259v2 $\rangle$

HAL Id: tel-03048259

<https://theses.hal.science/tel-03048259v2>

Submitted on 15 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



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
Anne-Claire GODET

Le 20 janvier 2020

**Régulation de la traduction des facteurs de croissance
(lymph)angiogéniques et rôle de l'ARN non codant NEAT1 lors du
stress hypoxique**

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

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Anne-Catherine PRATS

Jury

M. Franck Martin, Rapporteur
M. Jean-Jacques Diaz, Rapporteur
Mme Rosemary Kiernan, Rapporteur
Mme Caroline Conte, Examinatrice
M. Edouard Bertrand, Examineur
M. Pierre-Emmanuel Gleizes, Examineur
Mme Anne-Catherine PRATS, Directrice de thèse

Remerciements

C'est quelque chose de se dire que l'on a enfin clôturé une étape importante de sa vie. Cette page qui se tourne, c'est avec l'achèvement de mon manuscrit de thèse. 5 ans, 3 mois et 19 jours après mon arrivée au laboratoire en tant qu'étudiante de Master 2, je soutiens ma thèse, la conclusion de 5 années de travaux de recherche en immersion dans le petit monde du long ARN non-codant Neat1. Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans un certain nombre de personnes qui ont rendu cela possible.

Tout d'abord, Anne-Catherine Prats, ma directrice de thèse. Pour m'avoir fait confiance en acceptant ma candidature dans l'équipe (alors TRADGENE), en stage de M2, moi qui ne connaissait rien aux IRES (mais déjà une grande fan de clonage !). Puis en me soutenant dans ma décision de poursuivre en thèse, en me préparant au difficile concours et à ses aléas. Grâce à l'allocation de recherche de la Ligue contre le cancer que nous avons obtenu, j'ai pu malgré tout continuer en thèse sur ce sujet qui m'avait tant enthousiasmé. Tu as su me guider tout en me laissant de l'espace pour faire mes propres expériences, et cela m'a permis de développer rapidement mon indépendance sur le projet. Tu as su me soutenir et me remonter le moral quand je doutais du futur du projet, et grâce à toi aujourd'hui notre hypothèse s'avère se vérifier ! Merci encore de m'avoir fait confiance, de m'avoir poussé à me dépasser et vaincre ma timidité à l'oral pour participer à différents congrès en France puis finalement à Lisbonne pour clore mon parcours de thèse. Enfin, merci pour tes qualités humaines indéniables, pour m'avoir permis de vivre une grossesse sereine durant ma thèse, et pour les longues discussions que nous avons pu avoir sur la recherche fondamentale.

Merci à Barbara Garmy-Susini, co-directrice d'équipe, pour tes conseils pour mettre en valeur mes résultats à l'oral et pour la confiance que tu as placée en moi toutes ces années, et qui t'as poussé à me proposer ce contrat de post-doc dans l'équipe après la thèse.

Merci à mes rapporteurs, Jean-Jacques Diaz, Rosemary Kiernan et Franck Martin, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse et ont été si positifs et encourageants. Merci également aux membres du jury, Edouard Bertrand, Caroline Conte et Pierre-Emmanuel Gleizes pour la discussion enrichissante que nous avons eu au cours de ma soutenance de thèse. Pierre-Emmanuel, encore merci pour m'avoir suivi en tant que membre de mon comité de thèse et depuis le master et pour m'avoir fait découvrir les corps nucléaires, sans que je me doute une seconde que j'allais en faire mon sujet de thèse ! Merci également à Hervé Prats, autre membre de mon comité, pour les conseils avisés.

Merci aux inestimables membres de l'équipe que j'ai croisé au fil des années, qui m'ont formée, soutenue et avec qui j'ai passé de super moments.

Merci à Fransky Hantelys, ma première encadrante : pour ton positivisme à tout épreuve. Tu es un vrai rayon de soleil au labo, malgré toutes les difficultés que tu as pu rencontrer tu es un exemple d'abnégation. Tu as toujours une nouvelle idée d'entreprise à développer, peut être même trop ;) j'espère que l'une d'elle verra le jour ! Merci aussi pour ton don culinaire qui m'a fait voyagé, et pour nos discussion sur la vie en général.

Merci à Edith Renaud-Gabardos. Tu venais de te marier quand je t'ai rencontrée et j'ai été impressionnée de te voir aussi bien concilier vie privée et travail. Tu as toujours été de bon conseils (surtout pour les stats ! quelle galère !). Merci pour ton humour et tes réparties cinglantes qui ont pimentées la vie au labo et nos longues discussions, et pour m'avoir prouvé que oui, un enfant pendant la thèse c'est possible !

Merci à Françoise Pujol, la super technicienne militante de l'équipe : pour ton humour, pour tes qualités humaines indéniables. Je n'oublierai jamais les longs bavardages que nous avons eu a propos de tout et de rien, pour refaire le monde. J'espère que tu te souviendras de moi en tant que baba cool écolo quand tu seras (enfin) à la retraite !

Merci à Florence Tatin. Tu es arrivée en même temps que moi dans l'équipe, de retour d'Angleterre. Je t'ai trouvée de prime abord timide et réservée, j'ai découvert chez toi un caractère bien trempé et un humour insoupçonnable, grâce à toi j'ai passé de bons moments ! Merci pour tes précieux conseils tout au long de cette thèse et pour le futur.

Merci à Eric Lacazette, arrivé un peu plus tard, pour tes bons conseils et tes précisions de maitre de conférence de biomol'. Merci à Florent Morfoisse pour les blagues et le drapeau breton qui a égayé le bureau un moment (vive le Kouign Amann !).

Un grand merci bien sûr à tout mes stagiaires : Joffrey Alves, Morgane Gourvest, Morgane Davezac, Emma Lesage, Victor Gife, Florian David et Emilie Roussel. Florian et Emilie, un grand merci car vous avez beaucoup apporté au projet et vous êtes investis à fond avec votre bonne humeur

et votre dynamisme. Vous avez poursuivi en thèse et j'espère que mon encadrement pendant votre stage de M2 y est un peu pour quelque chose ;) (ps : "t'es mauvais Jack !").

Merci à Leïla Diallo pour nos discussions enrichissantes et pour ta passion de la biomol'. Merci Audrey Zamora pour m'avoir fait rire (parfois malgré toi). C'est un plaisir de travailler avec vous !

Merci également à tous les étudiants et chercheurs qui ont croisé mon chemin dans l'équipe et en dehors : Julie, Julien, Benoit, Fabienne, Enzo, Manon, Emmanuelle, Jean, Henrik, Alia, et tout ceux que je n'ai pas cité...Merci à Tiffany Fougeray, pour tout. Tiff, continue à gagner confiance en toi car tu n'as pas de raison de douter de tes capacités.

Merci également à Stéphanie Borne, ancienne étudiante de l'équipe, qui m'a donné envie de faire de la recherche alors que j'étais en DUT dans sa classe de biologie moléculaire.

Un grand merci enfin à mon soutien sans faille, ma famille, qui m'a permis d'aller si loin dans les études et d'achever ce projet malgré des hauts et des bas. Merci à ma grand-mère, qui n'a pas pu voir la conclusion de ma thèse, mais qui me souhaitait de devenir une "grande chercheuse". Je n'ai pas cette prétention, mais au moins aurais-je obtenu ma thèse.

Merci à Adrien, l'homme que j'ai épousé, et Erwann, mon fils, pour tout votre amour.

Préface

L'ARN est à l'origine de la vie. C'est du moins l'hypothèse du « monde d'ARN » qu'ont faite Francis Crick et Leslie Orgel en 1968. L'ARN peut stocker, répliquer l'information, et comme les protéines agir en tant qu'enzyme, les ribozymes, pour catalyser des réactions. Le ribosome, machinerie de synthèse des protéines, est composé d'ARN capable de catalyser la réaction peptidyltransférase afin de former la liaison peptidique. Oui, les ARN sont multifaces et adaptables, et même si le monde a évolué vers l'ADN pour un stockage à long terme de l'information, l'ARN reste un acteur primordial de la régulation et de l'expression des gènes. Longtemps mises de côté au profit des gènes, les séquences non-codantes de notre génome dites à l'époque « ADN poubelle », se sont révélées largement plus actives qu'on ne le pensait. En fait, seulement 1.2% de notre génome serait traduit en protéine. Que faire alors des nombreux transcrits non-codants ? ARN de transfert et ARN ribosomiques pour la synthèse des protéines, sn et snoARN pour la maturation des ARN messagers, microARN, PIWI-ARN pour réguler l'expression de messagers ou protéger la lignée germinale des transposons, long ARN non-codants isolateurs génétiques, ARN circulaires, et de nombreux autres encore dont la fonction n'est pas encore comprise : les ARN sont partout et sous des formes très diverses. Lors de stimuli externes ou internes appelés stress, notre organisme répond par de nombreuses voies de signalisations complexes et interconnectées. Les ARN non-codants sont une des première lignes de défense de notre organisme pour répondre à ce stress. Du plus petit microARN déstabilisateur aux plateformes d'assemblages de plusieurs kilobases, place au monde des ARN non-codants : pour adapter, survivre, ou mourir ! Au cours de cette thèse je tenterai de décrypter, de la transcription à la traduction, lors du stress hypoxique dans les pathologies ischémiques cardiaque et dans le cancer, le monde complexe et fascinant des ARN non-codants.

Liste des abréviations

ARN	Acide Ribo Nucléique	hnRNP	heterogenous nuclear RiboNucleoProtein
ADAR	Adenosine Deaminase Acting on RNA	HRE	Hormone Response Element
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique	HRI	Heme Regulatory Inhibitor
ANG	Angiogenine	HRV	Human RhinoVirus
ARE	Adenylate-uridylate-rich elements	HUR	Human antigen R
ARNr	ARN ribosomique	IAPV	Istrael Acute Paralysis Virus
ARNt	ARN de transfert	ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
ATP	Adenosine Tri Phosphate	IRALU	Inverted Repeat of Alu sequence
BIA-MS	Biomolecular Interaction Analysis-Mass spectrometry	IRE	Iron Responsive Element
BRE	B recognition Element	IRES	Internal Ribosome Entry site
CEL	Cellule Endotheliale Lymphatique	ITAF	IRES TransActing Factor
circARN	ARN circulaire	KO	Knockout
CPF	Cleavage and Polyadenylation Factor	LINE	Long Intersperced Element
CREB	C-AMP Response Element-binding protein	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
crPV	Cricket Paralysis Virus	mascARN	MALAT1 associated small cytoplasmic ARN
CT	Complexe Ternaire	miARN	micro ARN
CTD	C Terminal Domain	MTE	Motif Ten Element
DBHS	Drosophila Behaviour and Human Splicing	NEAT1	Nuclear Endogenous Abundant Transcript 1
DCE	Downstream Core Element	NELF	Nuclear ELongation Factor
ddPCR	Droplet digital PCR	NGD	Non Go mediated Decay
DNMT	Methylase ADN	NMD	Nonstop Mediated Decay
DPE	Downstream Promoter Element	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor	NOPS	NONA/paraspeckle
EJC	Exon Junction Complex	NOPS	Nitric Oxyde
EMCV	EndoMyocarditis C Virus	NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
EPO	Erythropoïétine	NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
FBL	Fibrillarine	NSD	Nonsense mediated Decay
FIH	Factor Inhibiting HIF	ODD	Oxygen-dependent dergradation domain
FMDV	Foot and Mouth Disease Virus	p54^{nrb}	p54 nuclear RNA binding
GDP	Guanosine Di Phosphate	PA	Polyadénylation Alternative
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor	PARN	Poly(A)-specific ribonuclease
GTP	Guanosine Tri Phosphate	PCR	Polymerase Chain Reaction
HAT	Histone Acetyl Transferase	PDGF	Platelet-derived growth factor
HDAC	Histone DeACetylase	PERK	PKR-like Reticulum Endoplasmic (RE) Kinase
HGF	Hepatoyte Growth Factor	PGF	Platelet Growth Factor
HIF	Hypoxia inducible Factor		

PHD	Prolyl Hydroxylase Domain containing protein
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
piARN	piwi interacting RNA
PIC	PreInitiation Complex
PIC	PreInitiation Complex
PKR	Protein Kinase R
PLD	Prion-like Domain
PIGF	Placental Growth Factor
PSPC1	Paraspeckle component 1
PTB	Polypyrimidine-tract binding protein
pVHL	protein de Von Hippel Lindau
RBP	RNA Binding Protein
RE	Réticulum Endoplasmique
RISC	RNA-induced silencing complex
RRM	RNA Recognition Motif
RT	Reverse Transcriptase
SEC	Super elongation Complex
shARN	Short hairpin ARN
SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
SIRC	Stress Induced Response Complex
snARN	small nuclear ARN
snoARN	small nucleolar ARN
SRP	Signal Recognition Particle
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBP	TATA binding Protein
uORF	upstream Open Reading Frame
UPR	Unfolded Protein Response
UTR	UnTranslated Region
VASH-1	Vasohibin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Table des figures

Figure 1. Mécanisme de déstabilisation ou stabilisation du facteur de transcription HIF en normoxie et hypoxie.	19
Figure 2. Mécanismes de dégradation et de contrôle qualité de l'ARN	25
Figure 3. Les ARN non-codants régulateurs de l'expression des gènes	28
Figure 4. Formation du complexe de pré-initiation 43s	31
Figure 5. Initiation de la traduction eucaryote.	33
Figure 6. Reconnaissance du codon d'initiation	35
Figure 7. Régulation de l'initiation de la traduction passant par eIF2 α et 4EBP	38
Figure 8. Mécanisme de fonctionnement des uORF	40
Figure 9. Régulation de l'expression des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques durant l'hypoxie	49
Figure 10. Différents mécanismes de contrôle de la traduction IRES-dépendante par les ITAF	53
Figure 11. Mécanisme de transcription et de stabilisation des isoformes Neat1_1 et Neat1_2	59
Figure 12. Liste des protéines du paraspeckle	64
Figure 13. Structure tridimensionnelle du paraspeckle	67
Figure 14. Les domaines structuraux de Neat1	67
Figure 15. Rôle de Neat1 et du paraspeckle lors de différents processus physiologiques	71
Figure 16. Rôle de Neat1 et du paraspeckle dans les pathologies.	75
Figure 17. Régulation transcriptionnel et traductionnelle des facteurs de croissance des fibroblastes FGF1 et FGF2 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGFA.....	86
Figure 18. Modèle de traduction IRES-dépendante du FGF1 avec pré-assemblage de l'IRESome dans le noyau avant export dans le cytoplasme.....	260

Table des matières

INTRODUCTION - PARTIE I : RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE PAR LE STRESS 13

I.	STRESS, RÉGULATIONS TRANSCRIPTIONNELLES ET POST TRANSCRIPTIONNELLES	14
1.	<i>Régulation de la transcription</i>	14
1.1.	Etapes de la transcription	14
1.2.	Facteurs de transcription	18
2.	<i>Régulation post-transcriptionnelles</i>	20
2.1.	Maturation de l'ARNm	20
2.2.	Edition, rétention, export	22
2.3.	Stabilité de l'ARN et contrôle qualité	24
2.4.	Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles par les ARN non-codants	27
II.	RÉGULATION DE LA TRADUCTION	30
1.	<i>Les étapes de la traduction</i>	30
1.1.	L'initiation	30
1.2.	L'élongation	35
1.3.	La terminaison	36
2.	<i>Régulations de la traduction en cas de stress</i>	36
2.1.	Régulation de l'élongation et de la terminaison	36
2.2.	Régulation de l'initiation de la traduction	37
2.3.	Initiation de la traduction indépendante de la coiffe	42
2.4.	Ribosomes spécialisés	43
3.	<i>Les IRES et leurs ITAF</i>	43
3.1.	Découverte : les IRES viraux	43
3.2.	Les IRES cellulaires	45
3.3.	Les ITAF	50

INTRODUCTION - PARTIE II : LES PARASPECKLES, CORPS NUCLÉAIRES MARQUEURS DE STRESS 56

I.	APPARITION ET ASSEMBLAGE DU PARASPECKLE	57
1.	<i>Découverte des paraspeckles</i>	57
2.	<i>composition</i>	58
2.1.	Le long ARN non-codant Neat1, squelette du paraspeckle	58
2.2.	Les protéines du paraspeckle	61
3.	<i>Structure et formation des paraspeckles</i>	66
3.1.	Structure du paraspeckle : « core, shell, patch »	66
3.2.	Domaines structuraux de Neat1	67
3.3.	Formation : la séparation de phase liquide-liquide	68
II.	PARASPECKLE ET RÉPONSE AU STRESS	68
1.	<i>Le paraspeckle et la régulation de l'expression génique</i>	68
1.1.	Rétention d'ARNm édités ou non	68
1.2.	Rétention de facteurs de transcription	69

2. Rôles du paraspeckle lors de processus physiologiques.....	70
2.1. Rôle lors de la mitose	70
2.2. Rôle dans le cycle circadien	70
2.3. Rôle lors du développement embryonnaire	70
2.4. Rôle dans la reproduction.....	72
3. Rôle du paraspeckle lors de pathologies.....	73
3.1. Rôle dans l'infection virale.....	73
3.2. Rôle dans les infections neurologiques	73
3.3. Rôle dans les pathologies vasculaires et inflammatoires	74
3.4. Rôle dans le cancer	76

INTRODUCTION - PARTIE III : L'HYPOXIE DANS LES PATHOLOGIES ISCHÉMIQUES ET LE CANCER 77

I. L'HYPOXIE	78
1. Hypoxie et ischémie cardiaque	78
1.1. Incidence de l'ischémie cardiaque et processus de réparation	78
1.2. Réponse (lymph)angiogénique et inflammatoire	79
2. Hypoxie et cancer	80
II. LES FACTEURS DE CROISSANCE (LYMPH)ANGIOGÉNIQUES.....	81
1. Les facteurs de croissance dans les pathologies.....	81
1.1. La famille des FGF et leurs récepteurs.....	81
1.2. La famille des VEGF et leurs récepteurs	83
2. Régulation de la traduction des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques en réponse à l'hypoxie	84
2.1. Les IRES et ITAF des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques.....	84
2.2. Les ITAF-régulons et l'hypoxie	89

INTRODUCTION - PARTIE IV : PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THÈSE 90

CHAPITRE I : ETUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES FACTEURS (LYMPH)ANGIOGÉNIQUES DANS LES CARDIOMYOCYTES EN HYPOXIE 93

CHAPITRE II : IMPLICATION DU LONG ARN NON-CODANT NEAT1 ET DU PARASPECKLE DANS LA TRADUCTION IRES-DÉPENDANTE DANS LES CARDIOMYOCYTES HYPOXIQUES 161

CHAPITRE III : ETUDE DE L'EXPRESSION DU LONG ARN NON-CODANT NEAT1 ET DE LA RÉGULATION DE LA TRADUCTION IRES-DÉPENDANTE DE FGF1 LORS DE L'HYPOXIE TUMORALE 234

DISCUSSION 247

ANNEXES..... 261

BIBLIOGRAPHIE 338

Introduction - Partie I : Régulation de l'expression génique par le stress

I. Stress, régulations transcriptionnelles et post transcriptionnelles

Au cours de notre existence, le corps est soumis à différents stimuli externes ou internes. Lorsque ces stimuli mettent en jeu la survie de l'organisme, ils sont appelés stress. L'hypoxie ou manque d'oxygène est retrouvée lors du développement pendant l'embryogenèse, mais également lors de pathologies comme l'ischémie cardiaque et le cancer. Le stress du réticulum endoplasmique provient d'une accumulation de protéines à la conformation incorrecte. Ce type de stress se retrouve également dans plusieurs pathologies dont les deux précédemment citées, ainsi que le diabète, l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives. Le choc thermique peut également se retrouver lors de réponses physiologiques comme la fièvre au cours d'infection et des pathologies vasculaires ou le cancer. D'autres stress existent également, comme le choc osmotique, l'irradiation UV, la privation en nutriments. Ces différents stress de la cellule la mènent à répondre de manière rapide et sélective, de la transcription de ses gènes en ARN à la synthèse protéique. Ces différentes régulations seront abordées dans cette première partie d'introduction, avec un focus sur l'initiation de la traduction et le rôle des structures IRES et des ARN non-codant dans cette régulation.

1. Régulation de la transcription

L'ADN est transcrit en ARN grâce à une enzyme appelée l'ARN polymérase. Chez les eucaryotes, il existe trois ARN polymérases, associées à différentes classes de gènes. L'ARN polymérase I permet la transcription des ARN ribosomiques (ARNr), l'ARN polymérase II la transcription des ARN messagers qui donneront naissance aux protéines, et de certains ARN non-codants (les petits ARN régulateurs et des long ARN non-codants). L'ARN polymérase III transcrit quant à elle les petits ARN, comme les ARN de transfert (ARNt) et l'ARN ribosomique 5S. La transcription se fait à partir du brin "matrice" de l'ADN ou brin non-codant, le brin opposé est défini comme brin "codant", car il contient la séquence qui sera portée par l'ARN synthétisé. La polymérase n'est pas seule à agir, lui sont associés différents facteurs de transcription dit "généraux" : TF pour *Transcription Factor*, suivi des chiffres romains I, II ou III selon la polymérase associée, et les lettres correspondant aux fractions de purification chromatographique.

1.1. Etapes de la transcription

La transcription de l'ADN en ARN se découpe en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation étant l'étape la plus longue des trois, elle est également la plus régulée.

Initiation

L'étape d'initiation a lieu lorsque l'ARN polymérase se lie en 5' du gène à transcrire au niveau d'une séquence spécialisée appelée promoteur. Un promoteur eucaryote se compose de plusieurs éléments régulateurs où se fixent les différents facteurs de transcription protéiques associés à la polymérase. À chacune des polymérases s'associe un type de promoteur comportant des séquences régulatrices différentes. Sept séquences ont ainsi été identifiées en tant qu'éléments principaux du promoteur de l'ARN polymérase II. Tout d'abord, la TATA box ou boîte TATA (séquence TATTA), située entre 25 et 35 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription-également appelé point +1, est une séquence commune à de nombreux promoteurs de l'ARN polymérase II. Elle permet la régulation du taux de transcription du gène et définit le site d'initiation de la transcription qui sera utilisé. Reconnue par TBP (TATA-binding protein), composant de TFIID, elle engage la formation du complexe de préinitiation (PIC). L'initiateur (Inr), riche en pyrimidines, permet un démarrage de la transcription précis avec l'aide de la TATA box. Cette séquence est reconnue par TAF1/TAF2, composants de TFIID. *Motif Ten Element* ou MTE, fonctionne quant à lui en synergie avec Inr et la TATA box pour augmenter la transcription. Le DPE ou *Downstream Promoter Element*, situé entre 29 à 35 nucléotides en aval du point +1, lie TFIID par TAF6 et 9 ainsi que le cofacteur NC2; et le DCE, pour *Downstream Core Element*, est mutuellement exclusif avec la séquence précédente. Enfin, BRE^u et BRE^d sont reconnus par TFIIB.

Lors de l'initiation, de manière séquentielle, le facteur de transcription TFIID se fixe à la TATA box¹, ensuite viennent les recrutements de TFIIA et TFIIB stabilisant TFIID lié, l'ARN polymérase II avec TFIIIF, et enfin TFIIE et TFIIH. La polymérase II peut également être recrutée en un complexe holoenzyme pré-assemblé après fixation de TFIID. La modulation de la formation du PIC passe par TBP : la fixation TATA-TBP est empêchée par de nombreux mécanismes (séquestration, compétition, dissociation ATP-dépendante, blocage de la formation du PIC après interaction TATA-TBP...), mais cette association peut également être encouragée (stabilisation, dissociation des dimères de TBP, modification de la chromatine...). L'initiation de la transcription peut également être contrôlée au niveau des TAFs disponibles. De plus, le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II joue un rôle prépondérant. Il s'agit de la sous-unité la plus grande de la polII, qui peut être modifiée : phosphorylation, glycosylation, et ubiquitinylation de la polII elle-même. Dans ce domaine se trouvent des répétitions en tandem : Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (YSPTSPS). Selon l'état de phosphorylation du CTD, la polymérase passera dans les différentes étapes de la transcription. De hypophosphorylée pendant l'initiation, elle passe à un état d'hyperphosphorylation durant l'élongation et la terminaison selon un schéma précis : phosphorylation-déphosphorylation successives des résidus sérine 2 et 5^{2,3}.

La plupart des gènes eucaryotes possèdent également un "enhancer". Il s'agit d'une séquence bien en amont du promoteur qui permet d'augmenter l'expression du gène auquel il est associé grâce à l'action de facteurs de transcription. Un repliement de la chromatine va rapprocher les deux régions avec les co-facteurs et faciliter la transcription⁴. Le complexe de co-activation Mediator permet la liaison des facteurs de transcription liés sur l'enhancer, avec le domaine c-terminal de l'ARN polymérase initiant la transcription⁵. D'autres séquences appelées « *silencers* » vont avoir l'effet inverse. Ils permettent la liaison de répresseurs qui agissent parfois conjointement avec des co-répresseurs⁶. Les répresseurs peuvent empêcher la liaison d'un activateur voisin ou encore entrer en compétition avec un activateur pour son site de liaison. La répression de l'initiation de la transcription passe aussi par l'état de la chromatine : les histones acétylées permettent une activité transcriptionnelle de la chromatine. Le niveau d'acétylation des histones, modulé par les HDAC et HAT (histones déacétylases et histones acétyltransférases) reflète aussi le niveau d'activité transcriptionnelle. Un bas niveau d'acétylation peut conduire à la méthylation de l'ADN (cette fois par les DNMT ou méthyltransférases ADN) et à l'extinction de la transcription de gènes⁷. Enfin les isolateurs ou éléments de frontière empêchent l'état transcriptionnel d'un gène d'affecter celui d'un autre en partitionnant le génome⁶.

Elongation

Une fois le PIC mis en place, la chromatine est déroulée et la polymérase lit l'ADN matrice tout en ajoutant un à un les nucléotides complémentaires (Uracile pour Adénine, Guanine pour Cytosine), en direction 5' du brin matrice : la molécule d'ARN en cours de synthèse est donc créée de 5' en 3'. Chez les eucaryotes, la polymérase est capable de fixer les acides nucléiques à une vitesse de 22 à 25 nucléotides par seconde⁸.

Parfois, pour des raisons différentes, la polymérase peut se mettre en « pause ». Dans un premier temps, la polymérase s'arrête à une région « proximale » du promoteur, environ 20-60 nucléotides en aval du point +1. Cette pause peut être due à la présence de facteurs négatifs de l'élongation ou de la séquestration des facteurs positifs d'élongation par des complexes inhibiteurs, ou encore par la présence de barrières créées par les nucléosomes, complexe d'histones permettant l'enroulement de la chromatine. pTEF-b, facteur positif d'élongation, est une kinase qui va phosphoryler des substrats au promoteur lorsque la cellule est soumise à un stimulus d'activation de la transcription. Ses deux sous-unités sont composées de la Cycline T1 et T2, et de CDK9, *Cycline Dependent Kinase*. Lorsque le gène est activé, Cdk9 hyperphosphoryle le CTD de la polymérase II aux résidus sérine 2 et 5 de la répétition en tandem, ainsi que le facteur d'élongation négatif NELF et le facteur positif d'élongation DSIF. NELF va ainsi se décrocher du complexe en pause, et DSIF se transformer en facteur

d'élongation positif et rester fixé à la polymérase tout au long de la transcription du gène. pTEF-b va ensuite voyager avec la polymérase en transcription dans le SEC (Super Elongation Complex). pTEF-b est une cible privilégiée des facteurs de transcription pour moduler l'expression des gènes^{9,10}. Pour pouvoir répondre rapidement aux sollicitations, pTEF-b est présent catalytiquement inactif dans le complexe snRNP 7SK, composé de l'ARN non-codant 7SK, de pTEF-b, d'un inhibiteur de kinase HEXIM ainsi que de deux protéines se liant à l'ARN¹¹. Les pauses de la polymérase sont également parfois dues à une mauvaise incorporation de base, qui déclenche son mécanisme de correction à cause du mauvais alignement des groupes 3'OH. L'extension de l'élongation au nucléotide suivant est plus longue et le nucléotide en aval de la mésincorporation s'« effiloche », la polymérase revient alors en arrière et clive l'acide nucléique mésincorporé grâce à sa fonction 3'-5' exonucléase activée par le facteur TFIIS¹².

Terminaison

La terminaison de la transcription est spécifique des différentes polymérases chez les eucaryotes. Pour l'ARN polymérase I, il y a un facteur de terminaison qui de façon similaire à la terminaison rho-dépendante chez les procaryotes va dérouler l'hybride ADN-ARN et ainsi permettre le décrochage de l'ARN nouvellement synthétisé pour terminer la transcription. Pour l'ARN polymérase III, la terminaison a lieu après la transcription d'un terminateur riche en uracile qui, similairement à la terminaison rho-indépendante des procaryotes, va former une tige-boucle provoquant la pause et le détachement de la polymérase. En revanche, la terminaison de la transcription de l'ARN polymérase II est plus complexe et encore peu appréhendée. Elle a lieu parfois bien en aval de la séquence codante, après la transcription d'une séquence consensus qui provoque l'association de la polymérase avec un complexe de clivage de l'ARN. Dans une étude de 1987, une expérience a montré que la terminaison est indissociable de la polyadénylation : une mutation dans le site de polyadénylation AATAAA du gène de la globine suffit pour inhiber la terminaison du gène.¹³ C'est la séquence de polyadénylation qui permet l'association avec le complexe de clivage et polyadénylation. Celui-ci est constitué de CPF (*Cleavage and PolyAdenylation Factor*) et des facteurs de clivage CFIA et IB. Ce recrutement provoque le clivage endonucléolytique et la polyadénylation de l'extrémité 3' libre, ce qui va également permettre la stabilisation de l'ARN. La terminaison se fait selon deux modèles : le modèle allostérique et le modèle « torpille »^{14,15}. Le premier résulte d'une réorganisation dans l'association de facteur d'élongation, pour un complexe négatif qui va permettre le décrochage de la polymérase. Dans le modèle « torpille », le clivage de l'ARN par le complexe CPF/CFIA va générer un ARN au 5' exposé qui sera immédiatement dégradé par la nucléase Rat1/Xrn2, ce qui provoque la dissociation de la polymérase.

Cependant, ce type de terminaison associé à la polyadénylation n'est pas vraie pour tous les ARN synthétisés par la polymérase II. Un bon exemple est le long ARN non-codant MALAT1, qui possède en 3' une séquence codant pour une triple-hélice (à la différence de la queue poly(A) qui n'est pas codante) ainsi qu'une séquence permettant la formation d'une structure similaire à l'ARNt. L'ARN en cours de synthèse est clivé par la RNase P en 5' de la forme ARNt puis par la RNase Z en 3', générant ainsi un mascARN (*MALAT-associated small cytoplasmic RNA*). Le long ARN non-codant Neat1 a un processus de clivage similaire donnant naissance à un « *tRNA-like* ». La transcription de ces gènes est stoppée par ce clivage. Cependant, à la différence des ARNm polyadénylés, MALAT et Neat1 possèdent une triple-hélice, formée par le repliement d'une séquence riche en A et comportant deux motifs riches en U, qui permet de stabiliser les transcrits¹⁶.

1.2. Facteurs de transcription

La régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel en cas de stress passe principalement par la modulation des facteurs de transcription. Ce sont des protéines qui vont se fixer sur le promoteur des gènes au niveau de séquences *cis*-régulatrices, ou encore au niveau des *enhancer* parfois des milliers de nucléotides en amont de la séquence codante. La plupart du temps la fixation du facteur de transcription à la séquence ADN va provoquer un changement de conformation de la protéine, liée à des cofacteurs protéiques et ARN. Les facteurs de transcription possèdent un domaine de liaison à l'ADN, le plus courant étant l'homéodomaine, mais également la structure hélice-boucle-hélice ou encore les motifs de reconnaissance et liaison comme *helix-turn-helix*, *zinc-finger* et *leucine-zipper*¹⁷⁻¹⁹.

Les facteurs de transcription peuvent réguler un nombre très large de gènes, comme un nombre très restreint. L'expression ou la disponibilité des facteurs de transcription est modulée en cas de stress, ce qui permet l'expression de leur gène cible en réponse à ce stress. C'est notamment le cas du facteur de transcription HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), qui est stabilisé lors de l'hypoxie²⁰. HIF se compose de deux sous unités α et β formant un hétérodimère dans le noyau (Cf. **figure 1**). La sous-unité α existe elle-même en trois isoformes : HIF1 α , HIF2 α et HIF3 α . Sa stabilité est régulée de manière dépendante du niveau d'oxygène : en normoxie, elle est habituellement dégradée par la voie ubiquitine-protéasome, tandis qu'elle est stabilisée en condition hypoxique²¹. En effet la sous-unité α possède un domaine de dégradation oxygène-dépendant. Ce domaine est ciblé par la PHD (*Prolyl-hydroxylase domain-containing protein*), une enzyme elle-même dépendant du niveau d'oxygène,

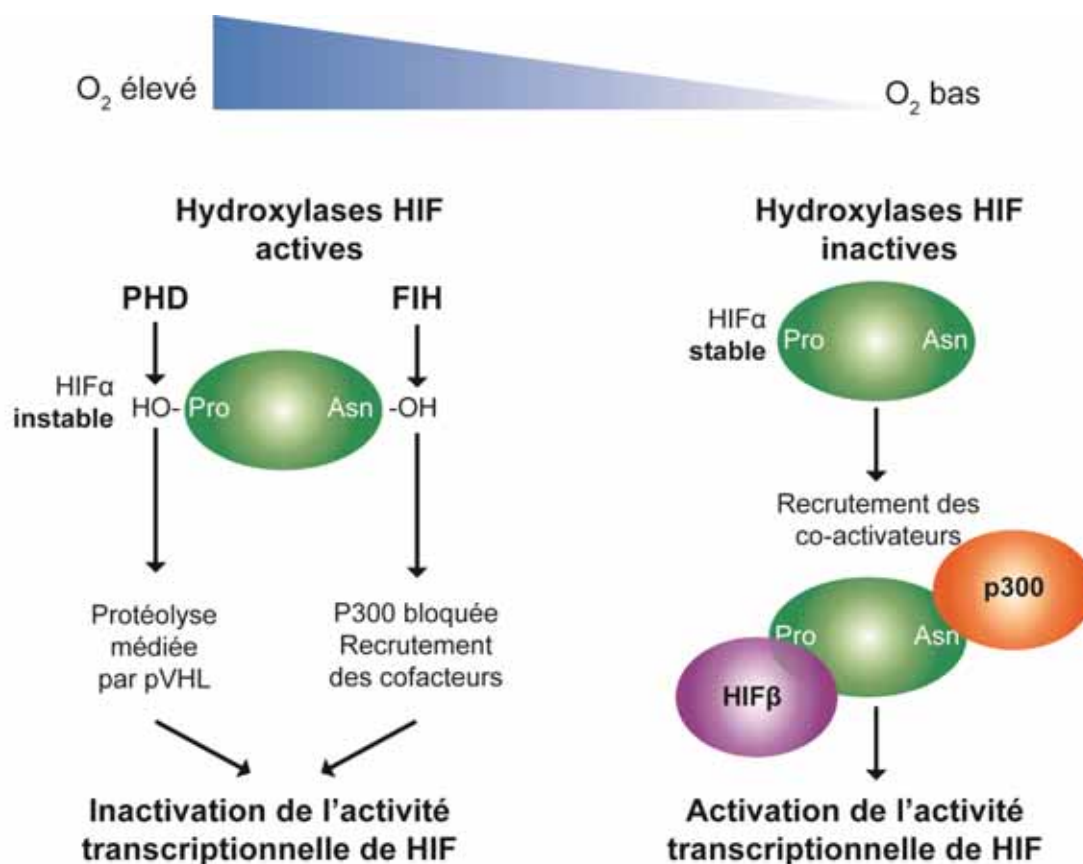


Figure 1 : Mécanisme de déstabilisation ou stabilisation du facteur de transcription HIF en normoxie et hypoxie. PHD : *prolyl-hydroxylase domain-containing protein* ; FIH : *Factor Inhibiting HIF* ; pVHL : protéine de VonHippel Lindau. Adapté de : Scitable , Nature.com. <http://origin.www.nature.com/scitable/topicpage/environmental-cues-like-hypoxia-can-trigger-gene-41466>

qui hydroxyle les résidus proline du domaine oxygène-sensitif. Ainsi modifié le site devient accessible pour la liaison de pVHL (protéine de VonHippel Lindau), une sous-unité du complexe de l'ubiquitine ligase ce qui entraîne sa dégradation en normoxie²²⁻²⁵. De plus, HIF est ciblé par FIH (*Factor Inhibiting HIF*), une oxygénase qui va également hydroxyler les asparagines de HIF et inhiber son activité de facteur de transcription en empêchant sa liaison avec p300²⁵. Le facteur de transcription HIF régule une centaine de gènes, en se fixant à l'élément HRE, une séquence d'une vingtaine de nucléotides^{26,27}. L'élément HRE se retrouve dans des promoteurs de gènes ayant des fonctions très diverses, en passant par les gènes permettant la redistribution rapide des réserves en oxygène tels que les enzymes glycolytiques, EPO, et le facteur de croissance angiogénique VEGFA ainsi que ses récepteur VEGFR1 et VEGFR2, mais également des gènes intervenant dans l'apoptose, l'inflammation, l'autophagie, l'immunité²⁸. Bien que se fixant sur la même séquence consensus, HIF1 et HIF2 ont des gènes cible différents. La spécificité de réponse dépend de nombreux facteurs incluant le type cellulaire mais également la durée du stress hypoxique : un stress aigue entraîne une réponse HIF1-dépendante ciblant

les gènes de la glycolyse, tandis qu'une hypoxie plus longue fait appelle à HIF2 qui cible les gènes de l'angiogenèse (VEGFA et ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, EPO, eNOS, les gènes codant pour l'intégrine $\beta 3$, DLL4, la fibronectine, Ang-1 et 2 et TIE2²⁹) et de la pluripotence des cellules souches^{28,30–32}. HIF-2 permet également la synthèse du long ARN non-codant Neat1 en réponse à l'hypoxie et la formation d'un corps nucléaire, le paraspeckle (développé en **partie II**).

D'autres facteurs de transcription régulent l'expression des gènes en réponse au stress hypoxique. C'est le cas des facteurs CREB (gène MMP1), NRF2 (gènes antioxydants), STATs, NF κ B (gènes liées à l'immunité en réponse à l'inflammation³³)²⁰. Myc est également un facteur de transcription en hypoxie : il se lie à HIF1 qui l'inactive, mais en liaison à HIF2 cela l'active, pour promouvoir la transcription de gènes de croissance cellulaire, différenciation et mort.

2. Régulation post-transcriptionnelles

Après l'étape de transcription, l'ARNm doit passer par plusieurs étapes de maturation avant sa traduction en protéine dans le cytoplasme. Ces étapes, l'ajout de la coiffe, la polyadénylation et l'épissage, se font de manière co-transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Après les étapes de maturation, l'ARNm peut encore être édité pour être dégradé ou retenu dans le noyau, ou enfin exporté. Toutes ces étapes sont également susceptibles d'être régulées en cas de stress.

2.1. Maturation de l'ARNm

La coiffe

L'ARNm très rapidement après le début de sa synthèse subit des modifications en 5' afin d'être « coiffé ». La coiffe permet d'empêcher la dégradation de l'ARNm par les 5' exonucléases, mais également de réguler son export dans le cytoplasme, et est la plupart du temps utilisée pour l'initiation de sa traduction en protéine. Elle se compose d'une 7-méthylguanosine (m⁷G)³⁴ lié via un lien 5'-5' triphosphate avec le premier nucléotide. Les facteurs stimulant la formation de la coiffe sont eux-mêmes modulés en cas de stress. Notamment, dans les tumeurs, l'expression de ces facteurs est plus élevée (c'est le cas de Myc, CDK1 et de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II qui permet le recrutement des guanylyltransférase^{35,36}). Aussi, la stabilité de l'ARN dépendra de ces facteurs. L'ARNm peut également être « décoiffé » par des enzymes de décoiffage et de dégradation qui vont hydrolyser la liaison triphosphate entre la guanosine inverse et le premier nucléotide transcrit. La coiffe ainsi enlevée, l'ARN pourra être dégradé de 5' en 3'. Les protéines se liant à la coiffe sont là pour empêcher une telle situation et sont donc des actrices primordiales de la stabilité et de l'expression de l'ARN. Le décoiffage est intimement lié à la déadénylation de la queue poly(A),

première étape de la dégradation d'un ARN. Le raccourcissement de la queue poly(A) diminue l'efficacité de sa traduction et augmente le décoiffage de l'ARNm : La ribonucléase PARN en est une actrice principal.

L'épissage

L'épissage de l'ARNm désigne le processus par lequel l'ARN immature (pré-ARNm) va passer afin d'extraire les introns, séquences non-codantes, et joindre les exons entre eux. L'épissage se fait de manière co-transcriptionnelle ou immédiatement après la transcription. Ce processus requiert un site donneur en 5' de l'intron (GU), un site de branchement près du 3' et un site accepteur (AG). Le site accepteur est précédé d'une séquence de polypyrimidines³⁷. Les facteurs d'épissage sont recrutés au niveau du *spliceosome*. Il se compose de 5 snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*), U1, U2, U4, U5 et U6. L'épissage alternatif permet de faire varier la composition de la protéine en incluant ou non certaine séquence : en retenant des introns, en excisant certains exons ou en les allongeant. Il existe des éléments agissant en *cis* (*enhancer* exoniques et introniques) et des facteurs agissant en *trans* (en général des phosphoprotéines riches en arginine et serine, ou *SR protein*) mais également des éléments *silencer* (exoniques et introniques) en association avec des facteurs négatifs tels que les hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein*). Ces différents complexes se fixent sur le pré-ARNm pour favoriser ou désavantager un site d'épissage faible par rapport à un autre : ils sont donc les acteurs primordiaux de la régulation de l'épissage. Les *silencer* ont un rôle prédominant pour le contrôle de l'épissage alternatif plutôt que l'épissage constitutif. Les protéines hnRNP sont hautement conservées jusqu'aux mammifères. hnRNPM, qui est aussi un facteur de transcription avec la protéine p54^{nrh} pour le gène *Fgf1*, est impliquée dans l'épissage alternatif en jouant le rôle d'antagoniste du facteur d'épissage Nova-1. Ainsi elle permet la génération de variants d'épissage du pré-ARNm du récepteur de la dopamine, ce qui va conduire à la synthèse d'isoformes impliqués dans des processus physiologiques clés³⁸.

L'épissage alternatif est en effet influencé par le stress. C'est le cas de l'ARN *Xbp1* qui est épissé de manière non-canonique lors du stress du réticulum endoplasmique (RE), dans les lymphocytes B. En effet l'enzyme *Ire-1* (*Inositol-requiring enzyme*) s'autophosphoryle en cas de stress du RE suite au relargage de *Grp78* dans le lumen du réticulum, et conduit à l'épissage d'un unique intron de l'ARNm de *Xbp1*³⁹. Chez la levure lors du stress du réticulum endoplasmique, un épissage non-canonique de l'équivalent de *Xbp1*, *HAC1*, a lieu dans le cytoplasme grâce à une ARNt ligase. Une étude de Nelson et collègues montre que les profils d'épissages de plusieurs milliers de gènes des cellules B activées changent, de façon précoce en corrélation avec le stress du réticulum endoplasmique⁴⁰ et la phosphorylation d'*Ire-1*. L'hypoxie peut également influencer l'épissage alternatif, comme c'est le cas

pour l'ARNm donnant naissance à l'isoforme protéique anti-apoptotique sFas (*soluble Fas*) associée au cancer⁴¹.

Des sites d'épissage cryptiques peuvent également entrer en jeu. Ce sont des sites dormant ou faiblement utilisés qui sont activés lorsqu'une mutation ponctuelle apparaît dans un site voisin hautement actif, supprimant ainsi des portions de l'ARN habituellement conservées. Ces sites cryptiques sont impliqués dans de nombreuses maladies⁴² comme pour l'ARNm de la protéine SMN2 dans l'amyotrophie spinale^{43,44}.

La queue poly(A)

L'ajout de la queue poly(A) à l'ARNm est concomitante à la fin de la transcription, comme décrit en 1.1. L'ajout de ce stretch de A est essentiel pour prévenir la dégradation de l'ARNm et permettre son export vers le cytoplasme ainsi que sa traduction par circularisation de l'ARNm. La queue poly(A) est aussi présente sur une majorité d'ARN non-codants, bien que les micro-ARN perdent leur queue poly(A) sous leur forme mature. Certains ARN non-codants, comme décrit précédemment, possèdent une triple-hélice et non pas une queue poly(A) ; les ARN ribosomiques, eux, ne sont pas polyadénylés. Finalement, au fur et à mesure de la vie de l'ARNm, la queue poly(A) se raccourcira jusqu'à ce que la dégradation soit enclenchée.

L'utilisation de sites de polyadénylation alternatifs ou polyadénylation alternative (PA) permet de faire varier la taille de la région 3' non-traduite de l'ARNm, et de générer des sites de liaison de miARN (microARN). Ce processus peut-être régulé par le stress. En voici plusieurs exemples⁴⁵ : dans le cas d'une attaque cardiaque, la sous-expression du facteur de polyadénylation PABPN1 entraîne un raccourcissement ou un allongement d'un ensemble d'ARNm ; en association avec l'hypothermie, les facteurs auxiliaires Rbm3 et Cirbp incitent l'utilisation de site de PA distaux et donc génèrent des transcrits plus longs ; lorsque la disponibilité des nutriments diminue, il y a un changement dans les sites de PA utilisés. C'est notamment le cas de l'ARNm CAT-1 (*cationic aminoacid transporter*) qui est généré sous sa forme longue lors d'une privation en acides aminés. La protéine HuR provoque l'accumulation de la forme longue en se liant à un élément ARE non présent dans la forme courte de l'ARNm.

2.2. Edition, rétention, export

Edition

L'édition, dernière étape de maturation de l'ARNm, consiste en la suppression, l'ajout ou la substitution d'un nucléotide, modifiant la séquence du messenger par rapport à celle du gène d'origine.

L'édition est assez rare mais concerne cependant plusieurs classes d'ARN, en passant par les ARNt, les ARNr (ARN ribosomiques), les miARN (micro ARN) et les ARNm mais aussi les longs ARN non-codants. Elle a lieu dans le noyau de la cellule aussi bien que dans le cytoplasme. L'édition par déamination ou substitution d'une base se découpe en deux catégories : de C en U, et de A en I (I pour inosine). Un exemple d'édition C en U concerne l'apolipoprotéine B (apo-B100) chez l'Homme, où un codon stop est généré par déamination du codon CAA en UAA. Cela résulte en la formation d'une protéine tronquée, apo-B48⁴⁶. L'édition de A en I quant à elle concerne 90% de l'édition ARN. Cette réaction est catalysée par l'enzyme ADAR (*adenosine deaminase acting on RNA*) qui se lie aux ARN double-brin. La majorité des bases éditées se situent dans les séquences non-codantes de l'ARNm, plus particulièrement dans les séquences répétées inversées telles que les séquences Alu, les séquences introniques ou encore les LINEs (*long interspersed elements*). ADAR est présente sous 3 formes, ADAR1, ADAR2 et ADAR3, issues de 3 gènes différents⁴⁷. Le mutant ADAR1-/- murin conduit à la mort embryonnaire par apoptose ; ADAR1 est donc essentiel à la vie chez les mammifères. Une dérégulation du système d'édition entraîne un dysfonctionnement du système nerveux central, de même que l'apoptose des neurones suite à une ischémie cérébrale et à une mauvaise édition du site Q/R du pré-ARNm du récepteur du glutamate, GluR-B.⁴⁷

Plusieurs fonctions sont proposées pour l'édition de A en I. Elle peut mener à la mutation de sites donneurs ou accepteurs d'épissage et conduire à l'inclusion ou l'exclusion d'introns Alu ; les ARN édités peuvent également être retenus dans le noyau par la protéine p54^{nrb} dans un corps nucléaire, le paraspeckle. p54^{nrb} a la faculté de se lier directement aux inosines, comme c'est le cas pour CTN-RNA, l'ARN nucléaire du transporteur cationique d'acide aminés murin CAT2. Durant un stress, le 3'UTR de CTN-RNA est clivé, permettant ainsi son export vers le cytoplasme et sa traduction ; la rétention nucléaire serait dans ce contexte une façon de répondre rapidement au stress cellulaire. Cependant une autre étude a montré que la structure double brin de l'ARN de même que la présence d'un mécanisme édition ne mène pas systématiquement à la rétention mais que de tels ARN peuvent être efficacement exportés et recrutés dans les polysomes^{47,48}. Les miARN sont aussi sujets à la déamination de A en I. Cette édition permet d'inhiber le clivage par Drosha de certains pri-miARN ou encore de générer une bibliothèque plus diversifiée de miARN ciblant davantage de séquences⁴⁷.

Les ARN édités, de par leur structure, ont une stabilité affectée : les paires de base U-I dites de Wobble sont plus instable que l'appariement U-A, alors que le *mismatch* A-C donnant I-C après édition stabilise au contraire la structure⁴⁷. De plus, l'inosine peut être lue de différentes façons par le ribosome, en général comme une guanosine, plus rarement comme une adénosine ou un uracile selon le codon et sa position au sein de celui-ci. Ces résultats suggèrent une grande variabilité dans l'interprétation du code génétique sous sa forme éditée. Les mêmes auteurs ont pu montrer que les ribosomes s'arrêtent 400 à

500 nucléotides en amont du site d'édition, diminuant ainsi le taux de traduction ou favorisant la synthèse de protéines tronquées⁴⁹. En réponse au stress, l'enzyme ADAR1 a été montrée comme se relocalisant dans les granules de stress et ayant des fonctions anti-apoptotiques, potentiellement en éditant des ARN dans le cytoplasme⁵⁰. Enfin, l'édition de structures ARN double brin favorisant la traduction, tels que les pseudo-nœuds ou les IRES, pourrait empêcher l'interaction de protéines se liant à l'ARN et donc réguler négativement la traduction.

2.3 Stabilité de l'ARN et contrôle qualité

La stabilité de l'ARN dépend de sa transcription, de sa maturation, de son export ainsi que de sa vitesse de dégradation dans le cytoplasme. La cellule possède des moyens de contrôler la validité d'un ARNm en amont de la synthèse protéique, coûteuse en énergie.

Déadénylation

La déadénylation est la première étape de la dégradation d'un ARN. Comme mentionné plus haut, la nucléase PARN est une des protéines qui permet ce processus en se liant à la coiffe de l'ARN une fois que le complexe d'initiation de la traduction l'a rendu accessible. Suivant la déadénylation, la dégradation de l'ARN proprement dite a lieu, de 5' en 3' ou inversement, ce qui implique des complexes différents. La voie endoribonucléolytique est moins couramment utilisée : les endoribonucléases telles que PMR1 et ERN1/IRE1 ciblent les ARN en cours de traduction.^{51–53} (Cf. [figure 2A](#)).

P-bodies et granules de stress

Les protéines responsables de la dégradation des ARNm se retrouvent sous la forme de foci dans le cytoplasme, appelés P-bodies (pour *processing bodies*). Les ARNm s'y rendent pour être dégradés, mais peuvent aussi en ressortir pour s'associer aux polyribosomes, ce qui fait des P-bodies des lieux de rétention, ou réserves d'ARNm. Les granules de stress sont formées comme leur nom l'indique en réponse au stress et sont des foci cytoplasmiques où se concentrent les ARNm dont la traduction est réprimée (Cf. [figure 2B](#)). Leur formation requière la phosphorylation du facteur

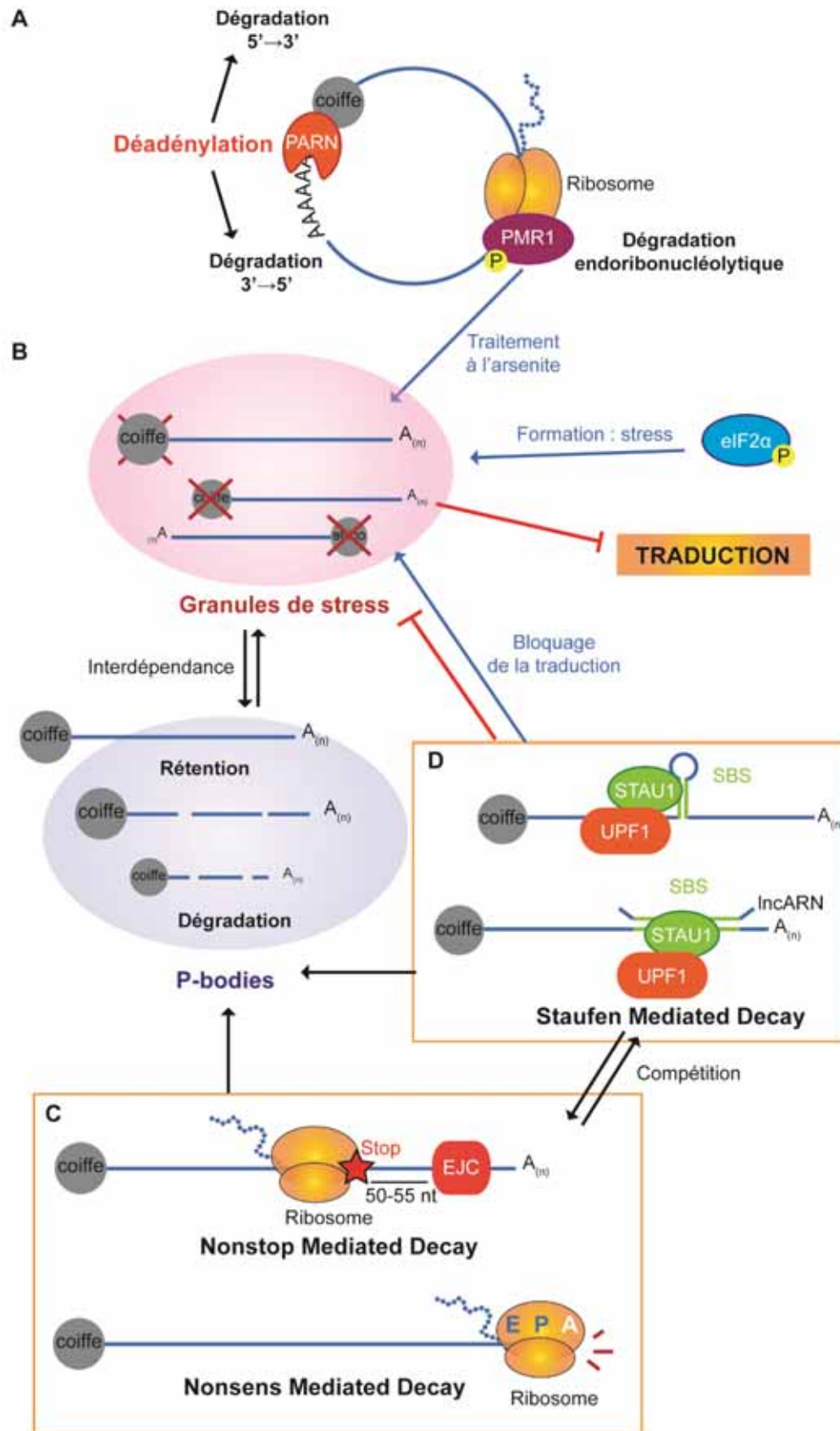


Figure 2. Mécanismes de dégradation et de contrôle qualité de l'ARN. A : déadénylation ; B : Granules de stress ; C : Nonsense mediated decay et Nonstop mediated decay ; D : Staufen Mediated Decay.

d'initiation de la traduction eIF2 α dont nous parlerons plus en détail dans la 2^e partie de ce volet. Les P-bodies et les granules de stress sont liés spatialement et dans leur composition. Les granules de stress seraient un endroit de stockage et de remodelage des ARNm désassemblés d'avec les polyribosomes avant leur passage dans les p-bodies pour leur dégradation⁵⁴. Le « contrôle qualité » des ARNm de la cellule passe par trois voies principales : le « non sense-mediated mRNA decay » ou NMD, le « no-stop mRNA decay » ou NSD et le no-go mediated decay décrit chez la levure⁵¹. Ces trois voies assurent la destruction d'ARNm pouvant conduire à la synthèse de protéines tronquées ou défectueuses.

Non sense mediated decay

Le NMD est un mécanisme de surveillance couplé à la traduction qui entraîne la dégradation des ARNm possédant un codon stop prématuré c'est-à-dire que ne se situe pas dans le dernier exon. Leur détection se fait par reconnaissance du codon stop de traduction prématuré ainsi que par la présence du complexe de jonction exon-exon (EJC) 50 à 55 nucléotides en aval du codon non-sens (Cf. **figure 2C**). En temps normal les EJC sont déplacés par le "premier jet" de traduction par le ribosome⁵¹. Une taille importante du 3'UTR de l'ARNm peut aussi être le déclencheur du NMD. Ce mécanisme de surveillance est couplé au stress : en effet son inhibition conduit à la phosphorylation d'eIF2 α , un facteur d'initiation de la traduction habituellement phosphorylé lors de stress comme l'hypoxie ou le stress du reticulum^{55,56}, ce qui conduit à une diminution globale de la synthèse protéique. De fait, le NMD est inhibé lors de l'hypoxie⁵⁷.

« No-stop mediated decay » et « no-go mediated decay »

Le NSD a lieu lorsque l'ARNm ne possède pas de codon stop. Le ribosome va se rendre ainsi jusqu'à l'extrémité de la queue polyA de l'ARNm et le complexe de NSD sera recruté par le site « A » libre du ribosome, permettant la dégradation 3'-5' de l'ARN (Cf. **figure 2C**). La voie NGD a quant à elle été décrite chez la levure, mais il n'en est pas fait mention chez les eucaryotes supérieurs.

« Staufen mediated decay » (SMD)

Une voie entrant en compétition avec le NMD est le Staufen Mediated Decay. Présente chez les mammifères, la voie SMD détecte les ARN double brin formés soit par un repliement interne (intramoléculaire) soit par l'interaction avec un/des ARN(s) non codant(s) (intermoléculaire) (Cf. **figure 2D**). Cette structure est reconnue par la protéine STAU1 qui se fixe sur ses sites de liaison (*STAU1-binding sites*) suffisamment en aval du codon stop de l'ARNm ciblé. STAU1 peut former des homodimères ou des hétérodimères avec son homologue STAU2. Lorsque STAU1 se fixe à l'ARN double brin, cela provoque le recrutement de UPF1, une ARN hélicase ATP dépendante, ce qui

déclenche la dégradation de l'ARNm cible. UPF1 se lie également à UPF2 dans la NMD, ce qui explique pourquoi les deux voies, NMD et SMD, entrent en compétition⁵⁸. De plus, STAU1 se relocalise dans les granules de stress de façon concomitante à la dissolution des polysomes. Sa suppression augmente la formation des granules de stress, inversement sa surexpression empêche leur formation durant le stress oxydatif. D'après les auteurs de l'étude, STAU1 stabiliserait les polysomes par interaction avec le ribosome, prévenant ainsi la formation des granules de stress, cette formation dépendant de l'équilibre entre polysomes et p-bodies⁵⁹.

2.4. Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles par les ARN non-codants

Les ARN non-codants sont des acteurs incontournables de l'expression des gènes. Ils entrent donc bien évidemment en compte dans la modulation de la transcription, de la maturation et de la stabilité des ARN. Ils se divisent en deux classes : les petits ARN (moins de 200 nucléotides) et les long ARN non codants. Les petits ARN non-codants intervenant au stade transcriptionnel et post-transcriptionnel comprennent les sn/snoARN (*small nuclear/small nucleolar RNA*) impliqués dans l'épissage, les miARN intervenant dans la stabilité des ARNm, les ARN interagissant avec PIWI. Les long ARN non-codants sont plus divers de structure et d'origine variées.

eARN et modificateurs de chromatine

Des ARN non codants sont générés à partir des *enhancers* de la transcription de leur gène, des milliers de paires de base en amont du point +1. Leur transcription, uni ou bidirectionnelle, semble dépendre de l'activité de l'*enhancer* lui-même. Ils peuvent être polyadénylés ou non et ont donc une durée de vie variable, mais sont décrits comme étant fonctionnels. Ils serviraient de plateforme pour le repliement et la stabilisation de la chromatine afin de favoriser l'interaction entre l'*enhancer* et son promoteur (Cf. [figure 3A](#)). D'autres ARNnc permettent de modifier localement ou globalement la chromatine. Un des exemples les plus célèbres est le long ARN non-codant Xist (*X chromosome inactivation*). Il est impliqué dans l'extinction du second chromosome X chez la femelle⁶⁰. Ce type d'ARN non codant interagit avec des complexes de modification de la chromatine pour diriger la modification épigénétique des histones. Ce phénomène d'expression ou répression d'allèle hérité des parents est appelé « empreinte ». ⁶¹ D'autres ARNnc peuvent agir *en trans*. Par exemple le long ARNnc HOTAIR est produit à partir du cluster de gène homéobox HOX exprimés à différents moments et lieux au cours du développement (Cf. [figure 3B](#)). Il a pour rôle de recruter des méthyltransférases ou des déméthylases au cluster HOX-D par reconnaissance d'un domaine ADN

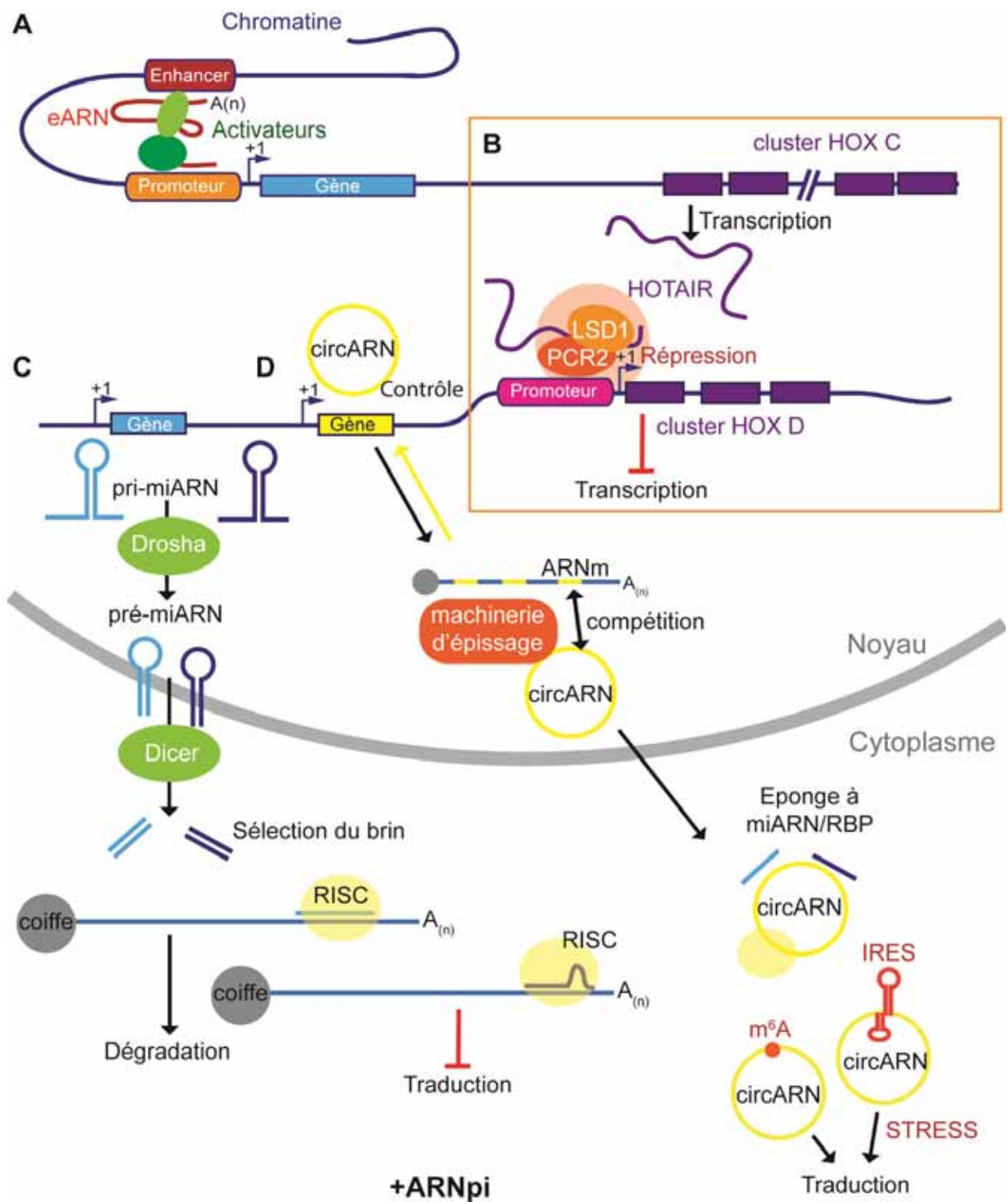


Figure 3. Les ARN non-codants régulateurs de l'expression des gènes. A : mécanisme d'action des eARN ou ARN enhancer ; B : Transcription et action du lARNnc modificateur de chromatine HOTAIR ; C : mécanisme de génèse et d'action des microARN ; D : Mécanismes d'action des circARN.

riche en GA, afin d'éteindre une région de 40 kb sur le chromosome⁶⁰.

miARN

Les microARN font partie de la classe d'ARN non codants les plus étudiés ces dernières années. Ils comportent entre 22 et 24 nucléotides. Ils ont la capacité de se lier au 3'UTR des ARNm pour induire leur dégradation ou inhiber leur traduction (Cf. [figure 3C](#)). Les miARN sont importants pour le développement et sont impliqués dans un grand nombre de pathologies incluant les maladies cardiovasculaires et le cancer⁶². Ils sont produits à partir de gènes transcrits par l'ARN polymérase II pour la plupart, ou à partir de gènes codants, puis maturés à partir de pri-miARN en pré-miARN dans le noyau avant export vers le cytoplasme, où ils sont pris en charge par le complexe RISC^{63,64}.

PiARN

Les piARN ou ARN interagissant avec Piwi sont des ARN allant de 24 à 31 nucléotides dont le nom provient de leur capacité à se lier aux protéines Piwi de la famille des Argonautes⁶⁵. Ces ARN sont modifiés en 3' par une 2'O-méthylation et possèdent pour la plupart une uridine en 5'. Ils arborent une complémentarité avec les éléments transposables et répétitifs. Chez la Drosophile les piARN vont cibler ces éléments transposables pour les détruire via les protéines Piwi mais aussi éteindre les loci d'origine des transposons. Ces piARN s'expriment dans les cellules germinales et dans le stade précoce de développement de l'embryon chez les mammifères afin de protéger la cellule en division de remaniement génétiques pouvant être fatals^{66,67}. Chez *C. elegans*, une étude a montré qu'une altération des conditions environnementales conduit à une réduction de l'expression des piARN lors d'une hausse des températures, ou à une augmentation lors d'une infection par une bactérie. Ces changements sont transmis aux générations futures et altèrent l'expression des gènes ; de plus une transmission du signal est faite entre les cellules somatiques et germinales. Les piARN sont donc un nouvel ensemble d'ARNnc capable de répondre au stress en adaptant l'expression des gènes^{68,69} et dont l'expression est transmise à la descendance.

ARN circulaires

Les ARN circulaires représentent une classe d'ARNnc encore peu étudiée car longtemps considérés comme des artefacts de la machinerie d'épissage. Cependant les études récentes suggèrent que leur implication dans la modulation de l'expression des gènes est étendue et diverse. Ces ARN sont formés par rétrojonction de deux exons non colinéaires (EcARN), ou encore de deux introns (CiARN), ou un mélange des deux (EiARN). Leur forme circulaire leur confère une grande stabilité. Ils sont exprimés dans différents tissus, à différents stades du développement. Ils se retrouvent impliqués dans des pathologies comme le cancer et sont également induits en cas de stress. Leur

biogenèse va entrer en compétition avec l'épissage canonique des ARNm, ce qui est une première forme de régulation. De plus, ils contrôlent la transcription de leur gène parental par interaction avec l'ARN polymérase II et les snRNP et hnRNP^{70,71}. Les ARN circulaires exon-exon, majoritairement cytoplasmiques, peuvent avoir la fonction d'« éponge » à miARN⁷² et à RBP (protéines se liant à l'ARN), ou la fonction d'ARNm traduit en protéine (Cf. **figure 3D**). Cette dernière fonction des circARN est en passe de devenir leur fonction principale, et leur grande stabilité en fait des outils biotechnologiques de choix pour la production de protéines recombinantes.

II. Régulation de la traduction

La traduction représente l'étape d'interprétation de l'ARN messager donnant lieu à la synthèse de la protéine. C'est une autre grande étape de l'expression des gènes, qui se déroule dans le cytoplasme de la cellule après export de l'ARNm à partir du noyau. La traduction et toute la machinerie qui y est associée sont profondément régulées, en commençant par l'initiation.

1. Les étapes de la traduction

Tout comme la transcription, la traduction se déroule en trois étapes : l'initiation, phase durant laquelle le début de la séquence codante sera reconnu par la machinerie de traduction, le ribosome ; l'élongation, phase au cours de laquelle le ribosome parcourt l'ARNm tout en synthétisant le polypeptides ; et enfin la terminaison, qui permet au ribosome de se décrocher de l'ARNm, de relarguer le polypeptide, et d'achever ainsi la synthèse protéique. Nous discuterons ici de la traduction dite « canonique » de l'ARNm, faisant intervenir sa coiffe.

1.1. L'initiation

L'initiation de la traduction se déroule en plusieurs phases : l'attachement à la coiffe de la petite sous-unité du ribosome, le balayage et la reconnaissance du codon initiateur avec la fixation de la grande sous-unité du ribosome.

Les différents acteurs de l'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction fait intervenir différents acteurs. Les premiers sont les facteurs d'initiation de la traduction, eIF (*eucaryotic Initiation Factor*) dont le rôle et la forme sont divers et seront décrits ci-dessous. Le deuxième est l'ARN de transfert initiateur ou ARN_t-Met. Les ARN de transfert sont des petits ARN non codants qui ont un rôle primordial dans la traduction. Ce sont des molécules adaptatrices d'une taille située entre 70 et 96 nt : l'anticodon situé dans une boucle de l'ARN lie le codon sur l'ARNm et l'extrémité 3' lie l'acide aminé correspondant au duplex codon-

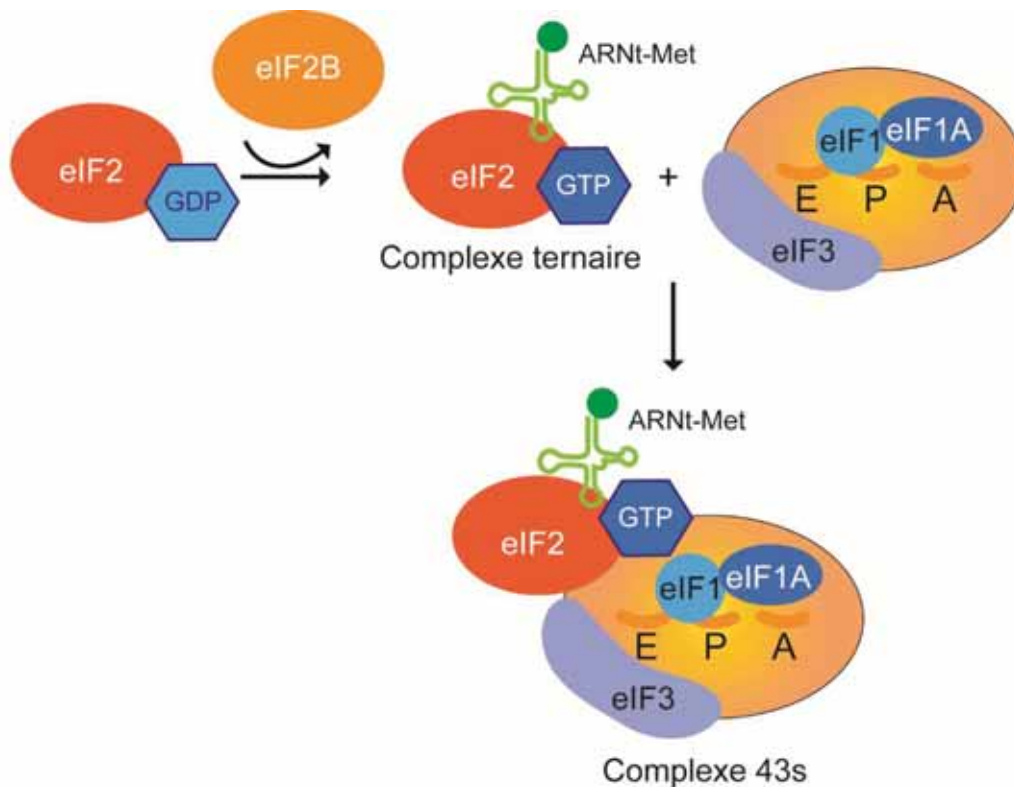


Figure 4. Formation du complexe de pré-initiation 43S. Echange du GDP d'eIF2 en GTP par l'échangeur eIF2B ou GEF ; recrutement de l'ARNt initiateur ARNt_i-Met et de la sous-unité 40S du ribosome par eIF1, eIF1A et eIF3 : formation du complexe de pré-initiation 43S.

anticodon. Un ARNt apporte un acide aminé à un codon donné, aussi il existe exactement 61 ARNt différents pour répondre à la diversité du code génétique. Tous les ARNt ne sont pas présents dans la même cellule car la première base de l'anticodon, dite de Wobble, peut correspondre à plusieurs bases

La méthionine est l'acide aminé initiateur car AUG, le codon *start* le plus répandu, code pour cet acide aminé. Cependant toutes les protéines matures ne commencent pas par une méthionine : en effet si le 2^e acide aminé est une arginine, la méthionine est enlevée. Elle est en revanche préservée si le 2^e acide aminé est une lysine. D'autres codons initiateurs existent : CUG, GUG, ACG, UUG sont également des codons utilisés bien que moins efficacement reconnus que l'AUG⁷⁴.

Enfin, un troisième acteur de l'initiation de la traduction est la sous-unité 40S du ribosome. Son nom provient de l'unité du coefficient de sédimentation Svedberg. C'est la sous-unité la plus large du complexe d'initiation. Elle permet de contrôler la liaison entre l'ARNt et l'ARNm. Le ribosome se divise en deux parties : la tête et le corps, l'ARNm se liant au niveau de la fente qui sépare les deux. La sous-unité 40S comporte en outre trois sites de liaison pour les ARNt, A (aminoacyl), P (peptidyl) et E (exit). Elle est formée par l'ARN ribosomique 18S (ARNr 18S) ainsi que 33 protéines⁷⁵.

Formation du complexe de pré-initiation

La traduction commence par la formation du complexe de pré-initiation ou complexe 43s (Cf. [figure 4](#)). Ce dernier est composé du complexe ternaire associé à la sous-unité 40S du ribosome et additionné de facteurs d'initiations. Le complexe ternaire (CT) est formé du facteur eIF2 associé au GTP et de l'ARN de transfert initiateur lié à la méthionine (ARN_t-Met). eIF2 a une forte affinité pour ARN_t-Met seulement lorsqu'il est associé à une GTP, sa forme inactivée est stablement associée à une GDP. Le facteur eIF2B, ou GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) va échanger le GDP contre une GTP pour activer eIF2, ce qui conduira à l'initiation de la formation du complexe ternaire. Par la suite, trois facteurs (eIF1, eIF1A et eIF3) recrutent le complexe ternaire sur la sous-unité 40S. Leur fixation à la 40S entraîne son changement conformationnel. La petite protéine eIF1 se fixe près du canal ARNm et du site P de la 40S. eIF1A se fixe à côté d'eIF1 près du site A et du « centre de décodage ». Ce dernier a pour fonction de vérifier le bon couplage du codon de l'ARNm avec l'anticodon de l'ARN_t dans le site A du ribosome au cours de l'élongation^{76,77}. Finalement, le facteur eIF3, complexe composé de 13 sous-unités, s'étend largement autour du canal de sortie de l'ARNm sur la 40S. Il permet lui aussi le recrutement du CT sur la sous-unité 40S.

Fixation à la coiffe

La fixation de la petite sous-unité du ribosome à la coiffe est effectuée par les facteurs d'initiation eIF4. Le plus connu, eIF4E, se lie directement à la coiffe. Il forme un complexe avec l'hélicase eIF4A et la protéine d'amarrage eIF4G. eIF4E est une protéine hautement conservée qui peut être remplacée par exemple par celle de la levure avec la même efficacité^{78,79}. La disponibilité d'eIF4E régule la formation du complexe eIF4F. De plus, son expression est fortement contrôlée, car seule une surexpression moyenne (2,5 fois) suffit pour être tumorigène⁸⁰. eIF4G quant à elle permet le lien entre la petite sous-unité du ribosome et l'ARNm. C'est une protéine difficile à étudier de par sa grande taille. Elle permet le recrutement du complexe de préinitiation (PIC) 43S. eIF4G interagit également avec PABPC1 (*Poly(A)-Binding Protein*), qui comme son nom l'indique est fixée à la queue poly(A) pour stabiliser l'ARNm. Cette interaction PABP-eIF4G permet une circularisation de l'ARNm. De plus cette interaction stimule le recrutement du PIC-43s, promeut le recrutement de la sous-unité 60S du ribosome, et augmente la concentration des ribosomes en terminaison dans un périmètre proche de la coiffe⁷⁹. eIF4G va se lier à eIF4A par ses domaines N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD), grâce à deux domaines HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR) formés de répétition en tandem d'hélice alpha liées par une courte boucle. Cette interaction favorise le lien de eIF4A avec l'ARN et l'hydrolyse de l'ATP. La liaison entre eIF4E et eIF4G provoque la restructuration de l'ARN grâce à l'activité hélicase d'eIF4A⁸¹.

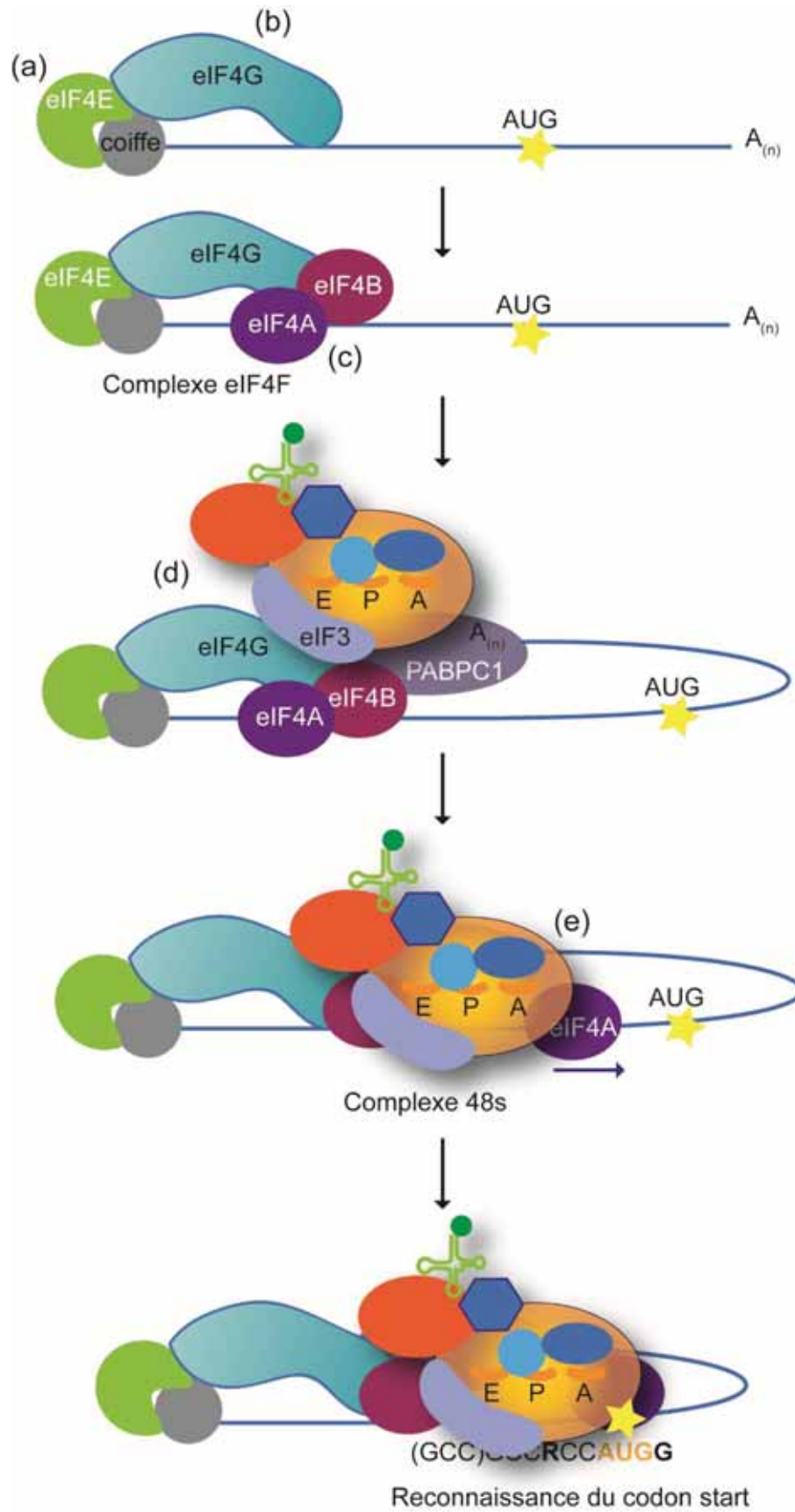


Figure 5. Initiation de la traduction eucaryote.

Le facteur eIF4B, lui, n'est pas indispensable pour le recrutement du ribosome. Il interagit avec le facteur eIF3 et l'ARN ribosomique 18S et stimule l'activité hélicase d'eIF4A. Enfin, le facteur eIF3 situé sur le PIC interagit avec le complexe eIF4F, notamment une liaison de eIF3 avec la coiffe a été décrite concomitante à la perte d'eIF4E⁸².

Voici l'ordre établi de recrutement des différents facteurs d'initiation (Cf. **figure 5**) :

- (a) Reconnaissance de la coiffe par eIF4E ;
- (b) liaison de eIF4G avec l'ARN et eIF4E et stabilisation de l'interaction d'eIF4E avec la coiffe ;
- (c) liaison de eIF4A avec eIF4G, hydrolyse de l'ATP par eIF4A, recrutement de eIF4B : changement de conformation d'eIF4A en hélicase active qui va défaire les structures secondaires de l'ARN et déplacer le complexe protéine-ARN ;
- (d) interaction entre eIF4G et eIF3 pour recruter le PIC 43S ;
- (e) recrutement de l'ARNm dans le canal ARNm du ribosome. Cette étape est encore peu décrite dans la littérature.

A l'issue de ces étapes, le complexe 48S est formé. L'étape suivante d'initiation de la traduction est le balayage.

Balayage et reconnaissance du codon initiateur

Le ribosome chargé sur l'ARNm va le balayer de 5' en 3' à la recherche du codon initiateur, le plus souvent un AUG comme mentionné plus haut. eIF4A entraîne le PIC en déroulant la molécule d'ARNm grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Lorsqu'il rencontre le codon initiateur dans son site P, le ribosome fait une pause ; cet AUG est en général le plus proche du 5' de l'ARNm. Il se doit d'être entouré d'un contexte nucléotidique spécifique, appelé séquence Kozak, dont le consensus est le suivant : (GCC)GCC**R**CCA**AUGG** avec le R en -3 étant un A ou un G. Plus le contexte se rapproche de ce consensus, plus l'AUG va être efficacement utilisé pour l'initiation. Les lettres en gras, en -3 et +4 sont déterminantes pour la reconnaissance du site d'initiation de la traduction. Des variations sont cependant possibles chez les eucaryotes. L'ARN ribosomique 18S va lui-même s'hybrider avec l'ARNm pour faciliter le positionnement du ribosome sur le codon initiateur dans un contexte Kozak⁸³. Tout au long du balayage, les extrémités C-terminales d'eIF1 et d'eIF1A agissent pour contrôler le codon en tant que codon non-AUG en déstabilisant le complexe codon-anticodon mésapparié⁸⁴. La conformation ouverte du ribosome qui en résulte empêche l'intégration de l'ARN_t-Met initiateur dans le site P. Lorsque le ribosome rencontre le codon initiateur, des résidus N-terminaux d'eIF1A interagissent avec le duplex codon-anticodon tandis que des résidus plus éloignés entrent en contact avec les nucléotides +4 et +5 de l'ARNm. Cette conformation va inhiber le balayage et conformer le ribosome en mode « fermeture » (Cf. **figure 6**). eIF2 charge ensuite l'ARN_t-Met dans le site P lorsque

son GTP est converti en GDP, puis eIF2, eIF1 et le eIF1A sont libérés du site P. Enfin, eIF5B-GTP apporte la sous-unité 60S et son GTP est hydrolysé en GDP. L'élongation commence alors.

1.2. L'élongation

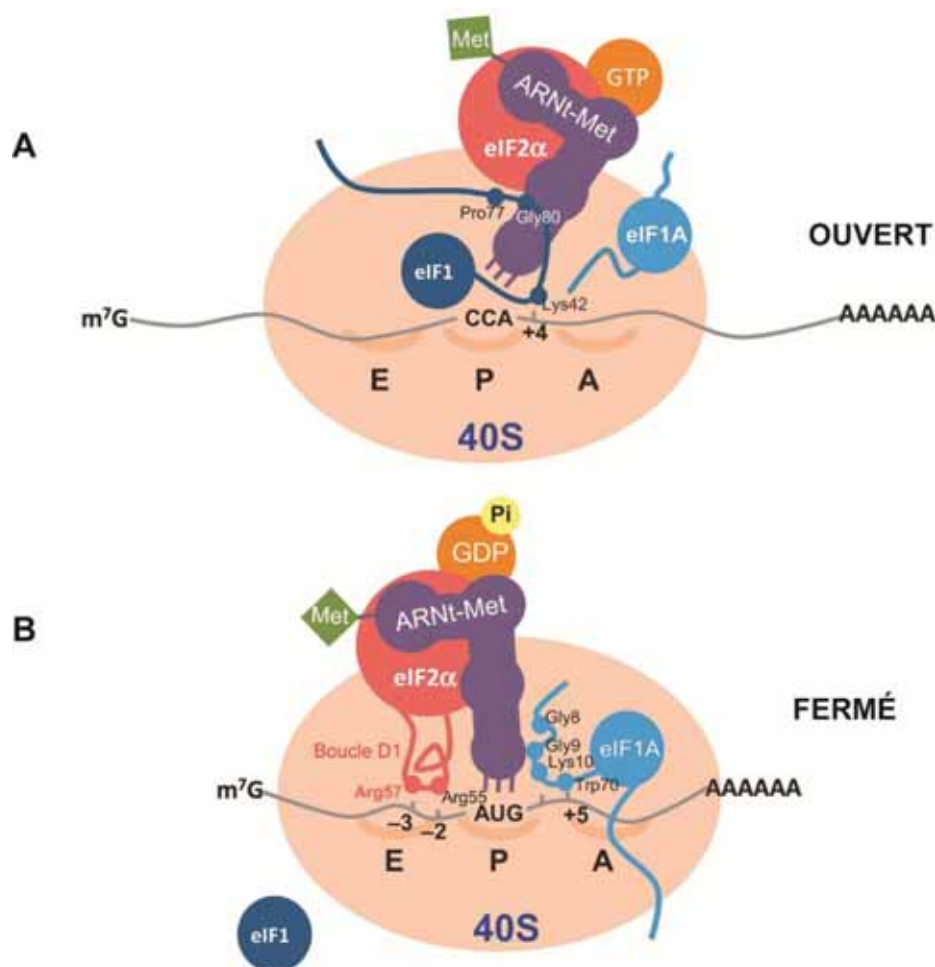


Figure 6. Reconnaissance du codon d'initiation. Adapté de Hernández, G., Osnaya, V. G. & Pérez-Martínez, X. Conservation and variability of the AUG initiation codon context in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* (2019). doi:10.1016/j.tibs.2019.07.001.

L'élongation se fait par le déplacement du ribosome de 5' en 3' avec l'incorporation et la liaison successive des acides aminés apportés par les ARNt. Cette étape est régulée par le facteur d'élongation eEF-1 et son GTP. Après le codon initiateur, un deuxième ARNt aminoacétylé entre dans le site A, la reconnaissance du codon stimule l'hydrolyse de GTP et déplace le facteur eEF1A du site A. Au même moment le ribosome change de conformation ce qui entraîne le contact du 3' de l'ARNt dans le site A avec l'ARNt portant la chaîne de polypeptide du site P, et la liaison peptidique est formée. Cette

réaction peptidyl transférase est catalysée par l'ARN ribosomique lui-même^{85,86}. un déplacement des acides aminés du site A et P aux site E et P a ensuite lieu avec la liaison du facteur d'élongation eEIF2-GTP, ce qui conduit à la libération de l'ARNt du site E et le relargage d'eEIF2-GDP; le site A étant vide, le facteur d'échange eEF-1B recycle eEF1A-GDP en eEF1A-GTP, rendant sa conformation initiale au ribosome. Celui-ci se retrouve alors prêt à accueillir un nouvel ARNt dans le site A, et le mécanisme se réitère^{87,88}.

1.3. La terminaison

La terminaison a lieu lorsque le ribosome rencontre un codon stop : UAA, UAG, UGA. Aucun ARNt ne reconnaît ces codons. Le facteur de libération eRF-1 (*eukaryotic Release Factor*) en revanche reconnaît ces trois codons et conduit à la libération du ribosome et du polypeptide par hydrolyse aidé par eRF-3, une GTPase. La liaison d'eRF3 a lieu en premier, suivi de DDX19-ATP qui place eRF1 au niveau du codon stop, ce dernier entrant en contact avec eRF-3⁸⁹. Le ribosome est ensuite recyclé pour servir à un nouveau tour de traduction en partie grâce à l'action d'eRF1⁸⁸.

2. Régulations de la traduction en cas de stress

Comme c'est le cas pour la transcription, les trois étapes de la traduction sont régulées en cas de stress. En effet, la traduction est un processus coûteux en énergie pour la cellule. Face au stress, elle est donc bien souvent bloquée à différents niveaux pour économiser de l'énergie et prioriser la réponse géniques aux protéines essentielles à la survie de la cellule. Nous commencerons par décrire brièvement les régulations qui existent en ce qui concerne les étapes d'élongation et terminaison de la traduction, puis nous expliciterons les contrôles et mécanismes alternatifs d'initiation de la traduction plus en détails car c'est à ce niveau que se font la majorité des régulations : les étapes les plus longues et complexes à mettre en place sont celles les plus susceptibles d'être régulées.

2.1. Régulation de l'élongation et de la terminaison

Une régulation de l'élongation bien connue concerne la synthèse des protéines sécrétées. Après cinq à trente codons, le ribosome fait une pause sur les ARNm encodant pour des protéines sécrétées. Cette pause est contrôlée par la SRP (*Signal Recognition Particle*), qui interagit avec la séquence signal localisée en N-terminal du polypeptide en cours d'élongation et prend la place dans le site A. Cet amarrage bloque l'entrée de nouveaux ARNt et donc l'élongation de la traduction jusqu'à ce que le polysome soit redirigé vers le réticulum endoplasmique⁹⁰. On voit ici que l'occupation du site A est un moyen simple de réguler l'élongation de la traduction. De nombreux facteurs interagissent avec ce site, tous potentiellement cibles d'une régulation. La terminaison elle-même peut être précoce en cas

de rencontre du ribosome avec des codons rares : cette rencontre provoque la pause du ribosome et eRF1 entre en compétition avec les ARNt pour l'occupation du site A⁹¹.

Les miARN peuvent eux aussi entraîner une pause du ribosome⁹², de même que la protéine FRMP déficiente dans le syndrome du X fragile⁹³. La protéotoxicité est une source de stress pour la cellule. Lorsqu'on la nourrit avec des analogues d'acides aminés, cela résulte en un mauvais repliement des protéines : une fois partiellement synthétisée (environ 50 résidus d'acides aminés), la protéine naissante est exposée à l'environnement et la chaperonne HSC70 qui habituellement favorise le repliement des protéines est perturbée. Cela provoque la pause de l'élongation et une réduction de la traduction. Lors de la privation en acide aminés, la voie MAP kinase est activée, la kinase eEF2K phosphoryle le facteur d'élongation eEF2 ce qui réduit l'élongation. Dans le cancer intestinal, mTORC1 phosphoryle la kinase S6 qui elle-même active eEF2K.

L'élongation peut également être régulée par l'utilisation des différents codons et de la disponibilité en ARNt. De façon, intéressante, l'utilisation des différents codons influence la vitesse d'élongation du ribosome comme découvert par Yu *et al* dans un système de traduction "*cell free*" : en effet, les codons "optimaux" augmente la vitesse d'élongation tandis que les codons "non-optimaux" baissent cette vitesse. Cette caractéristique repose bien sur l'utilisation des codons et non pas la structure de l'ARN comme testé par Yu *et al*. De plus, l'utilisation des codons et la vitesse d'élongation influence également le repliement des protéines, par exemple l'utilisation de codons non optimaux est préférentielle pour les zones non structurées des protéines eucaryotes^{91,94}. Le stress influence également la concentration des différents ARNt^{87,95,96}. Enfin, chez la levure, le stress induit par la concentration en H₂O₂ conduit à une baisse de la fin de la course du ribosome et donc de l'élongation ou de la terminaison⁹⁷.

2.2. Régulation de l'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est l'étape la plus régulée, et ce à différents niveaux. Une des principales voies de régulation de l'initiation de la traduction passe par l'état de phosphorylation des facteurs d'initiations eIF. En cas de stress comme la carence en nutriment, le choc thermique, les dommages à l'ADN et la variation de la pression d'oxygène (hypoxie ou hyperoxie), des kinases et phosphatases sont activées pour phosphoryler ou déphosphoryler ces facteurs.

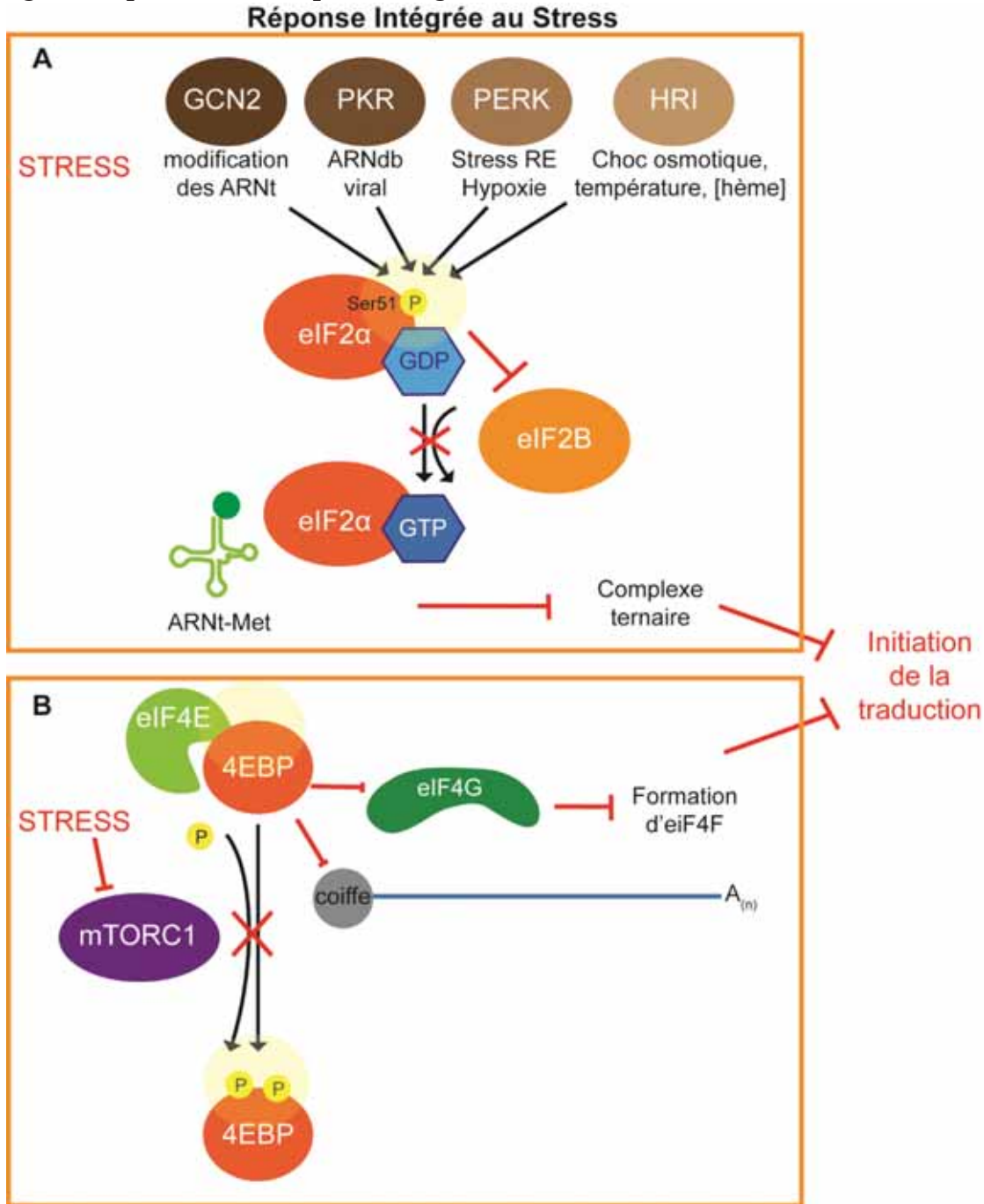
Régulation par eIF2 : la Réponse Intégrée au Stress

Figure 7. Régulation de l'initiation de la traduction passant par eIF2 α et 4EBP. A : réponse intégrée au stress, phosphorylation d'eIF2 α par quatre kinases (GCN2, PKR, PERK, HRI) inhibant la liaison d'eIF2B et l'échange du GDT en GTP, prévenant ainsi la formation du complexe ternaire ; B : inhibition de la phosphorylation de 4EBP par mTORC1 et séquestration d'eIF4E empêchant l'initiation de la traduction par reconnaissance de la coiffe.

Une cible privilégiée de ces kinases est le facteur eIF2. Il est responsable comme mentionné plus haut de la formation du complexe ternaire par échange de son GDP en GTP par eIF2B. Cependant lorsque la sous-unité eIF2 α est phosphorylée sur sa serine 51, elle devient un inhibiteur compétitif d'eIF2B. Ainsi son recyclage n'est plus assuré et il y a une réduction de formation du complexe ternaire

et donc de l'initiation de la traduction⁹⁸. Cette voie de régulation de la traduction en réponse au stress est appelée Réponse Intégrée au Stress (*Integrated Stress Response*) (Cf. [figure 7A](#)).

Quatre kinases régulent la phosphorylation d'eIF2 dans différents cas de stress de façon spécifique : GCN2, PKR, PERK, et HRI. GCN2 répond au niveau d'ARNt aminoacétylé et à l'irradiation UV, PKR est activée par l'ARN double-brin produit notamment lors d'une infection virale, PERK (*PKR-like Reticulum Endoplasmic (RE) Kinase*) est sensible au repliement anarchique des protéines dans le réticulum endoplasmique ainsi qu'à l'hypoxie, et HRI (*Heme Regulatory Inhibitor*) répond au niveau en hème et au choc osmotique ou de température⁹⁹. Cette phosphorylation de eIF2 α mène à une baisse globale de la synthèse protéique comme on peut le voir en étudiant les polysomes, c'est-à-dire les ARN associés au ribosomes, purifiés sur gradient de sucrose. La proportion d'ARNm engagés avec plusieurs ribosomes diminue tandis que la fraction de monosomes inactifs (80S) augmente en cas de phosphorylation d'eIF2 α ¹⁰⁰.

4EBP et la voie m-TOR

Une autre voie de contrôle de l'initiation de la traduction passe par la liaison du complexe eIF4F avec la coiffe de l'ARNm. En effet cette étape est déterminante pour l'initiation de la traduction. La protéine 4EBP ou eIF4EBP1 (pour *eIF4E binding protein 1*) peut se lier à eIF4E et entrer en compétition avec eIF4G pour son site de liaison ce qui prévient la formation du complexe eIF4F¹⁰¹. La liaison de 4EBP à eIF4E dépend là aussi de son état de phosphorylation : hypophosphorylée, 4EBP interagit fortement avec eIF4E, mais en cas de phosphorylation cette interaction perd de sa puissance (Cf. [figure 7B](#)). De façon constitutive, 4EBP est phosphorylée par le complexe mTORC1 comprenant la kinase m-TOR, ainsi que les deux protéines Raptor (une protéine régulatrice associée à m-Tor) et mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*). mTOR appartient à la famille des *phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K)-related kinase (PIKK)*¹⁰². mTORC1 agit comme un senseur du stress en évaluant le niveau d'acides aminés et le statut énergétique de la cellule, et en répondant par le ciblage des protéines impliquées dans la traduction ou des kinases régulant la machinerie de traduction. En cas de stress comme l'hypoxie, mTORC1 est inactivé et 4EBP est donc hypophosphorylée, séquestrant ainsi eIF4E et prévenant la formation de eIF4F¹⁰³. S6K est aussi la cible de mTORC1. Or cette kinase phosphoryle la protéine ribosomique RPS6 ainsi qu'eIF4B pour promouvoir la traduction^{104,105}. Finalement, il a été décrit que mTORC1 interagit directement avec eIF3 pour inciter l'interaction eIF3-eIF4G et la formation du PIC^{106,107}.

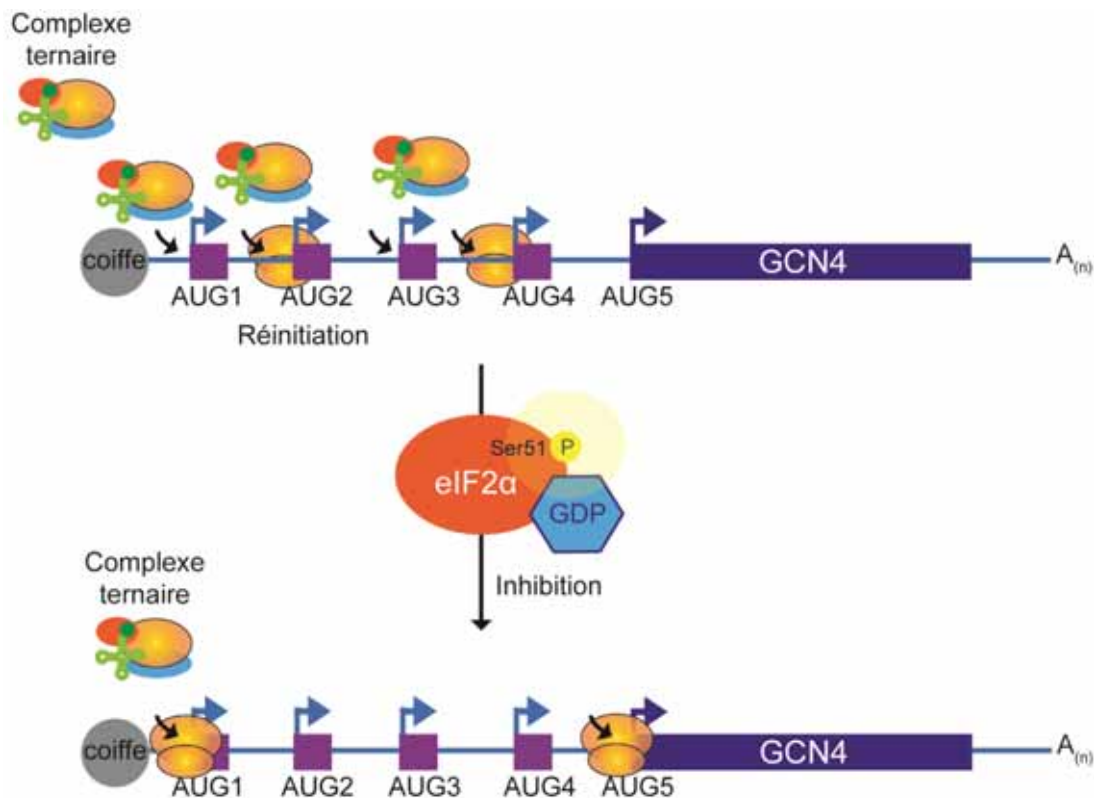
uORF

Figure 8. Mécanisme de fonctionnement des uORF. Adapté de Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 318–327 (2005).

Les uORF ou *upstream Open Reading Frame* sont des régions codantes situées dans le 5'UTR de l'ARNm, la plupart du temps dans un cadre de lecture différent de l'ORF principal. Elles entraînent une baisse de la traduction de l'ORF principal du fait que le ribosome favorise l'initiation de traduction à un codon initiateur plus proche du 5'. Le codon initiateur n'est pas forcément l'AUG, CUG est également un codon fréquemment rencontré pour une initiation en amont de l'ORF principale^{108,109}. Un des exemple les plus connus de régulation de la traduction par les uORF est celui de GCN4 chez la levure (Cf. **figure 8**). Lors de la privation en acides aminés, GCN2 phosphoryle eIF2α qui entraîne une diminution globale de la traduction. L'ARNm GCN4 comporte quatre uORF en 5' de l'ORF principal. Lorsqu'eIF2α n'est pas phosphorylée, le ribosome initie majoritairement à l'ORF1 et de ce fait aucune sous-unité 40S ne balaie jusqu'à l'AUG de l'ORF principal qui n'est donc pas traduit. Lorsque le niveau en complexe ternaire est bas dû à la phosphorylation d'eIF2α, le manque de complexe ternaire fait que l'initiation est inefficace sur les premiers AUG rencontrés, et le ribosome balaie l'ARNm jusqu'à l'ORF principal, permettant ainsi la synthèse de GCN4. Ainsi le niveau de phosphorylation d'eIF2α reflète la capacité du ribosome à réinitier aux uORF ou au codon initiateur de GCN4¹¹⁰. Dans le cas du stress du réticulum endoplasmique (RE), une augmentation du mauvais

repliement des protéines est un danger pour la cellule car conduit à son apoptose. L'UPR (*unfolded protein response*) entraîne la dissociation de la chaperonne BiP de la kinase PERK, ce qui permet à cette dernière son oligomérisation et son autophosphorylation, puis elle va à son tour phosphoryler eIF2 α ce qui entraîne une baisse de l'initiation de la traduction et de la synthèse protéique. En revanche la traduction de l'ARNm du facteur de transcription ATF4 est améliorée dans ces conditions, par un mécanisme similaire à celui décrit pour GCN4 : il permet de répondre rapidement à l'UPR en induisant l'expression de gènes pour résoudre le stress du RE. L'ARNm possède deux uORF, la deuxième chevauchant l'ORF principal. Les uORF-1 et -2 sont traduits en temps normal, inhibant la traduction de l'ORF ATF4, mais en cas de stress la moindre disponibilité en complexe ternaire entraîne l'initiation au codon de l'ORF ATF4¹¹¹.

Altération des ARNt par le stress

Les ARN de transfert sont également la cible de RNAses lors de divers stress cellulaires. Lors de l'hypoxie, du stress oxydatif, du choc thermique ou de la privation en nutriment, la ribonucléase ANG ou Angiogénine est active et clive entre 1 et 3% des ARNt cytoplasmiques pour générer des ARNti. Les 5'ARNti sont fonctionnels et vont perturber la traduction en déplaçant le complexe eIF4F de la coiffe, ce qui va conduire à la formation de granules de stress de manière indépendante d'eIF2 α ^{54,112,113}. De façon intéressante, les ARNt ayant subi une 2'O-méthylation de la cytidine C34 de wobble du ARNti-Met (CAT) par SNORD97 et SCARNA97 sont protégés du clivage endonucléolytique de l'angiogénine dans le cytoplasme¹¹⁴.

Structure tridimensionnelle

La première structure tridimensionnelle identifiée pour empêcher l'initiation de la traduction est la tige-boucle IRE (pour *Iron Responsive Element*) présente dans les 40 nucléotides en aval de la coiffe des ARNm codant pour la ferritine ou la ferroportine. Lorsque la concentration en fer est basse, cette structure IRE est liée par IRP1 ou IRP2 (*Iron Regulatory Protein 1/2*) qui va empêcher la liaison du complexe 43s à l'ARNm pour initier la traduction par encombrement stérique^{115–117}. Des structures "hairpin" peuvent également bloquer l'association de la 43s à l'ARNm¹¹⁸. Les pseudo-nœuds sont des structures tridimensionnelles de l'ARN, de grande taille, consistant en au moins deux tiges-boucles formant une sorte de nœud. Dans le cas de l'interféron γ , cette structure attire la kinase PKR qui phosphoryle eIF2 α et empêche la traduction de l'ARNm IFNG en une boucle en *feedback*. Les structures G-quadruplex empêchent quant à elle l'initiation de la traduction en prévenant la liaison du 43S ou en ralentissant le balayage. L'hélicase eIF4A a un rôle primordial dans l'aplanissement des structures secondaires du 5'UTR pour faciliter la fixation du ribosome. Enfin, l'ARN peut former une

structure avec des ARN non codants issus du même gène comme c'est le cas pour Uchl1. Cet ARN non codant possède des séquences répétées qui promeuvent le recrutement des ribosomes^{119–121,122}.

2.3. Initiation de la traduction indépendante de la coiffe

IRES

Une structure répondant à l'initiation de la traduction en étant totalement indépendante de la traduction coiffe-dépendante est l'IRES ou site d'entrée interne de ribosome (*Internal Ribosome Entry Site*). Les structures IRES sont un moyen de répondre rapidement au stress cellulaire pour initier la traduction lorsque le mécanisme d'initiation par la coiffe est bloqué. Les IRES étant le pilier central de ma thèse, leur origine, leur fonctionnement, ainsi que les acteurs associés à ce type de traduction sont décrits en détails en [partie 3.2](#).

Epigénétique : modifications m⁶A, m¹A

La modification des bases entre aussi en compte dans la régulation de la traduction. Les modifications les plus abondantes sont les N⁶ méthyladénosines (m⁶A). Elle constitue 0,1 à 0,5% des modifications de base dans l'ARNm ce qui équivaut à 3-5 bases modifiées par transcrits. La distribution de ces bases semble conservée et n'est pas aléatoire : elle se concentre notamment sur les 5'UTR et à proximité des codons stop¹²³. L'ajout et la suppression de ces marques est dynamique, ce qui va de pair avec la réponse au stress par la régulation de l'expression des gènes. Les m⁶A régulent l'expression des gènes à différents niveaux : épissage, rétention, export, dégradation mais aussi au niveau de la traduction. Une étude de Meyer *et al* (2015) a en effet montré grâce à un test de gène rapporteur luciférase qu'une seule marque m⁶A est suffisante pour entraîner une traduction indépendante de la coiffe¹²⁴. Cette traduction impliquerait l'interaction d'eIF3 avec les m⁶A ; cette dernière provoquerait le recrutement du complexe 43S directement sur le 5'UTR de l'ARNm. En temps de stress, eIF2 n'étant pas disponible pour recruter le CT, ABCF1 va interagir avec lui pour prendre le relais¹²⁵. Une étude de Wang *et al* (2015) a montré que le lecteur YTHDF1 promeut le recrutement dans les polysomes des ARNm portant les marques m⁶A aux environs du codon stop, par la circularisation de l'ARNm. YTHDF2 en revanche entraîne la dégradation des ARNm m⁶A, et l'équilibre entre dégradation et traduction reflète le dynamisme que procure cette forme d'épigénétique au cours du développement et du stress¹²⁶. Les modifications de base m¹A sont elles aussi des marques qui régulent la traduction et varient en cas de stress et de signaux physiologiques. Enrichies dans les 5'UTR et près des sites d'initiation de la traduction, les m¹A sont corrélées positivement avec l'efficacité de la traduction, leur distribution est conservée entre la souris et l'homme^{127,128}.

2.4. Ribosomes spécialisés

Lorsqu'on étudie la composition des ribosomes et des facteurs associés à la traduction, on se rend compte qu'elle comporte une grande hétérogénéité. Selon le tissu, la phase du développement, mais aussi les stimuli environnementaux, stress et pathologies, l'appareil de synthèse protéique s'adapte et s'agence pour répondre aux besoins spécifiques de traduction. Les ribosomes se spécialisent. Ses 79 protéines (33 pour la petite et 46 pour la grande sous-unité) varient en composition ainsi qu'en modifications post-traductionnelles entre des pools de ribosomes au sein de la même cellule et entre différents tissus ; ses quatre ARN ribosomiques (5S, 5,8S, 28S dans la grande sous unité et 18S dans la petite) sont modifiés par des méthylation, pseudouridylation, acétylation et ribosylation ou peuvent varier dans leur séquence. Les modifications des ARNr ont été observées durant le développement ou dans des pathologies. Dans le cancer, la synthèse et les modifications des ribosomes sont altérées en réponse avec l'agressivité de la tumeur. La traduction globale n'est pas impactée, mais lorsqu'on regarde l'activité de plusieurs IRES et notamment P53, on constate que ce type de traduction est moins efficace, et que le contrôle de la fidélité de la traduction est fortement réduit¹²⁹. De plus, P53 réprime l'expression de la méthyl-transférase fibrillarine (FBL). Dans les cellules cancéreuses où P53 est inactivée, la surexpression de FBL conduit à la modification des motifs de méthylation des ARNr, à l'altération de la fidélité de la traduction et une augmentation de la traduction IRES des gènes associés au cancer¹³⁰. Les ribosomopathies sont nombreuses, telles que l'anémie de Diamond-Blackfan, la microcéphalie, des syndromes du spectre autistique. Les facteurs initiateurs de la traduction (eIF3, eIF4F) sont eux aussi requis pour la synthèse en protéine de transcrits spécifiques. Des études ont enfin montré que les ribosomes spécialisés pouvaient être impliqués dans la traduction IRES-dépendante *via* les protéines eL38 et eS25 du ribosome durant le développement et le stress du RE^{131,132}.

3. Les IRES et leurs ITAF

3.1. Découverte : les IRES viraux

Les sites d'entrées internes de ribosomes (IRES) sont des structures présentes de façon prépondérante dans le 5'UTR des ARNm. Elles permettent une initiation interne du ribosome sans passer par la coiffe de l'ARN messager, aussi ce type d'initiation de la traduction est actif lorsque la traduction coiffe-dépendante n'est pas possible. C'est notamment le cas lors d'une infection virale. Les virus ont besoin de la machinerie de la cellule qu'ils infectent pour se répliquer, aussi ils la détournent à leur profit, parfois en bloquant la synthèse protéique des ARNm cellulaires. Les premiers IRES ont été découverts chez la famille des picornavirus, dont les ARNm ne sont pas coiffés : le virus

de l'encéphalomyocardite (EMCV) et le poliovirus plus précisément¹³³. Les informations ci-dessous sont également résumées dans ma revue¹³⁴ (en [annexe I](#)).

IRES de classe I

Les IRES ont été divisés en quatre classes. la classe I regroupe les IRES ayant besoin de la plupart des facteurs d'initiation à part eIF4E, et un balayage est requis pour assurer l'initiation. Un grand nombre des IRES recensés dans la classe I sont retrouvée chez les *picornaviridae*, des virus non enveloppés au génome composé d'un petit ARN simple brin plus. Le poliovirus par exemple code pour une protéase, 2A, qui va cliver eIF4G. Ce dernier perd ainsi son site de liaison à eIF4E mais conserve l'interaction eIF4A/eIF3. Le virus inhibe ainsi sélectivement la traduction coiffe-dépendante. Le ribosome est recruté par entrée interne au niveau d'un codon AUG qui n'est pas utilisé comme codon initiateur. Le ribosome une fois recruté balaye l'ARN pour commencer la traduction à un codon AUG situé environ entre 30-150 nucléotides en aval^{135–139}.

IRES de classe II

Pour la classe II en revanche le balayage n'est pas utilisé, l'initiation commence directement au codon initiateur au niveau duquel le ribosome est recruté. Les IRES viraux les plus étudiés de cette classe sont les IRES EMCV et FMDV (*foot and mouth disease virus*) ; ils partagent une topologie similaire bien que la séquence nucléotidique ne soit pas la même (ce qui est souvent le cas pour les IRES). FMDV clive eIF4G, *a contrario* EMCV induit 4EBP^{140,141}.

IRES de classe III

La classe III regroupe des IRES aux structures secondaires et tertiaires plus évoluées telles que des pseudo-nœuds et ne requérant que 3 facteurs d'initiation : eIF2, eIF3 et eIF5. Elle est centrée autour de l'IRES du virus du HCV (*hepatitis C virus*), un IRES hautement structuré en quatre domaines. De par sa grande taille l'IRES entoure le codon d'initiation¹³³.

IRES de classe IV

Enfin la classe IV rassemble les IRES les plus sophistiqués : une structure compacte ne requérant pas de facteur d'initiation. Elle est composée des IRES des virus de la famille des *dicistroviridae* qui possèdent deux ORF dans leur ARN. Ce sont de très petits IRES, moins de 200 nucléotides. Ils n'ont ni besoin de codon initiateur, ni d'eIF, ni de complexe ARNt-Met, seulement de la petite et de la grande sous-unité du ribosome. Le domaine 3 de l'IRES du IAPV (*Israel acute paralysis virus*) par exemple va même mimer l'ARNt pour sélectionner le cadre de lecture à traduire¹⁴².

Certains virus comptent deux IRES n'appartenant pas forcément à la même classe et donc avec des modes d'initiation différents. Un des exemple les plus connu est le virus du VIH-1, qui en outre arbore plusieurs type d'initiation de la traduction différentes : l'initiation coiffe-dépendante, le saut des ribosomes (la capacité qu'on certain virus à esquiver le 5'UTR de l'ARNm pour se lier directement au codon initiateur), et les IRES¹⁴³.

3.2. Les IRES cellulaires

Découverte

De par le fait qu'il sont coiffés, on a tout d'abord pensé que les ARNm ne faisaient pas l'objet d'une traduction IRES-dépendante. Cependant en 1991 le premier IRES cellulaire a été décrit dans l'ARNm de la BiP (*Immunoglobulin heavy-chain binding protein*, ou GRP78), une protéine chaperonne induite par le stress¹⁴⁴. Quelle est la pertinence de la présence d'IRES dans un ARNm coiffé ? Tout simplement pour autoriser la traduction lorsque le mécanisme d'initiation coiffe-dépendante est bloqué. C'est le cas lors de la mitose (phase G2→M du cycle cellulaire), l'apoptose, ainsi que lors de différents stress cellulaires. D'autres IRES cellulaires ont ensuite été trouvés en suivant, dans des facteurs de transcription homéobox (HOX) comme *antennapedia*, ainsi que dans les ARNm du protooncogène c-myc et de plusieurs facteurs de croissance (lymph)angiogéniques des familles FGF (fibroblast growth factor) et VEGF (vascular endothelial growth factor)¹⁴⁵⁻¹⁴⁹. Globalement des IRES se retrouvent dans les gènes de réponse au stress, de maintenance, de survie : les transporteurs, récepteurs et canaux arrivent en tête devant les suppresseurs de tumeur, puis les facteurs de croissance et les gènes liés à l'apoptose, enfin les protéines du cytosquelette, les oncogènes, protéines liées aux ARN, etc¹⁵⁰.

Position et structure des IRES cellulaires

Une étude de Weingarten-Gabbay *et al* (2016) a montré que l'initiation IRES-dépendante serait en fait plus courante que précédemment imaginée : une étude systématique avec un rapporteur bicistronique leur a permis de quantifier la traduction coiffe-indépendante du génome humain et de génomes viraux. Près de 10% des gènes humains possèderaient des transcrits permettant une traduction coiffe-indépendante grâce à des éléments présents dans leur 5'UTR. De façon surprenante des éléments présents dans le 3'UTR et dans certains ORF sont également capables de promouvoir une traduction coiffe-indépendante. Les auteurs font en outre le parallèle entre ces résultats et le fait que certains ARNm viraux de plante contenant leur IRES en 3'UTR sont circularisés, ce qui place le scanning du ribosome près de l'IRES; or les IRES cellulaires sont eux aussi circularisé grâce à l'interaction PABP1-

eIF4G¹⁵¹. Leur étude révèle de plus qu'il existerait deux type d'IRES : des IRES globaux et locaux, identifiés par des mutations ponctuelles. La structure de ces deux type d'IRES diffère : davantage conservée pour les IRES globaux, elle serait plus flexible pour les IRES locaux.

Il est cependant difficile d'identifier des IRES à partir d'une analyse bio-informatique basée sur des séquences ou des prédictions de structure. En effet les 5'UTR contenant un IRES ont le même pourcentage de GC, la même longueur et le même nombre de codons AUG en amont du codon initiateur que la moyenne des 5'UTR du transcriptome humain. Pour prédire une structure, les algorithmes se basent sur la séquence primaire. Paradoxalement, la structure d'un IRES peut être préservée indépendamment de la séquence. Pourtant les RBP se lient à des motifs bien précis, souvent conservés, aussi pour prédire la présence d'un IRES, les algorithmes ont été conçu pour identifier à la fois une structure et de petits motifs de potentielle liaisons protéiques. À ce jour les algorithmes de prédiction de structure IRES ne sont pas satisfaisants. Une structure prédite *in silico* doit être vérifiée *in vitro* par des techniques biochimiques ou d'imagerie. Pour l'étude des IRES, la NMR et la cristallographie à rayon X sont limitées car d'une part le spectre des 4 nucléotides se confond, et d'autre part les ARN forment difficilement des cristaux, dont la pureté n'est pas suffisante ou la diffraction est trop faible^{152,153}. La meilleure façon d'étudier leur structure serait de le faire *in vivo* avec les protéines se liant à l'IRES (ITAF). Les méthodes enzymatiques sont donc plus adaptées, tel que le SHAPE : (pour *Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*). Cette méthode est basée sur des modifications enzymatiques du squelette de l'ARN des bases flexibles. Plusieurs structure d'IRES viraux ou cellulaires ont été résolues en employant le SHAPE^{145,147,154}. Les analyses des données admettent différentes structures pour un IRES. Cependant le SHAPE permet de déterminer la structure au niveau des nucléotides et plus difficilement une structure secondaire entière, elle doit donc être croisée avec différents résultats d'expériences, notamment des analyses phylogénétiques¹⁵⁵. Finalement, si on les compare aux IRES viraux, les IRES cellulaires sont pour certains moins structurés, mais plusieurs d'entre eux ont quand même besoin de conserver une structure globale pour exhiber une activité maximale^{134,153,156}.

Méthodes d'étude des IRES et contrôles

Les méthodes d'études des IRES ont été résumées admirablement dans une revue de Sunnie Thomson (2012)¹⁵⁷. Comme mentionné ci-dessus, la prédiction bio-informatique des IRES étant encore impossible, la seule façon de démontrer leur présence est expérimentale. Les indices pouvant conduire à leur présence sont (a) un long 5'UTR contenant plusieurs codons initiateurs non utilisés, ce qui peut aussi indiquer la présence d'uORF ; (b) un 5'UTR long et/ou structuré ; (c) une protéine s'exprimant en condition de stress quand la traduction coiffe-dépendante est diminuée, alors que la

quantité de transcrit ne varie pas. À ce jour la principale méthode d'identification et d'étude des IRES est l'utilisation d'un rapporteur bicistronique, assorti de plusieurs contrôles. Il est nécessaire de cloner la séquence dont on veut tester l'activité entre deux gènes rapporteurs tels que la luciférase, ou la β -galactosidase dont l'activité est facile à mesurer. Le principe du test est que le premier cistron est exprimé de manière coiffe-dépendante et reflète l'activité du promoteur, tandis que la traduction du second cistron est dépendante de l'IRES. Le rapport d'activité entre les deux cistron permet de mesurer l'activité IRES. Mon laboratoire d'accueil a mis en place le vecteur bicistronique « Lucky-Luke » exprimant la luciférase Renilla (Luc R) en premier cistron et la luciférase Firefly (Luc F) en deuxième cistron. Le ratio de luminescence Firefly/Renilla est le reflet de l'activité IRES, sous réserve qu'il n'y ait pas de promoteur ou de site d'épissage cryptique dans la séquence insérée. Les sites donneurs potentiels d'épissage présents dans la séquence de la LucR ont été mutés pour empêcher un épissage cryptique. Il est également important d'effectuer un contrôle du bruit de fond avec un rapporteur bicistronique vide, sans structure IRES potentielle mais avec une séquence pouvant prévenir la réinitiation sur le deuxième cistron, généralement une structure en tige et boucle empêchant la progression du ribosome. Il faut penser à inclure une partie du début de la séquence codante, comme vu en amont les structure IRES contiennent parfois des domaines qui s'étendent après le codon d'initiation. Un autre test, moins utilisé, est l'ARN circulaire : étant donné que celui-ci ne possède pas de coiffe, la traduction se fera forcément de manière coiffe-indépendante.¹⁵⁸ Enfin, il est possible d'introduire une structure tige-boucle en 5' de la séquence à tester suivi du gène rapporteur. La tige-boucle bloquera la traduction coiffe-dépendante et en théorie, la traduction due à l'IRES seulement est détectée¹⁴⁴.

Il est déterminant d'assortir à ces méthodes de détection des contrôles car il est facile d'assigner faussement une activité IRES à une séquence. Un des premier contrôle à effectuer est la présence d'un éventuel promoteur cryptique dans la séquence à tester, qui générerait un ARN monocistronique à la traduction coiffe-dépendante en plus de l'ARN bicistronique. Cela peut être fait par RT-PCR en mesurant l'expression d'un cistron par rapport à un autre, expression qui doit être égale ; un northern blot avec une sonde ciblant le deuxième cistron est aussi une solution. Enfin, un siARN contre le premier cistron montrera si le transcrit est en un seul bloc ou si deux transcrits ont été générés. Ce contrôle peut aussi montrer qu'il existe des sites d'épissages cryptiques, un saut de ribosome ou encore une fuite du ribosome. L'ajout d'une tige-boucle en 5' devrait permettre de mettre en lumière de tels mécanismes.

Application biotechnologique des IRES à l'expression combinée de plusieurs gènes d'intérêt.

En biotechnologie, les IRES peuvent être utilisés pour construire des vecteurs de transfert de gène, permettant la traduction de plusieurs protéines à partir d'un seul ARNm, sous contrôle d'un seul promoteur. Cela permet d'éviter les phénomènes d'extinction génique liés à la compétition entre plusieurs promoteurs, notamment si l'un des gènes exprimés est toxique et fait l'objet d'une contre-sélection. Ces vecteurs dits « multicistroniques » offrent des perspectives prometteuses pour la thérapie génique combinée, afin de délivrer plusieurs molécules agissant en synergie ou ayant des fonctions complémentaires pour une plus grande efficacité thérapeutique¹⁵⁹. C'est ce qui a été démontré avec un plasmide bicistronique contenant les gènes angiogéniques FGF2 et Cyr61, dans le traitement de l'ischémie des membres inférieurs chez la souris. Un lentivecteur tricistronique contenant les trois gènes thérapeutiques apeline, FGF2 et SERCA2a (Sarco-Endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) séparés par l'IRES du FGF1 a récemment été validé dans un modèle murin pour la thérapie génique de l'ischémie cardiaque^{160,161}.

Les IRES dans les processus physiologiques

Les IRES cellulaires arborent une tissu-spécificité bien plus forte que certains IRES viraux. C'est notamment le cas de l'IRES du FGF2 : *in vivo* chez la souris cet IRES a une activité inexistante dans la plupart des tissus excepté le cerveau et les testicules¹⁶². FGF2 est en effet induit durant la spermatogenèse et la formation des réseaux synaptiques grâce à son IRES^{163,164}. L'activité IRES du FGF1 est particulièrement forte dans le muscle strié, ce qui peut expliquer l'effet de ce facteur de croissance lors de la régénération des muscles et la différenciation des myoblastes en myocytes¹⁶⁵. Les IRES sont également impliqués au cours du développement. Une étude de Shifen Xue *et al* (2015) a démontré l'existence d'IRES contrôlant de manière coordonnée la traduction de quatre des onze ARNm des gènes HOX, la famille de facteurs de transcription à homéodomaines. Ceux-ci sont régulés par la protéine ribosomique Rpl38. L'IRES Hoxa9 est de plus conservé au cours de l'évolution chez tous les vertébrés. De façon intéressante, les auteurs ont réalisé un KO (*knockout*) murin de l'IRES minimum Hoxa9. Ce KO arbore un phénotype équivalent aux souris invalidées pour Hoxa9 complet, qui est une disparition des cotes sur la vertèbre T13¹³¹.

Durant la mitose, la phosphorylation de 4EBP-1 augmente, entraînant la diminution de la traduction coiffe-dépendante. Plusieurs ARNm sont tout de même associés aux ribosomes au cours de la mitose, et ceux-ci portent des IRES : c'est le cas de Cyr61, hnRNPA/B, vimentin, ODC¹⁶⁶. On retrouve le même cas de figure durant l'apoptose, avec la phosphorylation de 4EBP1 au départ suivi du clivage d'eIF. Plusieurs IRES sont activés dans ce cas, comme la cycline T1, ZnF217, CYP1B1...¹⁶⁷.

Les IRES lors de stress et de pathologies

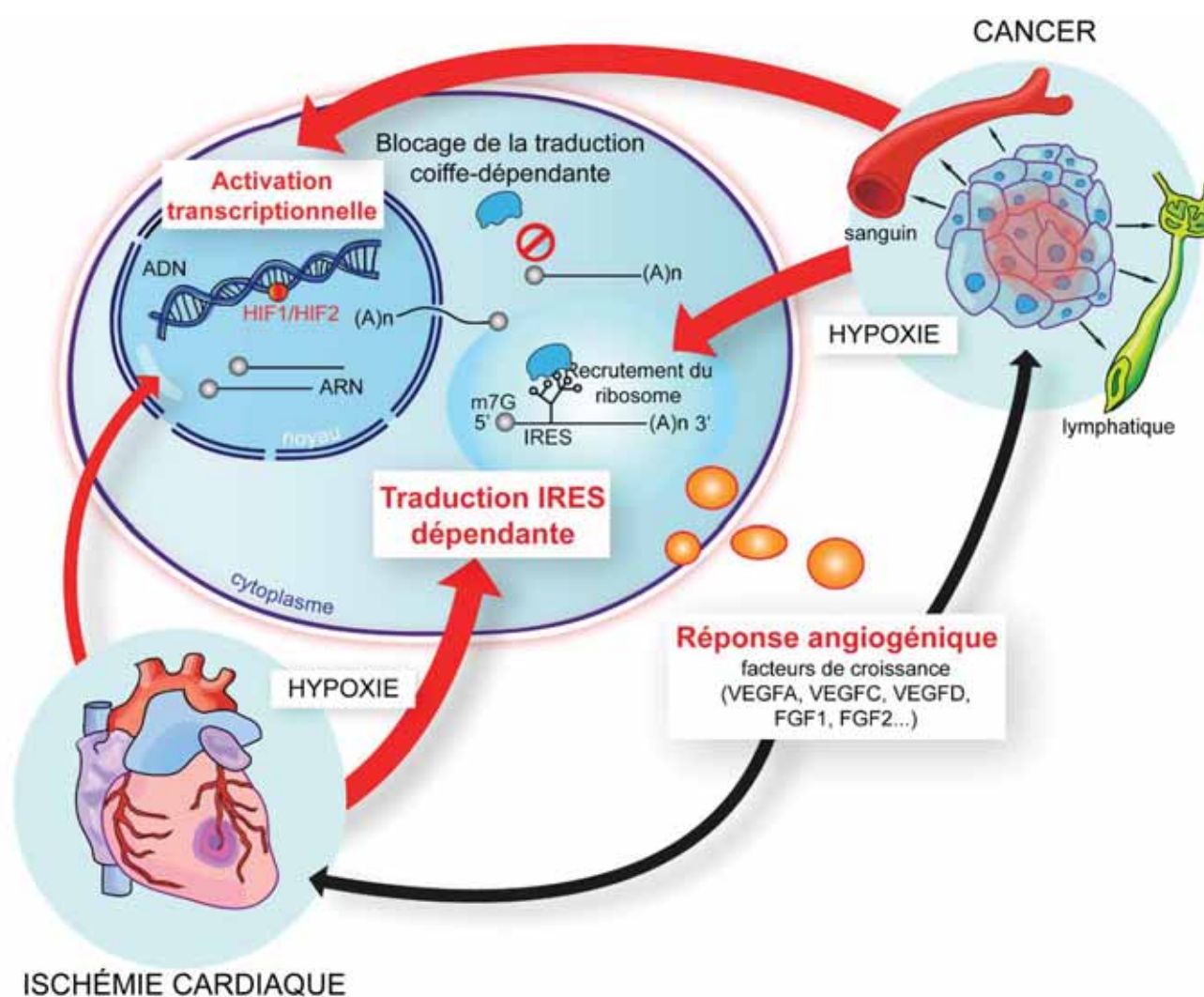


Figure 9. Régulation de l'expression des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques durant l'hypoxie. Adapté de ma revue en annexe : « IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response ». *Int J Mol Sci.* 2019 Feb; 20(4): 924.

La traduction coiffe-indépendante intervient particulièrement lors du stress. Durant l'hypoxie, il y a un switch qui se produit pour économiser l'énergie : la transcription de la plupart des ARNm est bloquée pour favoriser celle des gènes cibles de HIF1 comme expliqué en I, mais il y a également une transition de la traduction coiffe-dépendante vers la traduction coiffe-indépendante. PERK va phosphoryler eIF2 α , dans le même temps mTORC1 est inactivé et 4EBP-1 séquestre eIF4E. Aussi les ARNm portant des structures IRES sont priorisés. Le cancer est une pathologie favorisant la traduction coiffe-indépendante car le centre de la tumeur se retrouve en hypoxie dû à l'absence de vascularisation. En réponse à ce stress la tumeur va promouvoir la synthèse de facteurs de croissance pour développer des vaisseaux sanguins et lymphatiques pour permettre son développement et sa dissémination métastatique. Dans les cellules cancéreuses, les IRES des facteurs de croissance des fibroblastes FGF1,

FGF2 et FGF9, mais aussi le VEGFA, VEGFC ainsi que le proto-oncogène c-myc, et le récepteur de croissance insuline-like IGF1R sont en effet activés^{147,150,168–170} (Cf. **figure 9** issue de ma revue). Le gardien du génome p53 est lui aussi impliqué dans la traduction IRES dans le cancer : il régule le niveau d'expression de FBL (fibrillarine ARNr méthyltransférase) ce qui conduit à une altération des méthylations de l'ARNr et génère des ribosomes « cancéreux » recrutant préférentiellement des ARNm à IRES¹³⁰. L'hypoxie est aussi présente dans les pathologies cardiovasculaires telles que l'ischémie du membre inférieur et l'ischémie cardiaque, au cours desquelles l'IRES FGF1 est activé¹⁶⁰ (Cf. **figure 9** issue de ma revue). Une partie de ma thèse se concentre sur l'activité IRES dans l'ischémie cardiaque et sera décrite plus en détail en **partie III** de cette introduction et dans le **chapitre I** de mes résultats. Lors du stress du réticulum endoplasmique, trois voies de signalisation répondent au stress : IRE1a (*Inositol Requiring Enzyme 1a*), la protéine kinase PERK et le facteur de transcription ATF6. Ces trois protéines sont liées à la BiP qui, comme décrit plus haut, est libérée lors du mauvais repliement des protéines du réticulum endoplasmique, entraînant une cascade de réponse transcriptionnelle et traductionnelle. P53, c-myc, N-myc, L-myc, APAF-1, BAG-1, XIAP, sont quelques-uns des nombreux gènes induits au niveau de la traduction par le mécanisme IRES-dépendant lors du stress du RE¹³⁴. Le choc thermique, le choc osmotique, les irradiations UV, le dommage à l'ADN sont autant de stress conduisant à l'activation des IRES. Une question qui reste ouverte cependant est la façon dont l'initiation IRES-dépendante peut avoir lieu dans ces états de stress. En effet eIF2 α est phosphorylé et ne peut jouer son rôle dans la formation du complexe ternaire. eIF5B a été proposé en tant que remplaçant pour délivrer directement l'ARNt_i-Met dans le site P du ribosome^{171,172}.

Enfin, la traduction IRES en cas de stress peut avoir lieu pour les ARN circulaires. Ceux-ci ne possédant pas de coiffe, la traduction coiffe-indépendante est évidente. Longtemps considérés comme des transcrits parasites, des études suggèrent qu'ils sont impliqués en tant que régulateurs de l'expression génique à différents niveaux comme expliqué plus haut. Plusieurs études indiquent également que ces circARN sont en fait des ARNm, traduits par le mécanisme IRES- ou m⁶A-dépendant. Ces dernières années, sept ARN circulaires ont été décrits comme traduits⁷⁰.

3.3. Les ITAF

Définition d'un ITAF

La tissu-spécificité des IRES ainsi que leur régulation fine durant le stress correspondent à la nécessité pour la cellule de s'adapter à des changements métaboliques par une réponse rapide, sans passer par une phase de transcription. Aussi, en plus des facteurs d'initiation de la traduction, il existe

des acteurs incontournables de la traduction IRES-dépendante qui régulent l'activité des IRES : les ITAF (*IRES trans-acting factors*), ou facteurs transactivateurs des IRES. À ce jour, environ cinquante protéines et un ARN non codant ont été identifiés en tant qu'ITAF d'IRES d'ARNm cellulaires. Les ITAF peuvent être aussi bien des acteurs activateurs qu'inhibiteurs. On peut donc définir un ITAF comme un facteur moléculaire agissant en *trans* pour moduler l'activité d'un IRES, de façon directe en se liant à l'ARN, ou dans un complexe d'interaction avec l'IRES appelé l'IRESome.

Catégories d'ITAF

Dans ma revue, un tour d'horizon des ITAF identifiés est dressé en les classant par catégories selon leur localisation et leur type¹³⁴. Une grande majorité d'ITAF appartient à la famille des hnRNP, protéines connues pour faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, mais d'autres protéines habituellement nucléaires ont été également classées dans cette catégorie (classe I). Les hnRNP sont des protéines impliquées dans l'épissage et l'export des ARN. Certaines d'entre elles (hnRNPA1, M, K, R) sont en outre présentes dans un corps nucléaire, le paraspeckle, qui apparaît lors de stress ou de certains processus physiologiques. hnRNPK, ITAF de l'IRES *cmv* est d'ailleurs une protéine essentielle des paraspeckles car sa déplétion mène à la disparition du corps nucléaire. p54^{nrb}, assortie de PSF/SFPQ, sont d'autres ITAF de cette catégorie régulant plusieurs IRES (*c*, *n*, *l-myc* pour les deux, APAF-1, FGF1 et P53, BAG-1, LEF1 respectivement). Elles sont elles aussi des composants du paraspeckle. Le paraspeckle serait-il impliqué indirectement dans la traduction IRES-dépendante ? Cette question fait l'objet de recherches discutées dans le **2^e chapitre** de ma thèse. Le paraspeckle et l'ARN non-codant qui le structure sont en outre présentés en détail dans la **partie II** de cette introduction. Enfin, PTB (*Polypyrimidine-tract binding protein*) est non seulement répertoriée comme un ITAF de plusieurs IRES viraux dont celui de EMCV¹⁷³, mais également de 15 IRES cellulaires. Les ITAF des différentes catégories sont présentés dans le tableau de ma revue¹³⁴ en **annexe I**.

Une deuxième catégorie regroupe les protéines cytoplasmiques, la plupart étant des protéines ribosomiques ou associées aux ribosomes, mais pas exclusivement : certaines ont été répertoriées en tant qu'ITAF alors qu'aucune interaction avec la machinerie de traduction n'a été mise en lumière à ce jour. Parmi les facteurs d'initiation, on retrouve eIF3, eIF41, eIF4GI et eIF5G, tous régulant des IRES activés par l'apoptose ou l'hypoxie dans un contexte cancéreux. eL38 (ou RPL38) est également classée dans cette catégorie comme régulateur d'IRES des gènes *Hox*¹³¹. Plusieurs ITAF de cette famille régulent à la fois les IRES cellulaires et viraux, ce qui signifie qu'un ITAF fonctionne pour les deux types d'IRES suivant le même mécanisme, ou encore qu'un ITAF travaille de manière différente selon l'IRES. Les IRES cellulaires étant tissu-spécifiques, on peut supposer que cette spécificité provient du profil d'expression des ITAF.

Certains des ITAF de cette catégorie, tout comme ceux de la catégorie I, peuvent être activateurs ou inhibiteurs selon le contexte. C'est par exemple le cas de Rack1, ITAF de l'IRES d'IGF1R. La traduction de P53 est aussi contrôlée par deux IRES générant la forme pleine ou la forme Δ N-P53. Ces IRES sont régulés par de très nombreux ITAF des deux catégories qui, suivant le contexte, sont activateurs ou inhibiteurs. A l'état basal, l'IRES est inactivé par la nucléoline et PDCD4, alors que TCP80 et l'ARN hélicase A sont liés à l'IRES mais sous une conformation empêchant son activation. Lors de stress, la liaison devient plus forte et plusieurs ITAF positifs sont recrutés, notamment RPL26 de la catégorie II et hnRNPQ de la I. On comprend bien ici qu'un IRES va en général être régulé par un ensemble d'ITAF formant un complexe dynamique qui varie en composition en fonction du stress et de son intensité. Cela permet de moduler finement la réponse traductionnelle.

La dernière catégorie d'ITAF ne répertorie qu'un seul long ARN non-codant, TRMP, ITAF inhibiteur agissant sur l'IRES de p27kip. De façon intéressante, TRMP est régulé par P53, dont l'IRES est contrôlé par de nombreux ITAF comme décrit ci-dessus. TRMP est le seul ARN non-codant identifié à ce jour régulant l'activité IRES, mais sa découverte étant récente on peut supposer que d'autres seront identifiés : les ARN non-codants sont des acteurs privilégiés de ce type de traduction car ils sont nombreux à servir de plateforme d'assemblage de RBP. C'est notamment le cas du long ARN non-codant Neat1, squelette du corps nucléaire paraspeckle, dont je parlerai plus en détail dans la [partie II](#). Serait-il impliqué dans la traduction IRES-dépendante ?

Identification des ITAF

Un moyen de trouver des ITAF est d'identifier les protéines en interaction avec l'IRES, avec ou sans stress. Une méthode mise au point par l'équipe est la résonnance plasmonique de surface couplée à la spectrométrie de masse : un ARN biotinylé portant l'IRES est transcrit *in vitro*, puis immobilisé sur un capteur à l'aide de streptavidine¹⁷⁴. Des extraits de cellules soumises ou non à un stress sont ensuite passés et l'affinité de la liaison protéique est mesurée. Les protéines fixées à l'IRES sont subséquemment identifiées par spectrométrie de masse. Cette seule manipulation ne suffit pas à attribuer un rôle d'ITAF aux protéines liées, une expérience fonctionnelle est requise : par déplétion ou surexpression de la protéine candidate, l'activité IRES est étudiée grâce à un rapporteur bicistronique décrit en [3.2](#). Il est toujours intéressant de vérifier que la protéine endogène est déplétée lorsqu'on réalise l'extinction de l'ITAF candidat. Une autre possibilité pour reconstituer l'IRESome est d'effectuer une traduction *in vitro* : avec les facteurs de traduction purifiés, en ajoutant un à un les différents composants, on peut déterminer les protéines requises pour une traduction minimum¹⁷⁵.

Mécanisme d'action des ITAF

Etant donné que les ITAF ont d'autres rôles en dehors de leur implication dans la traduction IRES-

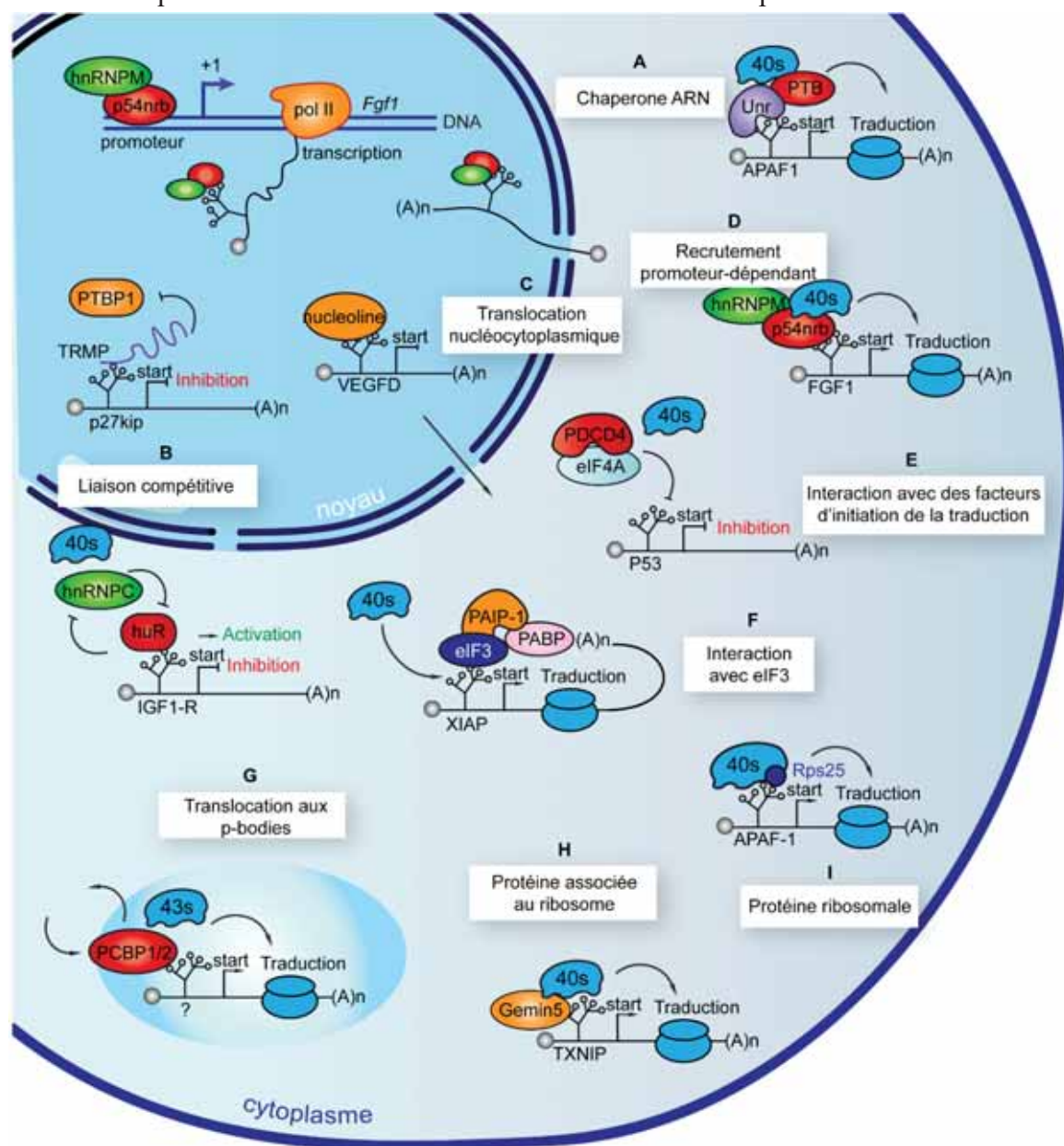


Figure 10. Différents mécanismes de contrôle de la traduction IRES-dépendante par les ITAF. Adapté de ma revue en annexe : « IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response ». Int J Mol Sci. 2019 Feb; 20(4): 924.

dépendante, la question qui se pose est : comment sont-ils redirigés vers la fonction traductionnelle ? Premièrement, la localisation intracellulaire de la protéine semble déterminante. L'ITAF nucléoline est par exemple transloqué du noyau dans le cytoplasme lors du choc thermique pour promouvoir la traduction IRES du VEGFD¹⁴⁵. C'est également le cas de hnRNPA1, PTB et PCBP1, relocalisés dans le cytoplasme en condition de stress^{176–179}. Deuxièmement, les modifications post-traductionnelles des ITAF rentrent également en ligne de compte pour leur bon fonctionnement. La phosphorylation de

hnRNPA1 par AKP entraîne son inactivation et donc celle de l'IRES de cycline D1. À l'inverse hnRNPA1 non-phosphorylé est un ITAF activateur. L'ITAF DAP5, dans un contexte d'apoptose quant à lui, est clivé (p86) pour promouvoir la traduction d'ARNm impliqués dans la mort cellulaire, y compris son propre ARN portant un IRES^{180,181}. Par quel mécanisme un ITAF est-il capable d'activer ou d'inhiber la traduction coiffe-dépendante ? Neuf types de fonctionnements ont été décrits dans ma revue¹⁰².

Le premier mode d'action des ITAF est le rôle de chaperonne, mécanisme décrit initialement pour les protéines PTB et Unr qui, en se liant à l'IRES APAF1, génèrent un changement de conformation de l'ARN qui permet le recrutement du ribosome : c'est Unr qui interagit tout d'abord avec deux tiges-boucles de l'IRES, et rend accessible le site de liaison de PTB¹⁸². D'autres hnRNP agissent probablement selon ce type de mécanisme en combinaison avec d'autres protéines (Cf. **figure 10A**).

Le 2^e mécanisme décrit est une liaison compétitive. Certains ITAF partagent des sites de liaison et entrent donc en compétition pour se lier à l'IRES, par exemple HuR et hnRNPC pour l'IRES IGF1R, l'un pour inhiber et l'autre pour activer l'IRES¹⁸³. L'ARN non-codant TRMP empêche la liaison de PTB à l'IRES p27^{kip}, inhibant ainsi l'activité de l'IRES¹⁸⁴ (Cf. **figure 10B**).

Un troisième mécanisme décrit est celui de la translocation nucléocytoplasmique. Certains IRES ont besoin d'un évènement nucléaire pour fonctionner alors que la plupart des IRES viraux n'en ont pas besoin. En effet la transfection de transcrits bicistroniques produits *in vitro* de cmc et FGF1 ne démontre aucune activité IRES, alors que la transfection d'ADN qui nécessite un passage dans le noyau active ces IRES, contrairement aux IRES viraux EMCV et HRV (*Human Rhinovirus*) pour qui l'évènement nucléaire n'est pas requis^{174,185,186} (Cf. **figure 10C**).

Le quatrième mécanisme découle du troisième : l'ITAF serait préassemblé à l'IRES dans le noyau avant son export dans le cytoplasme et ce dès la transcription. C'est le cas de l'IRES du FGF1 lié par p54^{nrb} et hnRNPM qui se localise d'abord au promoteur de FGF1 pour stimuler sa transcription¹⁷⁴. Un tel recrutement permettrait de stabiliser l'IRES très tôt dans le processus de maturation de l'ARNm. D'ailleurs de nombreuses hnRNP se lient aux ARN en cours d'épissage¹⁸⁷ (Cf. **figure 10D**).

Le cinquième mécanisme décrit les IRES dont les ITAF encouragent ou inhibent l'interaction avec des facteurs initiateurs de la traduction. Un exemple frappant est l'interaction de PDCD4 avec eIF4A démontrée par cristallographie. Cette interaction inhibe l'activité hélicase de eIF4A et par là même de plusieurs IRES (Cf. **tableau revue en annexe**¹³⁴). RBM4 à l'inverse interagit avec eIF4A en cas de stress ce qui conduit à l'activation de l'IRES^{188–190} (Cf. **figure 10E**).

Un ITAF peut également agir sur la phosphorylation de 4EPB1 comme c'est le cas de PINK1¹⁹¹. Durant l'apoptose, eIF4GI et DAP5, un autre membre de la famille eIF4G, sont clivés. Mais les fragments protéolytiques générés sont toujours actifs et vont promouvoir l'activation des IRES des

ARNm apoptotiques DAP5 et APAF1¹⁹². Ce sixième mécanisme d'action révèle que les facteurs d'initiation de la traduction eux-mêmes peuvent être impliqués en tant qu'ITAF. eIF4GI est aussi un ITAF des IRES HIF1 α et VEGFC en hypoxie. De même, eIF3 se fixe directement sur l'IRES de XIAP proche du codon initiateur et son interaction avec PABP circularise l'ARN et promeut le recrutement des ribosomes¹⁹³. Enfin eIF5B prend le relai de eIF2 α lorsque celui-ci est phosphorylé pour stabiliser la liaison de l'ARNt au ribosome, comme montré pour l'IRES de XIAP¹⁷² (Cf. [figure 10F](#)).

Le septième mécanisme implique les granules de stress et les p-bodies. PTB, G3BP1, hnRNPA1, Gemin5 sont autant d'ITAF localisés dans les granules de stress ou les p-bodies et qui sont retenus en cas de stress. Leur translocation dans le cytoplasme permet l'inhibition ou l'induction de leur IRES respectifs (Cf. [figure 10G](#)).

Le huitième mécanisme concerne les protéines associées aux ribosomes. RACK1, protéine ribosomique, et Reaper, déclencheur de l'apoptose, en font partie : elles interagissent avec la sous-unité 40S du ribosome pour promouvoir la traduction d'IRES viraux (HCV, CrPV). Gemin5 est également une protéine ribosomique qui bloque la traduction globale en se liant à des protéines de la 60S^{194–197} (Cf. [figure 10H](#)).

Enfin le neuvième mécanisme regroupe les protéines ribosomiques elles-mêmes, dans un mode d'action qui peut faire penser à celui des ribosomes spécialisés. C'est le cas de Rps25, Rpl38 et Rpl10A (eL25 et eL38, uL1) qui, en interagissant directement avec l'IRES, provoquent le recrutement du ribosome^{131,198,199} (Cf. [figure 10I](#)).

Introduction - Partie II : Les paraspeckles, corps nucléaires marqueurs de stress

I. Apparition et assemblage du paraspeckle

Le noyau comporte l'ADN organisé en territoires chromosomiques. Cependant l'espace interchromatinien contient des structures précises dépourvues de membranes qui sont distinguables en microscopie : les corps nucléaires. Ces structures sont primordiales pour le bon fonctionnement de la cellule. Hautement dynamiques, elles s'assemblent et se désassemblent en réponse à des stimuli métaboliques et extracellulaires. Les protéines nucléaires diffusent rapidement entre les différents compartiments et le noyau lui-même change de structure en fonction du cycle cellulaire^{200–203}. À ce jour les corps nucléaires identifiés sont : les corps de cajal, les corps PML (*promyelocytic leukemia*), les nucléoles, les speckles nucléaires, les corps polycomb et les paraspeckles. Ces différents corps nucléaires sont étudiés depuis de nombreuses années pour identifier leur structure et leurs fonctions. Les nucléoles sont le site de la transcription de l'ARN ribosomique et de l'assemblage des pré-ribosomes ; les speckles servent de site d'épissage, de stockage et de modification des facteurs d'épissage ; les corps de Cajal participent à l'assemblage des snRNP ; les corps PML sont impliqués dans de nombreux processus comprenant la réparation de l'ADN, l'apoptose, le contrôle de la transcription via la séquestration, la modification ou la dégradation des facteurs de transcription ; les complexes polycomb répriment la transcription des gènes en jouant sur l'extinction épigénétique ; enfin, les paraspeckles sont des corps qui se forment lors de la différenciation cellulaire et en cas de stress, et qui sont impliqués dans la régulation de l'expression génique par la rétention nucléaire d'ARNm édités et de facteurs de transcription²⁰⁴. Ces derniers nous intéressent tout particulièrement et nous allons décrire en détail leur découverte, leurs composition et formation ainsi que le rôle qui leur a été attribué.

1. Découverte des paraspeckles

Les paraspeckles ont été identifiés pour la première fois par Archa Fox et son équipe en 2002. À l'époque, un criblage à grande échelle des protéines du nucléole a permis l'identification de quatre-vingts nouvelles protéines, dont PSP1 ou PSPC1 pour *paraspeckle protein 1*. Ces auteurs se sont intéressés à cette protéine isolée de nucléoles de cellules humaines lorsque celles-ci étaient traitées à l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. PSPC1 contient deux domaines de liaison à l'ARN (RRM) ressemblant fortement à ceux de la protéine p54^{nrb}, protéine-clé du paraspeckle également identifiée comme ITAF et facteur de transcription du gène FGF1 comme décrit dans la [partie I](#). Lors d'un double marquage PSPC1/nuécléole, l'équipe d'Archa Fox a remarqué que cette protéine, de façon surprenante, ne se localise pas dans le nucléole, mais dans une dizaine de foci distincts au sein du

nucléoplasme. Ces foci ne correspondant à aucun autre corps nucléaire décrit, ils en ont déduit qu'il s'agissait d'un nouveau corps nucléaire. Ce corps nucléaire se localise à proximité des speckles et présente un aspect similaire. Aussi, Fox *et al* l'ont nommé paraspeckle²⁰⁵. Après traitement à l'actinomycine D, ils ont noté que PSP1 se relocalisait près des nucléoles, de la même façon que p54^{nrb} qui a été à ce moment identifiée comme un composant du paraspeckle.

2. composition

2.1. Le long ARN non-codant Neat1, squelette du paraspeckle

Identification

Le composant principal des paraspeckles a pour la première fois été identifié en 2007 par Hutchinson *et al*, cinq ans après la découverte de ces corps nucléaires. À la recherche d'ARN non-codant polyadénylés et enrichis dans le noyau grâce à une puce, seulement trois ARN ont été identifiés : le bien connu XIST, ainsi que deux autres ARN non-codants qu'ils nommèrent Neat1 et Neat2, pour *Nuclear Enriched Abundant Transcript*. NEAT2 est également connu sous le nom de MALAT1. Les deux Neat, conservés chez l'homme et la souris, proviennent du même locus génomique 11q13.1 : leurs gènes sont distant de seulement 60 kb. Cependant Neat1 et Neat2 n'ont pas de séquences homologues. Neat1 a été identifié comme un transcrit de 3,7 kb, non épissé et polyadénylé. De plus, un transcrit de grande taille, de plus de 17 kb, a été visualisé par Northern blot. Sa partie 5' est commune avec le petit transcrit Neat1. Neat1 est exprimé dans la plupart des tissus avec une prédominance dans le colon, le pancréas, la prostate et les ovaires, mais il est conservé seulement chez les mammifères. Enfin, des expériences de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), ont permis de localiser Neat1 dans des foci nucléaires, dénombrés entre 10 et 20 par noyau, plus nombreux chez l'homme que chez la souris mais de plus petite taille : de 0,5 à 1 µm de diamètre en moyenne²⁰⁶. Clemson *et al* (de l'équipe d'Archa Fox) ainsi que Sunwoo *et al* ont ensuite démontré l'association de Neat1 aux paraspeckles : Neat1 se superpose parfaitement aux marqueurs des paraspeckles PSPC1 et p54^{nrb}²⁰⁷. De plus les paraspeckles disparaissent suite à l'extinction de Neat1 : cet ARN non-codant est donc essentiel pour leur formation. Le transcrit de grande taille évoqué par Hutchison en 2007 a été identifié par Sunwoo *et al* comme une deuxième isoforme issue du gène Neat1 aussi appelé *Men* (*Multiple Endocrine Neoplasia*). Ce deuxième transcrit d'une taille de 23 kb, possède une queue poly(A) et est exprimé durant la différenciation des myoblastes en myotubes. Les auteurs ont nommé le petit transcrit Men ϵ et le grand transcrit Men β , mais ils sont maintenant plus souvent appelés Neat1_1 et Neat1_2²⁰⁸.

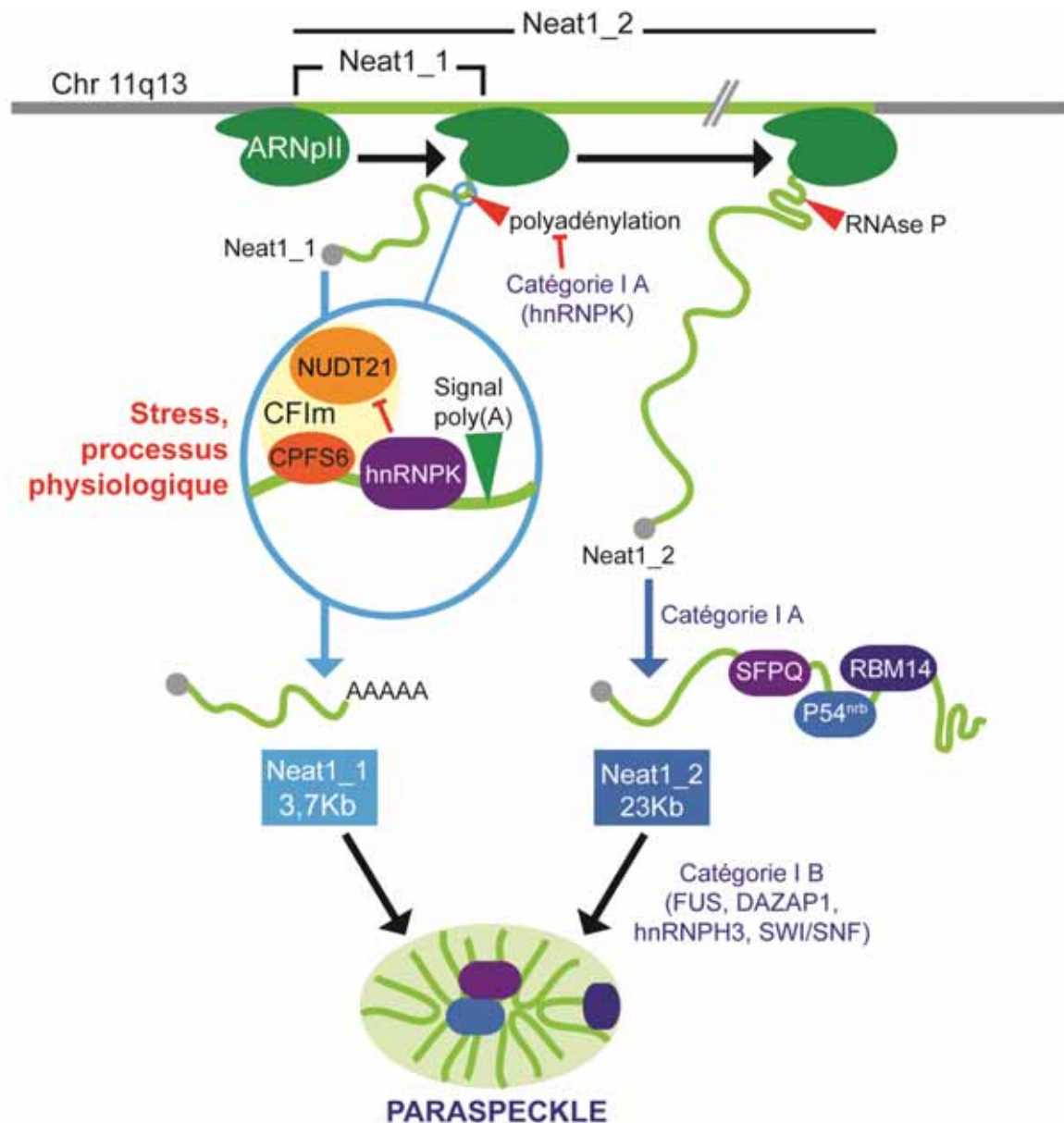


Figure 11. Mécanisme de transcription et de stabilisation des isoformes Neat1_1 et Neat1_2. Adapté de : Naganuma, T. & Hirose, T. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* **10**, 456–461 (2013).²⁰⁹

Transcription de Neat1_1 et Neat1_2

Depuis la découverte de Neat1 en 2007, on en sait bien davantage sur sa transcription et sa maturation. Neat1, situé dans le locus 11q13.1 chez l'homme, est transcrit par la polymérase II. Le gène ne contient pas d'intron, ses transcrits ne sont donc pas épissés. Il donne naissance à deux isoformes, NEAT1_1 de 3,7 kb et NEAT1_2 de 23 kb (Neat1_1 de 3,2 kb et Neat1_2 de 20,8 kb chez la souris). La séquence de NEAT1_1 est comprise dans celle de NEAT1_2 en 5', en revanche leur 3' diffère : NEAT1_1 est polyadénylé tandis que Neat1_2 ne possède pas de queue poly(A) mais une

triple hélice en 3'. Elle est formée de deux motifs riches en U encadrant une structure tige-boucle conservée chez les mammifères, et un motif riche en A¹⁶. La tige-boucle est formée par le clivage à son extrémité par la RNase P. Cette RNase est impliquée notamment dans la maturation des ARNt en clivant le pré-ARNt en 5'. Pour Neat1, la RNase P clive l'extrémité 3' en aval de la séquence de la triple hélice et en amont d'une structure ressemblant à un ARNt elle aussi codée par le gène. La RNase Z clive ensuite la structure « ARNt » en 3', générant un petit ARN d'une soixantaine de nucléotides exporté dans le cytoplasme et rapidement dégradé. Ce type de maturation en 3' est également présente chez NEAT2/MALAT1, pour lequel un « mascARN » est généré.

La triple hélice, identifiée par Wilusz *et al* en 2012, remplace fonctionnellement la queue poly(A) : elle permet de stabiliser l'ARN, d'empêcher sa dégradation. Chose surprenante, cette triple-hélice affecte également la traduction : en effet, lors d'une expérience de gène rapporteur, ces auteurs ont montré qu'en plaçant la séquence 3' de NEAT1 en aval de l'ORF de la GFP ils obtiennent une traduction similaire à une construction avec une queue poly(A). Selon les auteurs, ce type de triple-hélice pourrait être hérité d'un passé codant, servirait d'« éponge à ribosome ». Au contraire, on pourrait faire l'hypothèse que ce type de structure permettrait de promouvoir la traduction¹⁶.

Les deux isoformes de NEAT1 sont générées à partir d'une forme de mécanisme alternatif de maturation en 3'. La transcription de NEAT1_1 suit le schéma classique de polyadénylation, avec le recrutement du complexe de polyadénylation et de clivage CFIm composé de CPFS6 et de NUDT21. En revanche, hnRNPK empêche le recrutement de ce complexe permettant à l'ARN polymérase II de poursuivre sa transcription jusqu'au clivage en 3' pour générer la grande isoforme NEAT1_2. hnRNPK se lie à la zone riche en pyrimidine située en amont du site de polyadénylation et en aval du site de liaison de CFIm, et là déplace NUDT21 du complexe ce qui empêche son action²¹⁰ (Cf. [figure 11](#)).

NEAT1 est stabilisé par les protéines du paraspeckle p54^{nrb} et SFPQ. Sa demi-vie a été calculée en 2012 par une étude de la stabilité des ARN non codants à grande échelle dans des cellules de neuroblastomes (N2A). Elle est étonnamment courte –une quinzaine de minutes pour l'isoforme courte NEAT1_1, et 60 minutes pour l'isoforme longue NEAT1_2. Cela laisse penser qu'une telle caractéristique est indispensable pour la dynamique de formation des paraspeckles en réponse au stress²¹¹. D'ailleurs, l'expression de NEAT1 est déclenchée lors de stress comme l'hypoxie : Choudhry *et al* ont montré que son expression est induite grâce au facteur de transcription HIF2 en hypoxie²¹². Sa transcription est également contrôlée par un certain nombre de stimuli internes et externes, composés chimiques et pathogènes^{208,213–217}.

Expression

NEAT1_1 et NEAT1_2 s'expriment dans de nombreuses lignées de cellules, cancéreuses ou non, et dans des cellules primaires. En revanche NEAT1_2 n'est pas présent dans les cellules souches. *In vivo*, l'expression de Neat1_2 est restreinte à des tissus particuliers : des sous-populations de cellules épithéliales dans l'intestin et l'estomac, chez la souris, ce qui est surprenant vu sa forte expression dans les cellules en culture. Aussi, la formation des paraspeckles *in vivo* n'a été observée que dans les tissus où Neat1_2 s'exprime aussi bien que Neat1_1. Cela peut s'expliquer par le fait que la formation des paraspeckles est une réponse à des changements environnementaux comme la formation des fibres de stress d'actine par les cellules en culture qui ne peuvent être observées dans l'embryon *in vivo*^{218,219}. La génération de souris KO pour Neat1 n'a pas mené, dans un premier temps mené, à l'observation d'un phénotype particulier : les souris sont viables et fertiles. Les auteurs de l'étude en ont donc conclu que les paraspeckles ne sont pas indispensables à la vie. On peut tout de même supposer que Neat1 étant induit lors de stress comme l'hypoxie ou très exprimé dans les cellules cancéreuses, sa déplétion sera dommageable pour l'organisme si celui-ci doit répondre à un stress.

2.2. Les protéines du paraspeckle

Plusieurs études se sont attelées à l'identification des protéines du paraspeckle depuis la découverte de ce corps nucléaire en 2002. Après l'observation de PSPC1 et p54^{nrb}, les protéines SFPQ, RBM14, CPSF6 ont été rapidement attribuées aux paraspeckles^{205,220,221}. Puis une identification à grande échelle des composants du corps nucléaire a été réalisée en 2012 par Naganuma *et al*²¹⁰. Cette étude a mené à l'association de 32 nouvelles protéines aux paraspeckles, les PSP (*paraspeckle proteins*), grâce à une bibliothèque d'ADNc humain couplé avec une protéine fluorescente. Les protéines sont classées par ordre d'importance pour le paraspeckle et par rapport à leur lien avec NEAT1, classes définies après le traitement siARN contre les ARNm de ces protéines. La classe I regroupe les sept protéines essentielles à la formation des paraspeckles (leur déplétion engendre une baisse de plus de 70% du nombre de paraspeckles), la classe II regroupe les protéines dont l'extinction engendre une baisse de 25 à 70% du nombre de paraspeckles, et la classe III à une baisse modérée de 25%. Au sein de la catégorie I, la sous-classe A regroupe les protéines pour lesquelles l'extinction entraîne une baisse de plus de 75% de NEAT1_2, pour la sous-classe B le niveau de NEAT1 est inchangé. Dans la catégorie III, deux groupes émergent également : le groupe A pour les protéines dont l'extinction entraîne une baisse de plus de 75% de NEAT1_1, le groupe B où NEAT1_1 est maintenu. Nous avons voulu mettre en avant dans la **figure 12** les 3 classes de protéines appartenant au paraspeckle, leur fonctions décrites et le fait qu'elles sont ou non des ITAF régulant la traduction IRES-dépendante.

Les protéines de la famille des DBHS

p54^{nrb} (p54 nuclear RNA binding), SFPQ (*Splicing Factor Proline and Glutamine Rich*) et PSPC1 sont trois protéines des paraspeckles appartenant à la famille des DBHS (*Drosophila melanogaster Behavior and Human Splicing*).

SFPQ est une protéine abondante, ubiquitaire et requise pour la vie des vertébrés. Cette protéine a de nombreuses fonctions en dehors des paraspeckles : elle joue un rôle dans le cycle circadien, la pluripotence des cellules souches embryonnaires, la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, l'épissage et le transport des ARN. SFPQ et p54^{nrb} partagent une région structurale de 300 acides aminés, avec deux motifs RRM (*RNA Recognition Motif*), un domaine NOPS (NONO/paraspeckle) et une région *coiled-coil* (superhélice : assemblage d'hélices alpha, de 2 à 7 en nombre). Les zones restantes sont des régions de basse complexité et un signal de localisation nucléaire est présent en C-terminal. Les protéines de la famille DBHS sont des dimères forcés : cette dimérisation implique les domaines RRM2, NOPS et une partie de la superhélice, motif d'interaction révélé par cristallographie. SFPQ se lie également au promoteur d'ADARB2 et promeut sa transcription. Le motif coiled-coil de SFPQ n'est pas suffisant pour sa localisation aux paraspeckles, car il faut inclure les domaines de polymérisation²²².

De même, p54^{nrb} est impliquée dans un nombre aussi varié de processus, de la régulation transcriptionnelle à la régulation du cycle cellulaire. Abondante et ubiquitaire, elle peut lier à la fois l'ADN et l'ARN. p54^{nrb} interagit dans le paraspeckle avec le troisième membre de la famille des DBHS : PSPC1²²³. p54^{nrb} a également été décrit comme un facteur de transcription du gène FGF1, couplé à la traduction IRES-dépendante de son transcrit¹⁷⁴. Cette protéine est également un ITAF des IRES de C-myc, N-myc, L-myc et APAF1 (Cf [partie I](#) de la présente introduction). SFPQ, p54^{nrb} et PSPC1 partagent environ 50% de leur séquence (domaine DBHS qui comprend deux motifs RRM suivi d'un module d'interaction protéine/protéine chargé), bien que SFPQ ait un domaine N-terminal plus étendu.

PSPC1, elle, possède deux isoformes majeures, α et β . Lorsque la transcription est active, PSPC1 fait la navette constamment entre le noyau et le cytoplasme²²³. Elle est présente dans les paraspeckles et diffuse dans le nucléoplasme, mais lors de l'inhibition de la transcription, elle se relocalise au niveau du nucléole dans des structures en forme de croissant appelées coiffes périnucléolaires²⁰⁵.

Les trois protéines de la famille des DBHS sont connues pour fonctionner en hétéroduplex, deux par deux. Elles peuvent se compenser l'une l'autre : par exemple des fibroblastes embryonnaires de souris KO pour p54^{nrb} sont peu sensibles à la radioactivité, ce qui peut paraître surprenant étant donné le rôle de cette protéine dans la réparation de l'ADN. Ce phénotype s'explique par le fait que l'absence de p54^{nrb} est compensée par l'augmentation de l'expression de PSPC1 qui remplace p54^{nrb} de manière

fonctionnelle dans son duplex avec SFPQ²²⁴. Au sein des paraspeckles, p54^{nrb} et SFPQ sont des PSP de la catégorie IA c'est-à-dire essentielles à la formation des paraspeckles, et qui interagissent avec NEAT1_2 pour le stabiliser. PSPC1 quant à elle est répertoriée dans la catégorie IIIB, sa déplétion n'ayant pas d'impact sur le nombre de paraspeckles ni sur la stabilité de NEAT1_1. p54^{nrb} a la capacité de se lier directement aux inosines et entrainer la rétention des transcrits édités dans le noyau au sein du paraspeckle^{225,226}. De plus son interaction directe avec NEAT1_2 se fait par trois domaines, situés sur l'ARN non-codant : PIR-1, 2 et 3. PIR-1 est situé en 5' de NEAT1_1 tandis que les deux autres se situent en 3' de NEAT1_1, des domaines potentiels situés sur NEAT1_2 exclusivement n'ayant pas été étudiés par les auteurs de cette publication²²⁷.

Les autres protéines essentielles du paraspeckles

RBM14 (RNA binding protein 14) et hnRNPK sont les troisième et quatrième protéines essentielles à la formation des paraspeckles de la catégorie IA. Leur suppression mène à la destruction des paraspeckles et à la déstabilisation de NEAT1_2. RBM14 (aussi connue sous le nom de PSP2) tout comme p54^{nrb} et SFPQ, se lient à NEAT1_2 pour le stabiliser. Elle est impliquée dans d'autres processus. Elle est notamment un régulateur d'épissage et interagit avec un proto-oncogène²²⁸. hnRNPK quant à elle est impliquée dans la génération du 3' alternatif de NEAT1_2 par le mécanisme décrit dans le paragraphe concernant NEAT1²¹⁰. Cette protéine se trouve également dans de nombreux processus : régulation de l'expression des gènes, épissage alternatif, stabilité des ARN et régulation de la traduction en tant qu'ITAF.

La catégorie IB regroupe quatre protéines : FUS, DAZAP1, hnRNPH3, et le complexe SWI/SNF. FUS (*Fused In Sarcoma*) est une protéine de la famille FET. Elle contient un RRM, un domaine à doigt de zinc et un PLD (*Prion-Like Domain*) permettant l'agrégation des protéines. C'est le cas dans les leucémies ou les sarcomes comme indique son nom. Elle a plusieurs rôles, comprenant le transport des ARN, et est un ITAF. DAZAP1 (*Deleted in Azoospermia-Associated Protein 1*) régule l'épissage et la traduction et est requise pour le développement. Sa localisation est modulée en fonction de signaux extérieurs et durant la spermatogenèse. hnRNPH3 est un facteur d'épissage et est impliqué dans l'arrêt de l'épissage en réponse à un choc thermique, lorsqu'il quitte le complexe hnRNP²²⁸. Enfin le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (pour *SWItch sucrose Non Fermentable*) interagit avec plusieurs protéines de la catégorie I ainsi qu'avec NEAT1. Le complexe fonctionne ici de façon indépendante de son activité de remodelage de la chromatine, il est supposé qu'il permet l'intégration de protéines au sein du paraspeckle²²⁸⁻²³⁰.

Nom	Classe	Rôle dans la physiologie cellulaire et pathologie	ITAF
hnRNPK	IA	régulation de la transcription, régulation de la traduction, stabilité des ARN, épissage	oui
p54 ^{nrb} /NONO	IA	cycle circadien, réparation de l'ADN, régulation de la transcription, régulation de la traduction	oui
RBM14	IA	épissage, régulation de la transcription, régulation de la biogenèse du centriole, immunité inée	
SFPQ/PSF	IA	cycle circadien, pluripotence, réparation de l'ADN, régulation de la transcription, épissage, transport des ARN, régulation de la traduction	oui
DAZAP1	IB	régulation de la traduction, épissage, développement,	
FUS	IB	transport des ARN, agrégation des protéines, régulation de la traduction	oui
hnRNPH3	IB	épissage	
SWI/SNF	IB	remodelage de la chromatine	
CPSF7	II	maturation 3' de l'ARN	
FAM113A	II	liaison à l'ARN	
FAM98A	II	activité méthyltransférase, liaison à l'ARN	
FIGN	II	dépolymérisation des microtubules, cycle cellulaire	
FUSP11/SRSF10	II	épissage	
hnRNPA1	II	régulation de la traduction, navette noyau-cytoplasme	oui
hnRNPR	II	régulation de la transcription, régulation de la traduction	oui
hnRNPUL1	II	régulation de la transcription	
RBM12	II	liaison à l'ARN	
TDP-43	II	régulation de l'utilisation des sites de polyadénylation alternatifs, développement	
CPSF6	IIIA	complexe de polyadénylation Cflm, stabilité de Neat1_1	
NUDT21	IIIA	complexe de polyadénylation Cflm, stabilité de Neat1_1	
UBAP2L	IIIA	dégradation des protéines, stabilité de Neat1_1	
CIRBP	IIIB	cycle circadien, réponse au stress	
PSPC1	IIIB	Réparation de l'ADN, navette noyau/cytoplasme, cycle circadien, régulation de la transcription, réponse immunité inée	
RBM3	IIIB	cycle circadien, réponse au stress	
RBM4B	IIIB	cycle circadien	
RBM7	IIIB	dégradation des ARN	
RBMX	IIIB	régulation de la transcription, épissage, suppresseur de tumeur	
RUNX3	IIIB	régulation de la transcription	
ZNF335	IIIB	régulation de la transcription, développement	

Nom	Classe	Rôle dans la physiologie cellulaire et pathologie	ITAF
hnRNPA1L2	n/d	transport des ARN, navette noyau-cytoplasme, assemblage des RNP	
hnRNPH1	n/d	épissage	
hnRNPM	n/d	régulation de la transcription, régulation de la traduction	oui
hnRNPF	n/d	épissage	
MEX3C	n/d	dégradation de l'ARN, ubiquitine ligase	
SS18L1	n/d	organisation de la chromatine, régulation de la transcription	
DLX3	n/d	régulation de la transcription, développement	
CELF6	n/d	épissage	
EWSR1		régulation de la transcription	
TAF15		régulation de la transcription	

Figure 12. Liste des protéines du paraspeckle. En fonction de leur classe, avec leur fonction et la mention de leur éventuel rôle d'ITAF

Protéines de classe II

La classe II regroupe plusieurs hnRNP (hnRNPA1, R, UL1), CPSF7, FAM98A, FAM113A, FIGN, RBM12, FUSP11 et TDP-43. Les hnRNP sont des protéines possédant entre deux et trois domaines de liaison à l'ARN. hnRNPA1 fait partie des ITAF capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. HNRNPR est impliquée dans la réinitiation de l'expression du gène c-fos en coopération avec le complexe Mediator et est aussi un ITAF ; hnRNPUL1 est impliquée dans la répression transcriptionnelle des gènes dépendant de la réplication des histones. CPSF7 participe à la maturation 3' des ARN, et les protéines FAM se lient à l'ARN, mais sont peu décrites. TDP-43, codée par le gène TARDBP responsable de la sclérose latérale amyotrophique, est impliquée dans le développement en régulant l'utilisation des sites de polyadénylation alternatifs. Lorsqu'elle est active au cours du développement, TDP-43 promeut l'utilisation du site de polyadénylation de Neat1 et donc la génération de sa petite isoforme Neat1_1. En revanche lors de la différenciation cellulaire, elle est séquestrée et cela entraîne la production de l'isoforme Neat1_2 et la formation subséquente des paraspeckles.

Protéines de classe III

La classe III rassemble un plus grand nombre de protéines. La catégorie IA regroupe trois protéines, CPSF6, NUDT21 et UBAP2L. CPSF6 avec NUDT21 forment le complexe de polyadénylation CFIm. UBAP2L est impliquée dans la voie de l'ubiquitine protéasome, elle s'agrège en présence d'un inhibiteur du protéasome. Elle permet aussi de lier l'ARN. Ces trois PSP sont responsables de la

formation et stabilité de NEAT1_1. Leur suppression entraîne une diminution de l'expression de cette petite isoforme²²⁸.

Les PSP de la catégorie IB n'ont pas d'impact sur l'expression de NEAT1_1. A commencer par PSPC1, la troisième protéine de la famille des DBHS qui contrairement aux deux autres n'est pas essentielle pour la formation des paraspeckles. En revanche il s'agit d'un marqueur du corps nucléaire, un des plus souvent utilisé avec p54^{nrb}. Plusieurs RBM font parties de cette catégorie (RBM3, 4B, 7, X), RBM3 étant un régulateur du cycle circadien avec CIRBP et ces protéines étant induites lors de stress comme l'hypoxie ou le choc thermique. EWSR1 (*Ewing sarcoma RNA-binding protein 1*) a la capacité de lier l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription, aussi elle est probablement impliquée dans la régulation de la transcription. TAF15 s'associe avec des complexes TFIID et le snARN U1, et RUNX3 et ZNF335 sont des facteurs de transcription impliqués dans la carcinogénèse et plusieurs maladies génétiques. Enfin, quelques PSP identifiées en 2012 n'ont pas été classées dans une des catégories devant le manque de cohérence des résultats. Il s'agit de quatre hnRNP (AL1, F, H1, M), et des protéines MEX3C, SS18L1, DLX3 et CELF6, toutes facteurs de transcription ou protéines se liant à l'ARN, et régulant la transcription de FGF1 et sa traduction en tant qu'ITAF dans le cas de hnRNPM¹⁷⁴. En tout, le paraspeckle regroupe en son sein une cinquantaine de protéines ayant toutes un lien avec la régulation de l'expression des gènes, de façon directe ou indirecte²²⁸.

3. Structure et formation des paraspeckles

3.1. Structure du paraspeckle : « core, shell, patch »

Le paraspeckle est un corps nucléaire admirablement structuré et agencé. Sa taille est de 360 nm en moyenne, bien que plus petit dans les cellules murines. Il s'organise autour du long ARN non codant NEAT1_2, dont les extrémités 5' et 3' se retrouvent vers « l'enveloppe » extérieure. L'ARN est replié en épingle, le centre de l'ARN se retrouvant au cœur du paraspeckle. Les « fagots » de NEAT1_2 sont orientés de façon radiale de sorte à former une sphère (Cf. **figure 13**). La répartition des PSP se fait par groupes : un groupe dans le « core » ou cœur, un deuxième, le « shell » à la surface et un troisième groupe de « patch », petit foci dispersés. Dans le « core », SFPQ, p54^{nrb}, FUS

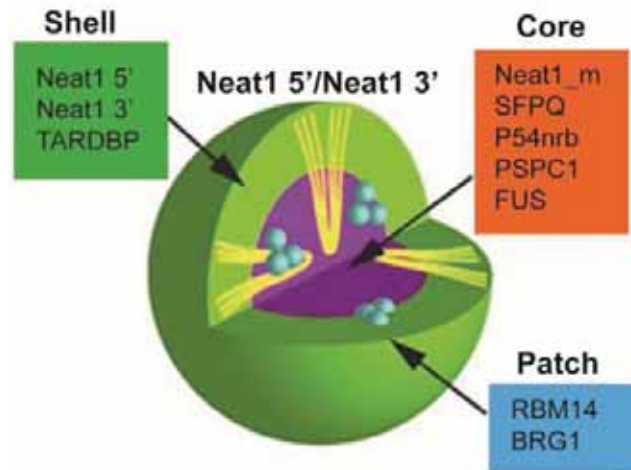


Figure 13. Structure tridimensionnelle du paraspeckle. Adapté de West, J. A. *et al.* Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J. Cell Biol.* 214, 817–830 (2016). Neat1_m: sonde ciblant le milieu de Neat1, et Neat1 5' et 3' ses extrémités.

et aussi PSPC1 ; dans le « shell », les extrémités de Neat1 et TDP-43 ; dans le « patch », Brg1 (SIW/SNF) et RBM14. Plus il y a de transcription de Neat1_2 et plus la taille et le nombre de paraspeckles augmente²³¹.

3.2. Domaines structuraux de Neat1

Les domaines présents dans NEAT1_2 sont primordiaux pour l'assemblage du paraspeckle et la stabilité de l'ARN. Les domaines A, en 5' et en 3' (Cf. [figure 14](#)), permettent d'empêcher sa dégradation : le rôle de la triple hélice en 3' a été prouvé de façon expérimentale¹⁶. Le domaine en 5', lorsqu'il est supprimé, diminue considérablement la demi-vie de l'ARN²³². Cependant, p54^{nrb} et SFPQ doivent procéder à la stabilisation de NEAT1_2 sans passer par le domaine A qui est commun en 5' pour les deux isoformes de NEAT1 : en effet les deux protéines n'ont aucun impact sur la stabilité de NEAT1_1²³³. Le domaine B de NEAT1_2 permet de promouvoir le changement d'isoformes en

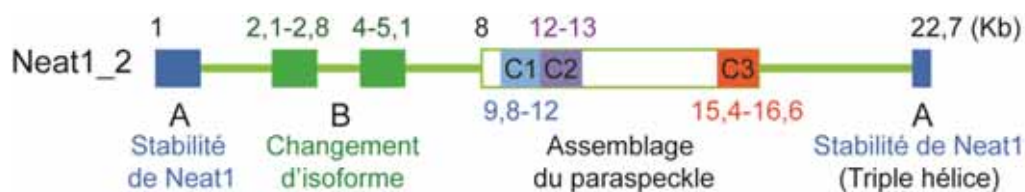


Figure 14. Les domaines structuraux de Neat1. Adapté de Hirose, T., Yamazaki, T. & Nakagawa, S. Molecular anatomy of the architectural Neat1 noncoding RNA: The domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 10, e1545 (2019).

inhibant la polyadénylation de NEAT1_1. Le domaine C quant à lui (entre 8 et 16,6 kb) est suffisant pour permettre l'assemblage des paraspeckles. La délétion de ce domaine empêche la formation du corps nucléaire. Le domaine C contient de plus trois sous-domaines (C1 : 9,8-12 kb, C2 : 12-13 kb et C3 : 15,4-16,6 kb). C1 et C2 fonctionnent indépendamment de C3. La suppression de C1 et C2 ou de C3 seul mène à la disparition des paraspeckles. Ces sous-domaines sont remplis de répétitions LINE1 d'une grande importance pour l'assemblage des paraspeckles. Leur rôle est de recruter les PSP essentielles, p54^{nrb} et SFPQ²³².

3.3. Formation : la séparation de phase liquide-liquide

La formation des paraspeckles se déroule en deux temps : au départ, un complexe RNP (ribonucléoprotéique) avec NEAT1_2 va s'assembler (a), puis l'agrégation d'une cinquantaine de ces complexes va former le paraspeckle, en association avec la synthèse de NEAT1_2 (b).

- (a) Dès la transcription de NEAT1_2, p54^{nrb} et SFPQ vont se lier à et stabiliser l'ARN qui attend en cluster autour de sa zone de transcription ; l'ensemble forme ainsi le RNP minimal. SFPQ et p54^{nrb} présentent aussi la capacité de former une structure « *paraspeckle-like* » autour d'oligonucléotides anti-sens transfectés dans des cellules déplétées pour NEAT1²³⁴. SFPQ et p54^{nrb} forment un hétérodimère grâce à leur domaine NOPS, et engagent la polymérisation par leur domaine *coiled-coil*.
- (b) Les SNP sont assemblées grâce à l'aide des PSP FUS, RBM14 et SWI/SNF ou Brg1. Ces protéines ont la capacité d'effectuer une séparation de phase liquide-liquide (LLPS) tout comme les granules de stress dans le cytoplasme. RBM14 et FUS possèdent un domaine *prion-like* qui leur confère la capacité de former rapidement des fibrilles. Ce domaine est primordial pour la deuxième phase d'assemblage des paraspeckles^{230,235}.

II. Paraspeckle et réponse au stress

1. Le paraspeckle et la régulation de l'expression génique

1.1. Rétention d'ARNm édités ou non

La première fonction décrite est la rétention dans le noyau des ARN édités d'adénosine en inosine. Avant même la découverte de Neat1 en tant que squelette des paraspeckles, l'ARN CTN a été découvert comme étant retenu dans le noyau dans un corps nucléaire. En cas de stress, le 3' édité de CTN est clivé et l'ARNm est exporté rapidement dans le cytoplasme pour être traduit²²⁰. Cependant

une étude plus récente montre que lorsque les paraspeckles sont supprimés, l'ARN CTN est tout de même retenu dans le noyau en interaction avec p54^{nrb} au sein de foci nucléaires. Sachant que l'ARN est partiellement colocalisé avec Neat1, les auteurs en ont conclu que le paraspeckle modulait en partie sa localisation intranucléaire²³⁶. Dans une autre étude de 2009, Chen et Carmichael ont découvert que de nombreux transcrits sont édités dans les cellules souches embryonnaires, mais ne sont pas retenus dans les noyaux : de fait les PSP sont bien exprimées mais il n'y a pas de paraspeckle car Neat1_2 est induit uniquement lors de la différenciation des cellules ; à ce moment-là les paraspeckles sont formés et capables de séquestrer les ARN édités²²⁶. CARM1 (*co-activator associated arginine methyltransferase*) est capable de méthyliser p54^{nrb} sur son domaine *coiled-coil* ce qui atténue sa liaison aux ARN édités d'A en I tels que les IRAlu, ARN aux séquences répétées inversées en 3'. De plus CARM1 empêche la transcription de Neat1 et la formation subséquente des paraspeckles. *In fine* il prévient la rétention de ce groupe de transcrits dans le noyau²³⁷. Une étude récente a également montré un lien entre la mitochondrie et les paraspeckles : la déplétion de protéines ribosomiques entraîne une expression aberrante de Neat1 et un changement de morphologie des paraspeckles. Ce stress augmente la rétention d'ARNm codant des protéines mitochondriales dans les paraspeckles. Ces différentes observations ont conduit les auteurs à affirmer que le paraspeckle est primordial pour l'homéostasie de la mitochondrie. On voit donc là un autre impact de la rétention d'ARNm dans le noyau par le paraspeckle²³⁸.

1.2. Rétention de facteurs de transcription

La deuxième fonction décrite pour le paraspeckle est la rétention de RBP : les PSP clés sont déplétées de plus de 50% du nucléoplasme lors de la stimulation du paraspeckle²¹⁶, notamment SFPQ, responsable de la transcription de l'enzyme d'édition ADAR2. Lorsque le paraspeckle est détruit, SFPQ est exportée vers le cytoplasme et la transcription de son ARN cible augmente près de cinq fois. A l'inverse, lors d'une infection virale par le virus de l'influenza ou le virus *herpes simplex*, ou lors de la stimulation de la voie des récepteurs Toll-like 3 (TLR3) par des ARN double-brin (poly I:C), l'expression de Neat1 est induite et cela conduit à la formation des paraspeckles et à la séquestration de SFPQ. La protéine SFPQ est un répresseur de la transcription du gène de l'interleukine 8 (IL8), donc si elle est séquestrée loin du promoteur du gène IL8 elle ne pourra pas empêcher sa transcription. Ainsi, Neat1 et le paraspeckle régulent la réponse à une infection virale en retenant un important régulateur de gène de réponse antiviral du système immunitaire²³⁹. Bien que le paraspeckle rassemble de nombreuses protéines, toutes ne sont pas localisées exclusivement dans ce corps nucléaire, mais peuvent être diffuses dans le nucléoplasme ou dans d'autres structures nucléaires. Une autre conséquence de la « rétention » des protéines est la régulation de la traduction. Dans un contexte

d'inhibition de la polymérase I, un stress nucléolaire est induit, or la déplétion de Neat1 à ce moment-là conduit à la libération de SFPQ et p54^{nrb}, deux ITAF de l'IRES de c-myc, et à une interaction accrue de ces protéines avec l'ARNm de c-myc. Les auteurs en concluent que la déplétion de Neat1 facilite la traduction de c-myc en relâchant les ITAFs responsables de sa traduction²⁴⁰.

2. Rôles du paraspeckle lors de processus physiologiques

2.1. Rôle lors de la mitose

Lors de la mitose, les paraspeckles persistent pendant l'interphase, la prophase, la métaphase et l'anaphase (Cf. **figure 15A**). Ils ne sont pas associés à la chromatine dense. Après la télophase, les marqueurs des paraspeckles réapparaissent dans des foci périnucléolaires (0-20 minutes) qui diffusent dans le nucléoplasme (20-60 minutes), et finalement les premiers paraspeckles apparaissent après 60 à 90 minutes²²³. Lors de la mitose, p54^{nrb} est phosphorylée par CDK1 modification qui n'abolit pas sa liaison avec Neat1 mais empêche son interaction avec les séquences ARN riches en A, C ou U. Aussi, la modification post-traductionnelle de p54^{nrb} module son activité de liaison à l'ARN de façon sélective durant la mitose²⁴¹.

2.2. Rôle dans le cycle circadien

Les trois protéines DBHS sont impliquées dans le cycle circadien en tant que facteurs de transcription. En fonction du contexte, elles peuvent activer ou réprimer des gènes impliqués dans le cycle circadien comme Rev-Erba pour p54^{nrb}²⁴² (Cf. **figure 15B**). Dans les cellules de la glande pituitaire, ou hypophyse, p54^{nrb}, SFPQ, PSPC1 ainsi que RBM14 ont une expression rythmique, de même que Neat1. Aussi le nombre de paraspeckle suit cette évolution rythmique, ainsi que l'interaction de ces protéines avec Neat1. De plus les élément IRAlu (*Inverted Repeat of Alu sequence*) c'est-à-dire les ARNm contenant des séquences Alu répétées inversées dans leur 3'UTR sont retenus de façon rythmique dans le paraspeckle²⁴³.

2.3. Rôle lors du développement embryonnaire

Comme indiqué plus haut, le premier KO de Neat1 chez la souris n'a pas révélé de phénotype particulier²¹⁹. Pourtant depuis cette étude de 2011, les modèles de souris ont montré que l'implication de Neat1 et des paraspeckles est bien réelle dans le développement. Au cours du développement, la méthyltransférase CARM1 exerce son activité sur l'histone H3R26 pour moduler l'établissement des

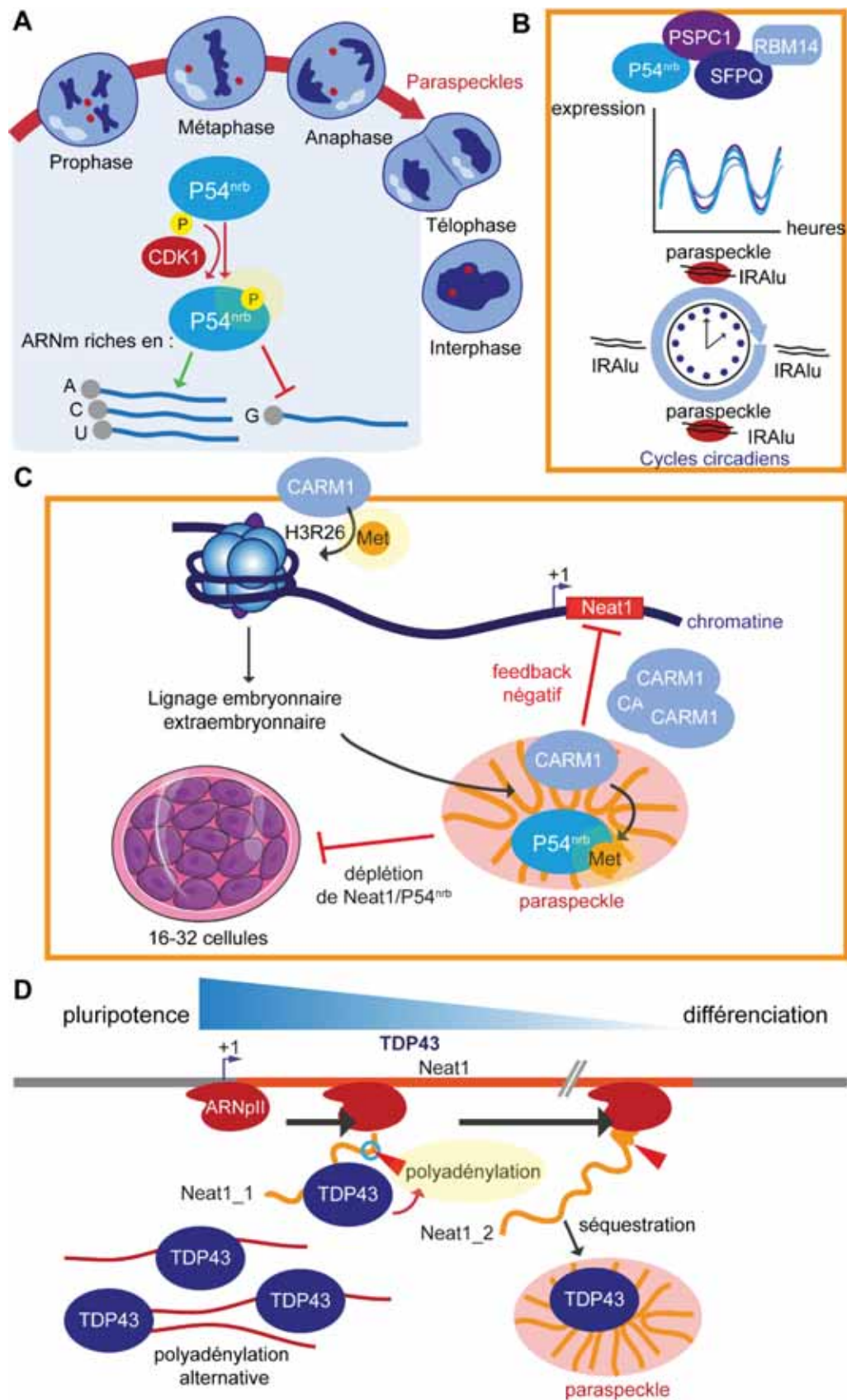


Figure 15. Rôle de Neat1 et du paraspeckle lors de différents processus physiologiques. A : rôle lors de la mitose ; B : rôle lors du cycle circadien ; C : rôle lors de la différenciation précoce au stade 16-32 cellules ; D : rôle dans la transition entre pluripotence et différenciation.

lignages embryonnaires et extra-embryonnaires (Cf. [figure 15C](#)). CARM1 se localise dans les paraspeckles à ce stade *via* une interaction avec Neat1 et p54^{nrb}. Elle méthyle la p54^{nrb} et sa déplétion entraîne une redistribution de p54^{nrb} : elle est donc nécessaire pour l'organisation des paraspeckles. Un haut niveau de CARM1 réprime la formation des paraspeckles par inhibition de la transcription de Neat1. CARM1 recrutée dans les paraspeckles génère donc une boucle de rétroaction négative pour la formation des paraspeckles. De plus une déplétion de Neat1 ou de p54^{nrb} au stade 2 cellules entraîne un arrêt de la division cellulaire précoce entre les stades 16 et 32 cellules²⁴⁴.

Neat1 est aussi impliqué dans la différenciation musculaire. L'étude originelle de la formation alternative de Neat1_2 nous montre que l'expression de cette isoforme est induite lorsque les myoblastes se différencient en myotubes. Le locus de Neat1 est notamment actif lors du développement musculaire des bovins^{208,245}. Dans le contexte de spécialisation cellulaire, l'interaction entre le paraspeckle et TDP-43 promeut également la transition entre pluripotence et différenciation. En effet l'expression de TDP-43 décroît au cours de la différenciation précoce ce qui résulte en une régulation de la polyadénylation alternative pour des centaines de gènes incluant Neat1, conduisant à la synthèse de Neat1_2 et la formation des paraspeckles (Cf. [figure 15D](#)). TDP-43 est alors recruté dans les paraspeckles, loin de ses cibles ARNm. L'induction de Neat1_2 étant primordiale pour la différenciation précoce des cellules souches embryonnaires et la séquence embryonnaire durant la gastrulation, le recrutement de TDP-43 dans le paraspeckle est un nouvel exemple de l'importante implication du corps nucléaire et de ses protéines associées durant le développement²⁴⁶. Finalement, Neat1 est aussi impliqué dans la différenciation des cellules Th2 (T helper cell), marquées CD4+ *via* la voie EZH2/ITCH/STAT6²⁴⁷.

2.4. Rôle dans la reproduction

Neat1 et le paraspeckle ont une implication toute particulière dans la reproduction et la fertilité. Dans les cellules épithéliales luminales, le paraspeckle se forme durant le développement de la glande mammaire. Sa déplétion conduit à un manque de prolifération des cellules durant le développement lobulo-alvéolaire ce qui entraîne un défaut de morphologie de la glande mammaire et de lactation. Neat1 est de plus responsable de la formation du corps lutéal lors de la grossesse. Des souris KO pour Neat1 présentent une impossibilité à devenir gestante malgré une ovulation normale, ce qui provient d'un défaut de formation du corps lutéal responsable de la production de la progestérone. Cependant, ce phénotype n'est pas observé chez toutes les souris : les auteurs font l'hypothèse qu'une condition environnementale particulière semble être requise durant laquelle Neat1_2 devient essentiel²⁴⁸. Neat1 et les PSP apparaissent également dans certaines populations cellulaires lors de la spermatogenèse, ce qui suggère que le paraspeckle serait impliqué dans ce processus physiologique²⁴⁹.

3. Rôle du paraspeckle lors de pathologies

Bien que Neat1 et le paraspeckle aient une fonction dans de nombreux processus physiologiques, on peut également parler du paraspeckle en tant que marqueur de stress.

3.1. Rôle dans l'infection virale

L'expression de Neat1 est induite lorsque les souris sont infectées par le virus de l'encéphalite japonaise ou le virus de la rage. De plus de nombreuses protéines impliquées dans la réplication du virus du VIH-1, comme p54^{nrb}, SFPQ et MATRIN1, sont localisées dans les paraspeckles. Neat1 est également induit lors de l'infection par le VIH-1 : l'extinction de ce long ARN non codant entraîne une augmentation de la réplication virale grâce à l'augmentation de l'export nucléocytoplasmique de l'ARN du virus^{250,251}. Le virus *herpes simplex* (HSV) est lui aussi inducteur de l'expression de Neat1 et de la formation des paraspeckles : les PSP peuvent s'associer avec le génome du virus et avec le facteur de transcription STAT3 qui, recruté au niveau du promoteur viral, induit l'expression des gènes viraux et la réplication du HSV²⁵², engendrant une réplication virale accrue. Enfin, Neat1 est aussi induit lors de l'infection par le hantavirus et joue dans ce cas un rôle inhibiteur de l'infection virale. En effet, la séquestration de SFPQ dans le paraspeckle permet la synthèse de facteurs ayant un effet synergique sur la production d'interféron : Neat1 module la réponse immune à l'infection virale^{253,254}. On peut donc conclure que Neat1 et le paraspeckle ont un rôle pro- ou antiviral selon la situation (Cf. [figure 16A](#)).

3.2. Rôle dans les infections neurologiques

Plusieurs études montrent une implication de Neat1 et du paraspeckle dans les maladies neurodégénératives. Neat1 est induit dans la maladie de Huntington comme observé par microarray ; des cellules neuronales soumises à un stress à l'H₂O₂ transfectées par la petite isoforme de Neat1 présentent une plus grande viabilité en réponse au stress oxydatif. Cependant cette fonction est indépendante du paraspeckle car Neat1_1 n'induit pas leur formation. De plus un effet inverse a été mis en évidence : l'extinction de Neat1 entraîne une baisse significative des agrégats formés par la protéine mutante huntingtine²⁵⁵. La sclérose multiple (SM) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) sont des maladies inflammatoires du système nerveux central et neurones moteurs, respectivement, or Neat1 est induit dans ces deux pathologies. Dans la SM, Neat1 stimule potentiellement IL-8, et dans la SLA, les auteurs décrivent l'interaction de Neat1 avec deux protéines, TDP-43 et FUS, mutées dans cette pathologie^{256,257}.

Neat1 est aussi impliqué dans la maladie de Parkinson. Dans un modèle murin de Parkinson induit, l'extinction de Neat1 entraîne une baisse de l'autophagie et des « dégâts » neuronaux, liées à une hausse de la viabilité cellulaire et à une baisse de l'apoptose^{258,259}.

3.3. Rôle dans les pathologies vasculaires et inflammatoires

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire. Les lipoprotéines de basse-densité oxydées (oxLDL) induisant l'inflammation et l'absorption des liquides contribuent au développement de cette pathologie. Huang-Fu *et al* ont montré que Neat1_2 est induit lors de ce stress et forme des paraspeckles qui séquestrent l'ARNm CD36 et participent à la phosphorylation de P65 (le facteur de transcription plus connu sous le nom NF- κ B) : ces deux facteurs sont importants pour l'inflammation et l'absorption de liquides²⁶⁰. Une autre étude a montré l'implication de Neat1, en dehors des paraspeckles, dans l'inflammation. Ainsi, Neat1 promeut l'assemblage de l'inflammasome en modulant NLRC4, AIM2, NLRP3, et stabilise le tétramère Caspase 1 tout en augmentant son activité protéase. Curieusement, le paraspeckle est détruit en réponse au stress inflammatoire et Neat1 libéré est exporté vers le cytoplasme pour avoir son action d'induction de l'inflammasome. L'isoforme exportée est probablement Neat1_1, car la quantité de Neat1_2 dans le noyau est inchangée alors que celle de Neat1 (la somme des deux isoformes) varie²⁶¹. Cette réponse de Neat1 est due également à son induction en hypoxie sous contrôle de HIF2 α . Lors de dommages vasculaires, les cellules musculaires lisses passent d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif. Neat1 est induit en réponse à cette transition phénotypique et séquestre le modificateur de chromatine WDR5. Il en résulte un état épigénétique "éteint" pour les gènes relatifs à la contractilité des cellules des muscles lisses²⁶². Enfin, très récemment, une étude de Kenneweg *et al* a montré que lors de l'ischémie cardiaque *in vitro* et *in vivo*, Neat1 est induit par l'hypoxie et sécrété par les cardiomyocytes dans des vésicules absorbées par les fibroblastes où il promeut l'expression de gènes profibrotiques. De plus, Neat1 est indispensable à la survie et la prolifération des cardiomyocytes et des fibroblastes. Ils ont également démontré que Neat1 est tout de même présent en normoxie dans les cardiomyocytes : son expression est induite par le suppresseur de tumeur P53²⁶³. Neat1 est donc un important régulateur et une cible thérapeutique potentielle dans les maladies vasculaires occlusives transitoires (Cf. **figure 16B**).

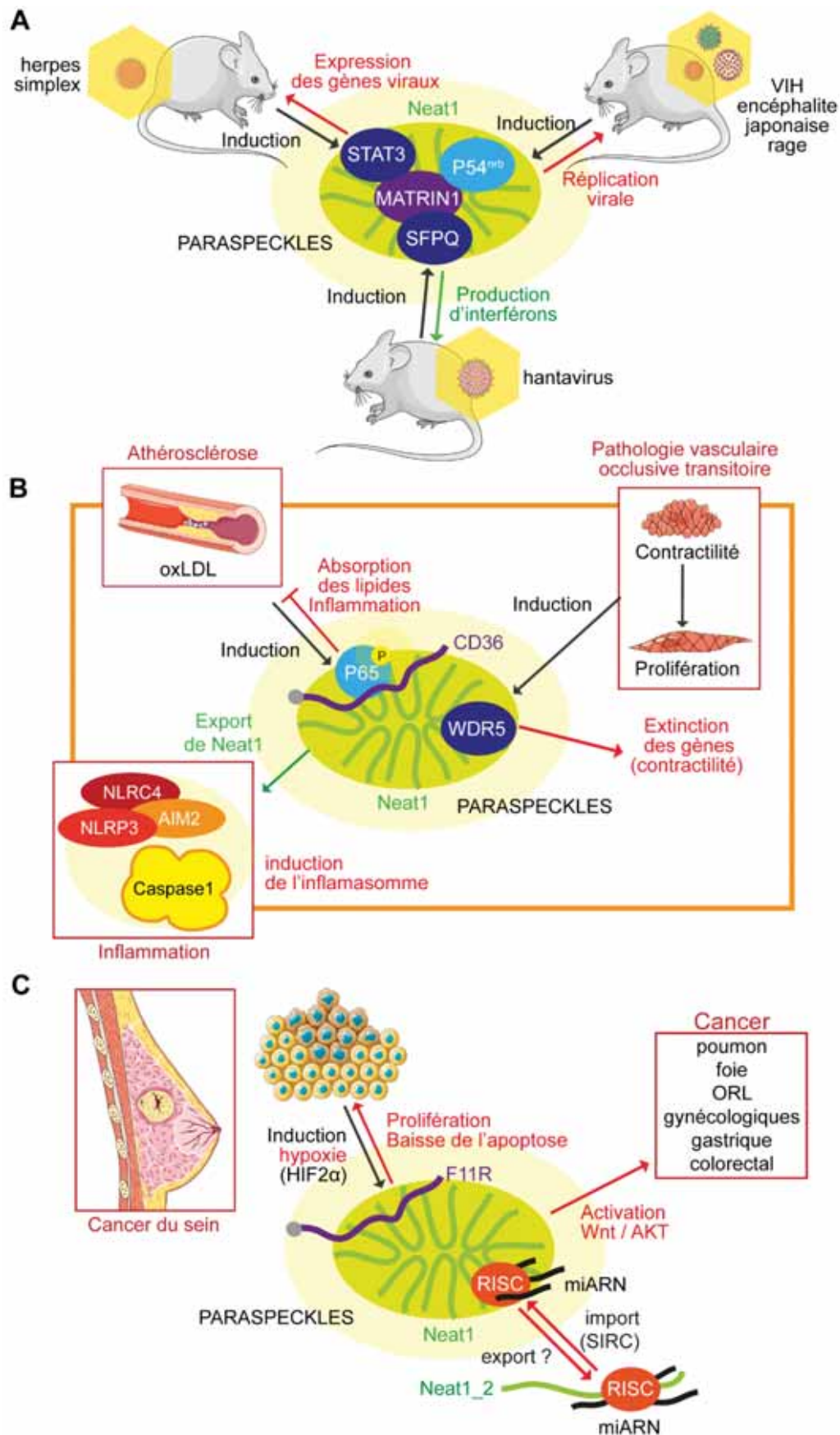


Figure 16. Rôle de Neat1 et du paraspeckle dans les pathologies. A : rôle lors de l'infection virale ; B : rôle dans les pathologies vasculaires et inflammatoires ; C : rôle dans le cancer.

3.4. Rôle dans le cancer

Le plus grand nombre d'études du rôle de Neat1 a été réalisé dans le cadre du cancer. Une première étude NEAT1a été réalisée par Choudhry *et al.* Ces auteurs ont montré que Neat1 est induit en réponse à l'hypoxie dans des cellules de cancer du sein ainsi que dans des tumeurs solides, et que cette induction passe par le facteur HIF2 α plutôt que par HIF1 α . Les deux isoformes de HIF ont la capacité de se fixer à l'élément HRE du promoteur de Neat1, mais la sélectivité transcriptionnelle se fait en aval : Neat1 est sensible à la seule extinction de HIF2. L'induction de Neat1 en hypoxie mène à l'assemblage des paraspeckles dans ces cellules cancéreuses mais aussi à la rétention de l'ARN F11R. De plus, Neat1 favorise la prolifération des cellules tumorales et réduit l'apoptose des cellules hypoxiques. Enfin, ces auteurs ont montré que les patients atteints du cancer du sein ayant une plus grande expression de Neat1 ont de plus faibles chances de survie²¹². De nombreuses études ont ensuite été effectuées dans différents types de cancer. Neat1 peut jouer le rôle d'oncogène tout comme celui de suppresseur de tumeur selon le contexte. Globalement l'expression de Neat1 est augmentée dans la plupart des cancer hormis les leucémies et myélomes multiples. On le retrouve notamment dans le cancer du poumon, du sein, du foie, les cancers ORL et gynécologiques (endomètre, ovaires, cervical), gastrique et colorectal. Neat1 y agit par plusieurs biais : en activant par exemple la voie Wnt et la voie AKT. Neat1 jouerait aussi le rôle d'éponge à microARN : le long ARN non codant séquestrerait des miARN suppresseurs de tumeurs qui ne pourraient plus réguler leur cible ARNm. Ce mode d'action pose question, du fait que les miARN sont maturés et pris en charge par le complexe RISC dans le cytoplasme, alors que Neat1_2 est strictement nucléaire. Neat1_2 pourrait être exporté dans le cytoplasme comme c'est le cas de certains ARN non codants en réponse au stress, ou alors les miARN seraient importés dans le noyau suite au stress -via la machinerie SIRC, pour *Stress-Induced Response Complex*^{264,265} (Cf. **figure 16C**). La transcription des miARN peut aussi être régulée par Neat1 par un changement de la méthylation au niveau de leurs promoteurs, comme cela a été démontré pour miR-129²⁶⁶⁻²⁶⁸. L'expression de Neat1 et la formation des paraspeckles sont induits par le suppresseur de tumeur P53, alias le "gardien du génome", *in cellulo* et *in vivo*. De plus, Neat1 promeut l'installation et le développement de tumeurs de la peau, prévient l'accumulation de dommages à l'ADN et sa déplétion conduit à un stress réplicatif. Les auteurs de l'étude ont également constaté que le fait de cibler Neat1 rend les cellules davantage sensibles aux chimiothérapies. Il apparaît aussi que Neat1_2 est un bon marqueur de prédiction de la réponse du cancer des ovaires au traitement chimiothérapique au platine²¹⁵.

Introduction - Partie III : L'hypoxie dans les pathologies ischémiques et le cancer

I. L'hypoxie

L'hypoxie ou manque d'oxygène est un des stress majeur de notre organisme. Les zones hypoxiques sont situées dans les tissus ou organes peu vascularisés tels que les vaisseaux lymphatiques, durant l'embryogenèse, et lors de pathologies comme l'ischémie cardiaque et le cancer.

1. Hypoxie et ischémie cardiaque

1.1. Incidence de l'ischémie cardiaque et processus de réparation

Les cardiomyopathies peuvent être héritées ou acquises au cours de la vie. Le cœur est affecté et ne peut plus efficacement pomper le sang à travers l'organisme. Le taux d'oxygène sanguin décroît, et des zones de tissus peuvent se retrouver en hypoxémie, voir en hypoxie. L'anoxie est le troisième stade, l'absence d'oxygène, qui conduit à la mort de l'individu si rien n'est entrepris pour résoudre l'état de bradycardie ou d'arrêt du cœur. L'ischémie cardiaque est la forme la plus courante de cardiomyopathie en occident¹⁶⁰ ; elle résulte majoritairement de l'occlusion d'une branche d'artère coronaire suite à une athérosclérose. La plaque d'athérome se forme dans l'intima d'une artère suite à l'accumulation de lipides, glucides, sang, minéraux. Cette obstruction entraîne parfois un accident vasculaire ischémique, ou la plaque d'athérome peut se rompre; en découle l'occlusion de l'artère en question. L'ischémie est la diminution d'apport sanguin d'une artère à un organe, qui entraîne l'hypoxie et une augmentation des molécules issues du métabolisme anaérobie ne pouvant être éliminées. Cette état entraîne l'apoptose et la nécrose des cellules, puis une deuxième phase appelée phase inflammatoire va se mettre en place pour l'infiltration des cellules immunes sur le terrain nécrosé. Les monocytes, neutrophiles et lymphocytes migrent au niveau du tissu nécrotique pour enlever les cellules mortes par phagocytose et dégradation de la matrice extracellulaire. La troisième phase est celle du remodelage et de la régénération. Durant cette phase complexe, la zone lésée sera réparée par la formation d'un tissu cicatriciel ou zone de fibrose pour combler les cellules perdues par nécrose, après migration et différenciation des myoblastes et dépôt de matrice extracellulaire²⁶⁹. La revascularisation va permettre l'apport de sang dans la zone ischémique, par façonnage de nouveaux vaisseaux (c'est le processus de vasculogenèse) et d'extension de vaisseaux à partir de ceux préexistant (angiogenèse), complété par les mécanismes d'artériogenèse et de croissance collatérale. Cet ensemble de processus mène à l'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel dans la zone lésée ce qui prévient localement de la destruction massive de tissus²⁶⁹.

Le système lymphatique cardiaque est également d'une importance cruciale pour la résolution de l'ischémie. Le transport lymphatique augmente alors pour limiter l'œdème qui résulte de l'hyperperméabilité vasculaire : il charrie les déchets résultant de la nécrose et les métabolites. Notre équipe a démontré que le processus de lymphangiogenèse débute deux semaines après l'infarctus du myocarde dans la périphérie de la zone ischémique et que celui-ci s'étend au ventricule droit après 6 semaines²⁷⁰. Cependant lors de l'ischémie cardiaque, le système lymphatique est défectueux, ce qui aggrave l'œdème et la dysfonction cardiaque : en effet les vaisseaux lymphatiques nouvellement formés sont décrits comme tortueux, dilatés et désorganisés.

1.2. Réponse (lymph)angiogénique et inflammatoire

Les facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques sont les principaux responsables de la (néo)formation de ces vaisseaux²⁶⁹. En hypoxie, la première réponse cellulaire est transcriptionnelle par le facteur de transcription HIF décrit en [partie I](#). HIF va moduler la réponse à l'hypoxie en initiant plusieurs voies de signalisation par la transcription de facteurs impliqués dans la néovascularisation et le remodelage : le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGFA et récepteur VEGFR1, CXCL12 (*stroma-derived factor 1*), l'angiopoïétine 2, et PDGF-BB (*platelet-derived growth factor*). Les facteurs de croissance des fibroblastes FGF1 et FGF2 sont également des angiogènes majeurs. FGF2 participe à l'angiogenèse de même que l'artériogenèse. Mon équipe d'accueil a démontré que le FGF2 est induit en hypoxie et dans un modèle d'ischémie de la peau par un mécanisme de traduction IRES-dépendante, de façon indépendante de HIF1 en hypoxie précoce¹⁶⁹. Il a également été utilisé lors d'une expérience de transfert de gène grâce à l'utilisation d'un lentivecteur multicistronique pour revasculariser le cœur ischémique et stimuler la fonction cardiaque, en combinaison avec la chimiokine cardioprotectrice Apeline et la pompe à calcium SERCA2a¹⁶⁰. VEGFA quant à lui se fixe sur ses récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR1 et 2) à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, qui à leur tour déclenchent plusieurs voies de signalisation résultant en une stimulation de la croissance vasculaire. La molécule de signalisation NO (*Nitric Oxide*), produite par l'enzyme eNOS, est aussi indispensable à l'angiogenèse suite à un infarctus du myocarde. Le PlGF (*Placenta Growth Factor*) est un contributeur indirect à la réponse par HIF en augmentant le relargage de NO par la cellule endothéliale, ce qui déclenche l'angiogenèse^{271–273}. Le facteur angiogénique VEGFC est lui aussi induit en hypoxie de façon indépendante de HIF¹⁴⁷. Il se lie aux récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 et permet d'augmenter la perméabilité vasculaire et le relargage de NO par les cellules endothéliales^{147,269}. HIF1 active également des voies de signalisation. C'est notamment le cas de la voie Sonic Hedgehog et de la protéine Patched 1 qui induisent les molécules angiogéniques comme VEGFA²⁷⁴. L'intégrine $\beta 2$

interagit avec ICAM-1 et la sélectine E, sur les cellules progénitrices vasculaires, pour faciliter le recrutement des cellules progénitrices aux zones hypoxiques^{275,276}. HIF-1 α est aussi régulé par le facteur de transcription NF- κ B, principal modulateur de l'inflammation. L'activation de cette voie en condition hypoxique dépend de l'inhibition de la kinase IKK β par l'hydroxylation de PHD1 (*prolyl-hydroxylase domain protein 1*). En effet IKK β inhibe NF- κ B en tant normal²⁷⁷. L'inhibition des PHD et la stabilisation de HIF qui en résulte va conduire à l'expression de diverses chimiokines (CCL2, CCL5, CX3CL1, CXCL12) lors de l'ischémie du membre alors qu'à l'inverse les cytokines inflammatoires telles que TGF β et IL- β favorise l'activité de HIF-1. Ces chimiokines entraînent le recrutement des monocytes et macrophages dans le tissu ischémique²⁶⁹. La néovascularisation des tissus ischémiques peut aussi passer par une réponse hormonale : la voie rénine-angiotensine, avec le facteur Angiotensine II. Ce facteur induit HIF-1 α dans les noyaux des cellules musculaires lisses, provoquant à son tour une réponse transcriptionnelle²⁷⁸.

2. Hypoxie et cancer

Le cancer découle de la dérégulation de la prolifération cellulaire résultant de l'inactivation de suppresseurs de tumeurs et/ou de l'activation successive d'oncogènes. La tumeur se doit d'être vascularisée pour pouvoir se développer au-delà d'un volume de 1 mm³, taille au-delà de laquelle des zones hypoxiques naissent : en effet, un déséquilibre apparaît entre la consommation et la production d'oxygène si la tumeur se situe à une distance de plus de 160-180 μ m du vaisseau sanguin le plus proche²⁷⁹. La néoangiogenèse est indispensable pour le développement de la tumeur primaire et par la suite, permet sa dissémination métastatique. Le centre de la tumeur contient un niveau élevé d'expression de HIF-1 α et HIF-2 α et ce niveau d'expression est corrélé avec la mort du patient^{280,281}. L'activation d'oncogènes et l'inactivation des suppresseurs de tumeurs permettent la stabilisation de HIF, comme c'est le cas pour le suppresseur de tumeur VHL²⁸². Des analyses cliniques immunohistochimiques ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de HIF, la densité des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les métastases hématogènes et lymphogènes dans le cancer du sein, de l'œsophage, du pancréas et dans le carcinome des cellules squameuses orales²⁷⁹. L'hypoxie tumorale va donc stimuler l'expression de facteurs angiogéniques motogéniques (régulant le mouvement cellulaire) et mitogéniques (régulant la mitose cellulaire) *via* la réponse transcriptionnelle de HIF (VEGFA, PGF, ANGPT2, CXCL12, HGF, PDGF-B) mais aussi *via* une réponse indépendante de HIF : l'hypoxie tumorale va également activer la voie mTor et la voie UPR²⁸³. Le facteur angiogénique FGF2 est lui aussi induit indépendamment de HIF en hypoxie¹⁶⁹. Le facteur angiogénique et lymphangiogénique VEGFC est produit de façon indépendante de HIF¹⁴⁷ également. L'angiogenèse induite par l'hypoxie tumorale donne des vaisseaux non-fonctionnels à la structure

anarchique : ils sont tortueux, se terminent parfois par des culs-de-sac, et sont anormalement perméables, ce qui est également le cas des vaisseaux lymphatiques induits par l'hypoxie. Aussi cette angiogenèse aggrave l'état hypoxique, ce qui en retour provoque une stabilisation accrue de HIF et des voies alternatives. Ce mécanisme de boucle rétroactive peut conduire à la résistance thérapeutique aux agents antiangiogéniques.

Parfois, les cellules cancéreuses ont une réponse à l'hypoxie différente de la voie angiogénique, appelée le mimétisme vasculogène. Ce sont des cellules tumorales issues du mésoderme, qui ont la capacité de former des pseudovaisseaux perfusables et capables de promouvoir la métastase hématogène. Ces cellules expriment des gènes appartenant aux voies de signalisation embryonnaires et des cellules souches, mais aussi des voies de signalisation vasculaire et de l'hypoxie. Dans ces cellules, HIF surexprime TWIST, un facteur important pour la transition épithélio-mésenchymateuse^{279,284–286}.

Le système lymphatique n'est pas en reste dans la tumorigenèse et le processus métastatique : les vaisseaux lymphatiques sont également un moyen de dissémination privilégié de la tumeur. Le système lymphatique est unidirectionnel, et permet en temps normal de drainer les fluides, les lipides et macromolécules, ainsi que les cellules du système immunitaire jusqu'à la veine sous-clavière où il rejoint la circulation sanguine. Contrairement au système sanguin, la membrane basale des vaisseaux lymphatiques est discontinue, avec une jonction cellulaire fine. La lymphangiogenèse tumorale accentue ce phénotype avec des vaisseaux à la lumière large et des jonctions cellulaires espacées : est d'autant plus anarchique et les vaisseaux, très perméables, facilitent l'intravasation des cellules tumorales^{279,287}. De plus, les cellules endothéliales lymphatiques (CEL) baignent dans un environnement hypoxique, voire anoxique, favorisant la formation de nouveaux vaisseaux^{279,287}.

II. les facteurs de croissance (lymph)angiogéniques

1. Les facteurs de croissance dans les pathologies

1.1. La famille des FGF et leurs récepteurs

La famille des FGF (facteur de croissance des fibroblastes) regroupe pas moins de 22 membres, du FGF1 au FGF23 (le FGF15 n'existant pas chez l'Homme)²⁸⁸. Les prototypes de cette famille, FGF1 et FGF2 ont été initialement découverts dans les fibroblastes mais sont cependant produits par plusieurs types de cellules, et peuvent agir dans les fibroblastes tout comme les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Ce sont des facteurs de croissance mitogènes, mais ils ont également des effets variés en fonction du type cellulaire et du tissu^{289,290}. Ils sont primordiaux dans le développement

embryonnaire, notamment dans le développement neuronal²⁹¹, et sont impliqués chez l'adulte dans les processus de cicatrisation, l'organisation des kératinocytes et l'angiogenèse. Ils ont la capacité de lier l'héparine et l'héparane sulfate, aussi on peut les retrouver piégés dans la matrice extracellulaire.

Le FGF1 (aussi appelé *acidic fibroblast growth factor*) et le FGF2 (*basic fibroblast growth factor*) ont pour la première fois été identifiés en 1975. Leur nom est tiré de la purification qui a permis de les discriminer. Ils lient tous les deux les récepteurs au FGF à activité tyrosine kinase, qui sont au nombre de quatre chez les mammifères. Ces derniers se composent de trois domaines *Immunoglobulin-like*, d'une région hydrophobique transmembranaire et d'une queue cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. Le site de liaison du ligand est compris dans les domaines extracellulaires D2 et D3²⁸⁸. Contrairement aux autres membres de la famille, FGF1 et FGF2 (pour l'isoforme de 18 kDa) ne possèdent pas de séquence de sécrétion, ils sont donc sécrétés par une voie non canonique n'impliquant pas le golgi²⁹²⁻²⁹⁴. Ils permettent la prolifération des cellules endothéliales et leur migration et organisation pour la formation de structures tubulaires.

Le FGF1 est exprimé par les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes. Il est impliqué dans la régénération et le développement musculaire et est induit par un couplage entre la transcription et la traduction durant la myogenèse¹⁶⁵. De plus il induit l'angiogenèse cardiaque²⁹⁵. Le FGF2 quant à lui promeut le développement vasculaire collatéral dans un modèle canin d'occlusion des coronaires, mais aussi plus récemment son rôle proangiogénique a été démontré chez différentes espèces y compris l'homme dans un contexte d'ischémie du myocarde²⁹⁶⁻²⁹⁸. Il a un effet autocrine dans la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales^{299,300}. Dans le cancer, FGF1 et FGF2 favorisent l'angiogenèse^{301,302}. FGF1 est induit en particulier dans le cancer du poumon par un long ARN non-codant, RAB1A-2³⁰³. L'inhibition de BRAF/MEK dans le mélanome conduit à la sénescence cellulaire, à l'activation de la voie PI3K et à l'induction de l'expression de FGF1 qui va à son tour, de manière autocrine et paracrine, promouvoir la survie et stimuler les cellules adjacentes vers la tumorigenèse. De façon intéressante, FGF1 et FGF2 sont tous deux induits par la voie UPR dans le mélanome^{304,305}. De plus, FGF1 provoque la résistance aux chimiothérapies dans le cancer ovarien en favorisant la survie cellulaire mais également la migration, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales par la voie FGF1/FGFR4^{306,307}. Le FGF1 est exprimé en corrélation avec la podoplanine - un marqueur des cellules endothéliales lymphatiques, dans le carcinomes des poumons des cellules squameuses. Cette co-expression est corrélée avec un mauvais pronostic pour les patients³⁰⁸. Enfin, FGF1 et FGF2 sont induits par l'ischémie et l'hypoxie, plus particulièrement au niveau traductionnel : en effet les ARNm de ces deux facteurs de croissance possèdent des structures IRES^{160,169,309,310}.

1.2. La famille des VEGF et leurs récepteurs

La famille des VEGF (facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire) regroupe 5 membres chez les mammifères, le VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et le PGF (*Placenta-like Growth Factor*). Les récepteurs de ces facteurs de croissance sont VEGFR1, 2 et 3, des récepteurs à activité tyrosine kinase situés à membrane plasmique des cellules endothéliales. Ils présentent sept domaines *immunoglobulin-like* extracellulaires, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique arborant l'activité tyrosine kinase. La liaison de leur ligand provoque la dimérisation du récepteur et leur activation par transphosphorylation³¹¹.

VEGFA, aussi appelé Facteur de Perméabilité Vasculaire, est un facteur mitogénique des cellules endothéliales, et de ce fait, angiogénique. Il se lie aux récepteurs VEGFR1 et 2, ce qui déclenche la prolifération, la migration, la survie et la dégradation de la matrice extracellulaire, mais aussi la perméabilité vasculaire et le branchement des vaisseaux dans le parenchyme de l'organe (c'est-à-dire les tissus constituant les parties fonctionnelles, la plupart du temps vitales, de l'organe en question). L'expression de VEGFA et de ses récepteurs dépend majoritairement de l'activité transcriptionnelle de HIF en hypoxie.

Le PGF est lui aussi induit par HIF. Il se lie à VEGFR1 pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales et murales (les cellules musculaires lisses vasculaires et les péricytes). Il augmente l'expression de VEGFA, PDGF-B et FGF2, et de plus induit le recrutement des progéniteurs hématopoïétiques dans le microenvironnement tumoral tout en stimulant la motilité des cellules cancéreuses et l'invasion stromale. Le PGF peut aussi promouvoir la normalisation des vaisseaux, c'est-à-dire le renforcement des capillaires angiogéniques, ce qui permet d'améliorer la perfusion et l'oxygénation de la tumeur, la rendant plus sensible aux thérapies anti-VEGF ou VEGFR2^{312,313}. Dans les tissus ischémiques, la liaison de PGF au VEGFR1 induit la néovascularisation³¹⁴.

Le VEGFB se lie au récepteur VEGFR1, tout comme PGF. Lors de l'ischémie cardiaque, son expression est augmentée. Dans un nombre de tissu restreint comme les vaisseaux coronaires épicaudiques il peut, plutôt que promouvoir l'angiogenèse, contrôler la survie des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales dans la paroi du vaisseau³¹⁵.

VEGFC et VEGFD sont les principaux facteurs lymphangiogéniques, se liant au récepteur VEGFR3 dans les CEL. Ils peuvent également se lier à VEGFR2 pour induire la prolifération et migration dans les cellules endothéliales. VEGFD a un fort effet angiogénique, artériogénique et lymphangiogénique dans le muscle squelettique ischémique et il permet d'augmenter la perfusion du myocarde³¹⁶. Dans le cancer, en plus de permettre la lymphangiogenèse tumorale, VEGFC et VEGFD provoquent des changements structuraux des vaisseaux lymphatiques en périphérie de la tumeur. Ils

peuvent également induire la dilatation des lymphatiques drainants au niveau proximal ou distal d'un ganglion lymphatique sentinelle^{317,318}. Ces facteurs de croissance sont de plus exprimés par les fibroblastes associés aux tumeurs et par les cellules immunes, ce qui contribue à la progression du cancer. L'expression de VEGFC et VEGFD est corrélée positivement avec la dissémination métastatique. L'expression de leur récepteur, VEGFR3, est limitée aux CEL. Cependant durant la tumorigenèse VEGFR3 est induit dans les CEL, et cellules endothéliales vasculaires sanguines dans certaines tumeurs^{319,320}. L'équipe a montré que l'expression du VEGFC est induite lors de l'hypoxie tumorale indépendamment de HIF1 α : malgré une diminution du niveau de son ARNm, sa synthèse protéique augmente. Cette hausse de la traduction est contrôlée par l'IRES présent dans son 5'UTR¹⁴⁷.

2. Régulation de la traduction des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques en réponse à l'hypoxie

2.1. Les IRES et ITAF des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques

Comme vu dans les paragraphes précédents, les principaux FGF et les VEGF sont des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, et leur expression est altérée en cas de stress. Le point commun de tous ces facteurs est qu'ils possèdent une structure IRES dans leur ARNm. Certains, comme le VEGFA, en possèdent même deux. Dans cette partie nous décrirons les IRES des FGF1 et 2, ainsi que des VEGFA, C et D, étudiés au cours de ma thèse, ainsi que les ITAF identifiés pour réguler ces structures en cas de stress.

FGF1

Le gène FGF1 exprime une seule isoforme protéique de 17 kDa. Cependant, quatre promoteurs tissus-spécifiques génèrent quatre transcrits contenant des 5'UTR différents, résultats d'épissages alternatifs conservés chez les mammifères. Le premier exon est promoteur-spécifique, ainsi les 4 transcrits commencent par un exon 1A, 1B, 1C ou 1D. Les transcrits « majeurs » A et B sont indispensables à la survie et à la maintenance cellulaire notamment des cellules cardiaques et neuronales. Quant aux transcrit C et D, ils sont exprimés lors de conditions bien précises comme la stimulation hormonale ou de sérum. Les différents 5'UTR mesurent respectivement 432, 147, 149 et 92 nucléotides (nt) (Cf. [figure 17A](#)).

Des structures IRES ont été identifiées par l'équipe dans les transcrits A et C du FGF1. *In vitro* et *in vivo*, l'activité de l'IRES varie grandement : en culture cellulaire, l'activité des « leaders » A et C est équivalente, alors que chez la souris le *leader* A arbore une forte activité *a contrario* du *leader* C. L'IRES A minimal a été défini par mutagenèse : il est compris entre 269 et 387 nt depuis l'extrémité

5'. Une séquence indispensable à son fonctionnement se situe entre le 269^e et le 303^e nt, et les séquences en amont et aval de l'IRES minimum (214-269 et 387-432) permettent d'augmenter son activité. De plus la distance entre l'IRES et l'AUG étant flexible, l'IRES ne semble pas adopter de point d'initiation précis : cela suggère un scanning après recrutement du ribosome¹⁵⁶. Le 5'UTR de l'IRES FGF1 est assez conservé entre l'homme et la souris : 70% d'homologie, certaines séquences étant à 100% conservées, la plupart sont situées dans l'IRES minimum. Le domaine DII, compris entre le 276^e et le 299^e nt est conservé chez plusieurs mammifères tant sur le plan structural qu'au niveau de la séquence. Cette tige-boucle est responsable à elle seule de 50% de l'activité de l'IRES. Elle est probablement le lieu de recrutement d'un ITAF¹⁵⁶.

Durant la myogenèse, le promoteur A est activé et le transcrit A est généré. De plus, l'IRES porté par ce transcrit est activé lors de la différenciation et régénération des cellules musculaires *in vitro* et *in vivo*. Enfin, l'activité de l'IRES est couplée à la transcription : le promoteur A muté entraîne une forte baisse de l'activité de l'IRES du FGF1¹⁶⁵. Ce couplage transcription-traduction est contrôlé par deux protéines, p54^{nrb} et hnRNPM : en effet notre équipe a montré que ces deux protéines avaient la capacité de se fixer au promoteur du FGF1 pour induire la transcription du gène lors de la différenciation des myoblastes. Elles se retrouvent ensuite couplées à l'IRES du FGF1 avant export dans le cytoplasme de l'IRESome au sein duquel elles jouent un rôle d'ITAF¹⁷⁴. De façon intéressante, ces protéines sont également des composants du paraspeckle comme mentionné en [partie II](#). Y aurait-il un lien entre la traduction IRES-dépendante et le paraspeckle ? Cette question fait l'objet du [chapitre II](#) de la présente thèse. Dernièrement, l'équipe a montré que l'IRES du FGF1 est actif durant l'ischémie du membre inférieur et l'ischémie cardiaque chez la souris. Cet IRES a été utilisé dans le cadre d'une thérapie génique de l'ischémie cardiaque, basée sur un lentivecteur multicistronique permettant une expression combinée de gènes médicaments^{160,161}.

FGF2

Le FGF2 exprime cinq isoformes protéiques générées à partir de codon initiateurs alternatifs, dont quatre CUG non-canoniques^{321,322}. Il existe le FGF2 LMW (bas poids moléculaire) de 18 kDa codé à partir du codon AUG à 584 nt de l'extrémité 5', et les FGF2 HMW (haut poids moléculaire) de 24, 22,5 22 et 34 kDa chez l'Homme, respectivement codés par les codons CUG à 320, 347, 362, et 86 nt de l'extrémité 5' (Cf. [figure 17B](#)).

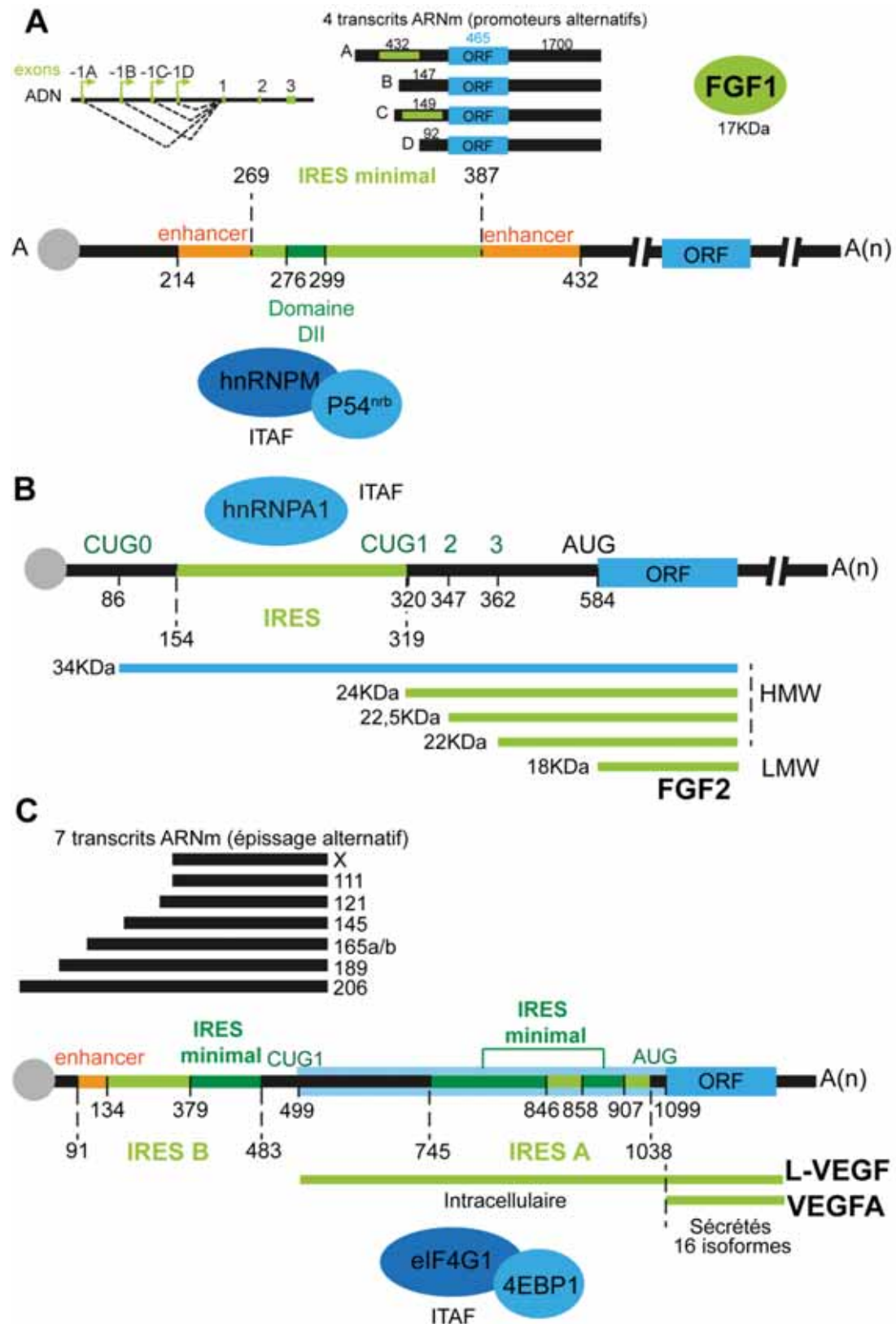


Figure 17. Régulations transcriptionnelle et traductionnelle des facteurs de croissance des fibroblastes FGF1 et FGF2 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGFA.

Deux isoformes de 21 et 22 kDa sont présentes chez la souris³²³. L'expression de ces différentes isoformes diffère selon le tissu, de même que leur fonction¹⁶².

Notre équipe a identifié un IRES dans le 5'UTR du FGF2, entre les nt 154 et 319³²⁴. L'activité de l'IRES du transcrit avec l'AUG initiateur est constitutive dans les lignées cellulaires. En revanche les isoformes FGF2 HMW (CUG1, 2 et 3, la forme de 86 kDa étant exprimée de façon coiffe-dépendante) sont exprimées via la traduction IRES-dépendante en réponse au stress et à la densité cellulaire. Créancier et al ont généré une souris transgénique exprimant le rapporteur bicistronique Lucky-Luke (Cf. **Méthodes d'étude des IRES et contrôles** » [partie II.3.2](#)) avec l'IRES du FGF2. Ils ont montré que l'activité de l'IRES du FGF2 est tissu-spécifique, contrairement à l'IRES viral EMCV¹²⁶. Son activité est forte dans le cœur et le cerveau de l'embryon, alors que chez l'adulte il est actif uniquement dans le cerveau et les testicules. Cependant l'IRES du FGF2 est actif dans la plupart des lignées cellulaires tissulaires, ce qui signifie que son activité dépend du statut de la cellule : l'état prolifératif, la différenciation, le stress. Son activité *in vivo* est conservée dans un même tissu entre différentes espèces (humain, souris, singe, hamster)¹⁶².

L'IRES du FGF2 est activé dans l'ischémie de la peau. En revanche, l'ARNm de FGF2 baisse en hypoxie de manière concomitante à HIF1 α , ce qui signifie que l'augmentation de l'expression de FGF2 ne dépend pas de HIF1 α . Cependant, il existe une collaboration entre ces deux protéines : ils sont inhibiteurs mutuels en hypoxie précoce, tandis qu'en hypoxie tardive ils amplifient l'un l'autre leurs expressions en une boucle de régulation positive¹⁶⁹. L'IRES du FGF2 est régulé par l'ITAF hnRNP A1. Cet ITAF, qui contrôle de nombreux IRES, est une protéine-navette entre le noyau et le cytoplasme, présente au sein des paraspeckles notamment en cas d'hypoxie (Cf [partie II](#))¹⁷⁷.

VEGFA

Le VEGFA ne présente pas moins de 16 isoformes protéiques, générées par épissage alternatif de ses 8 exons à partir de 6 transcrits : VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆, mais aussi VEGF-X découvert plus récemment³²⁵. L'ARNm du VEGFA possède un 5'UTR anormalement long et structuré, mesurant environ 1000 nt, ce qui est un facteur inhibiteur pour l'initiation de la traduction par le mécanisme canonique. Or, la traduction de cet ARN est coiffe-indépendante. Deux IRES ont été découverts dans le 5'UTR : l'IRES A se situe entre 745 et 846 nt en aval de l'extrémité 5', dans les 300 nt en amont de l'AUG initiateur, l'IRES B quant à lui se situe des nt 91 à 483¹⁴⁸ (Cf. [figure 17C](#)).

Deux domaines sont indispensables au fonctionnement de l'IRES A, l'un de 745 et 855 environ, et l'autre des nt 858 à 907 en amont du codon initiateur. Etant situé à proximité de l'AUG initiateur, cet IRES doit permettre le recrutement du ribosome et l'initiation de la traduction sans balayage. L'IRES

B a besoin d'une séquence minimale de 379 à 483 pour fonctionner, et son activité est maximisée avec sa séquence du nt 91 au 134¹⁴⁸. Il a par la suite été démontré que quatre CUG pouvant potentiellement initier la traduction se situent entre les deux IRES dans le même cadre de lecture que l'AUG¹⁰⁹. L'IRES B initie la traduction au premier codon CUG, générant ainsi une isoforme protéique long de 206 acides aminés supplémentaires en N-terminal, le L-VEGF. Le L-VEGF est subséquentement clivé en un fragment de 23 kDa et un autre faisant la taille de la protéine canonique initiée à l'AUG. La protéine canonique et le fragment carboxy-terminal du L-VEGF sont sécrétés, ce qui n'est pas le cas du fragment N-terminal qui conserve une localisation intracellulaire¹⁰⁹. Un autre niveau de régulation vient s'ajouter quant à l'utilisation de l'IRES A : la composition exonique du transcrit est déterminante pour promouvoir ou non l'utilisation du codon AUG à partir de l'IRES A³²⁶. Enfin, l'IRES est activé lors de l'ischémie du membre inférieur¹⁶⁸ et est régulé par deux ITAF : 4EBP1 et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G1¹⁷⁰, deux protéines en lien avec la machinerie de synthèse protéique.

VEGFC

Le VEGFC est une protéine dimérique maturée de façon post-traductionnelle par clivage protéolytique. D'une taille de 58 kDa, la forme non-clivée, le VEGFC passe à une forme intermédiaire inactive constituée de deux chaînes polypeptidiques de 29 kDa et 31 kDa reliées par un pont disulfure, pour finir par une forme mature et sécrétée. Cette dernière est capable de lier les récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR2 et VEGFR3³²⁷. L'équipe a montré que le VEGFC possède un IRES dans son 5'UTR qui peut induire la synthèse protéique du transcrit dans les tumeurs en hypoxie. Cette augmentation de VEGFC est indépendante de HIF1 α .¹⁴⁷ Trois zones du 5'UTR sont hautement conservées entre l'homme et la souris, et deux de ces motifs arborent une structure similaire entre les deux espèces. Sachant que, chez l'homme et la souris, elles se situent à la même distance du codon initiateur, ce sont des séquences potentielles de liaison avec les ITAF. Aucune protéine ni ARN jouant ce rôle n'a à ce jour été identifiée.

VEGFD

Le transcrit du VEGFD possède 8 exons. Cette protéine a une structure très proche de celle de VEGFC, et son processus de maturation par clivage se passe de la même façon. Pourtant le VEGFD a été moins étudié que le VEGFC, à cause de l'absence de phénotype de la souris invalidée pour le facteur de croissance³²⁸. L'équipe a montré que le transcrit possède un IRES dans son 5'UTR, activé lors du choc thermique dans les lignées de cellules de cancer du sein murin métastatiques et non-métastatiques (4T1 et 67NR). Deux structures alternatives ont été dessinées pour l'IRES. La nucléoline a été identifiée en tant qu'ITAF de l'IRES de VEGFD grâce à des expériences de résonance

plasmonique de surface couplée à la spectrométrie de masse. Elle se trouve délocalisée du noyau dans le cytoplasme lors du choc thermique de 37°C à 42°C, pour promouvoir l'activation de l'IRES de VEGFD¹⁴⁵.

2.2. Les ITAF-régulons et l'hypoxie

Comme nous l'avons vu, les FGF1 et 2 ainsi que les VEGFA, C et D régulent à différents niveaux la mise en place des vaisseaux sanguins et lymphatiques lors du développement embryonnaire et chez l'adulte. Ils sont également actifs lors de pathologies comme l'ischémie cardiaque et le cancer. Ces facteurs de croissance doivent agir de concert, la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques et lymphangiogéniques est subtile et le maintien d'un équilibre est primordial pour une réponse adaptée au microenvironnement. Aussi, une régulation fine de l'expression de ces facteurs est nécessaire : la traduction IRES-dépendante est un moyen de répondre rapidement et sélectivement à un stress et de prioriser l'utilisation de l'énergie de la cellule. Les ITAF formant l'IRESome sont donc des acteurs cruciaux de la réponse traductionnelle en cas de stress. Notamment, les deux IRES de l'ARNm p53 sont contrôlés par non moins de 16 ITAF en fonction du stimulus appliqué^{134,329}. Un même ITAF peut également réguler plusieurs IRES : hnRNPA1 par exemple régule 11 IRES en réponse à des stress variés¹³⁴. Lors du développement, les gènes HOX sont contrôlés par des IRES eux-mêmes régulés par la protéine ribosomique RPL38¹³¹. Dans ce cas on peut dire que les ITAF agissent en tant que « régulons » de l'activité des IRES.

Introduction - Partie IV : problématiques et objectifs de la thèse

Durant cette introduction, nous avons fait un tour d'horizon des différentes régulations de l'expression des gènes en cas de stress, dès l'étape de transcription, en passant par la maturation et la stabilité de l'ARNm, la traduction et plus particulièrement son initiation. Nous nous sommes intéressés aux structures d'ARN IRES ayant la faculté de contrôler la synthèse protéique dans un contexte défavorable à la traduction par le mécanisme canonique. Nous avons également décrit le paraspeckle, un corps nucléaire se formant en réponse aux stimuli physiologiques et aux stress, impliqué lui aussi dans la régulation de l'expression des gènes. Les paraspekles sont structurés par un long ARN non-codant *Neat1*, induit en hypoxie dans les cardiomyocytes et cellules cancéreuses. De façon intéressante, nous avons vu que *Neat1* promeut la survie des cardiomyocytes et la prolifération des fibroblastes dans le cœur ischémique et est de plus un marqueur de mauvais pronostic de survie pour les patients atteints de cancer. Nous avons de plus souligné que de nombreuses protéines associées au paraspeckle sont aussi des ITAF. Enfin, le rôle des différents facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques ainsi que leur IRES et ITAF ont été décrits dans un contexte d'ischémie cardiaque et de cancer.

Les IRES sont des acteurs cruciaux de l'expression des gènes en réponse aux stress dans les pathologies. Ils ont pourtant été peu étudiés dans l'ischémie cardiaque. Aussi des questions émergent : la régulation des gènes en réponse à l'ischémie survenant après un infarctus se ferait-elle au niveau transcriptionnel ou traductionnel dans les cardiomyocytes ? De quelle façon les IRES des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques sont impliqués dans la réponse à l'ischémie ? Pour répondre à ces questions, durant ma thèse, je me suis intéressée dans un premier temps à l'activité traductionnelle des cardiomyocytes en hypoxie. Dans ce sujet qui fait l'objet d'un article dont je suis co-premier auteur, nous nous demandons si les IRES des facteurs FGF1, FGF2, VEGFAa, Ab, C et D ainsi que les IRES non-angiogéniques *c-myc* et *EMCV* sont activés dans les cardiomyocytes en réponse à l'hypoxie. Nous avons également cherché des ITAF pouvant contrôler ces IRES en hypoxie. Cet article fait l'objet du premier chapitre de ma thèse.

Les ITAFs contrôlant les IRES des facteurs (lymph)angiogéniques ont été peu étudiés. Il est pourtant important que ces ITAF soient connus et leur mécanisme d'action décrypté : on pourrait imaginer qu'une réponse concertée d'un ensemble d'IRES en hypoxie serait contrôlée par un facteur commun. Existerait-il un ITAF de l'hypoxie, capable de réguler l'ensemble des IRES de facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques pour déclencher la (lymph)angiogenèse en réponse à l'hypoxie ischémique ou cancéreuse ? Une telle découverte ferait de cet ITAF une cible privilégiée pour les thérapies pro-(lymph)angiogéniques dans le cas de l'ischémie cardiaque et anti-angiogénique dans le cas du cancer. Ainsi, dans une deuxième étude qui est le cœur de ma thèse, j'ai cherché à identifier un ITAF régulant cet ensemble d'IRES en hypoxie. Dans un travail antérieur, l'équipe a identifié ITAF

deux ITAF de l'IRES du FGF1 p54^{nrb} et hnRNPM, qui sont également deux protéines des paraspeckles. J'ai donc cherché à savoir si le paraspeckle et le long ARN non-codant Neat1 sont impliqués dans la traduction IRES-dépendante dans les cardiomyocytes en hypoxie. Cette étude est décrite dans le second chapitre de ma thèse.

Enfin dans le troisième chapitre, je présente mon étude de la régulation de la traduction IRES-dépendante du facteur angiogénique FGF1 dans les cellules de carcinome mammaire métastatique et non-métastatique 4T1 et 67NR. Grâce à la conception et à la production d'un outil moléculaire d'interférence ARN, le micro-ARN artificiel exprimé par un lentivecteur, j'ai réprimé le long ARN non-codant Neat1 dans la lignée 67NR et étudié l'effet de cette extinction sur l'activité de l'IRES du FGF1 en normoxie et hypoxie.

L'objectif de ce travail de thèse est de comprendre davantage le mécanisme impliqué dans le contrôle de la synthèse des facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques en hypoxie dans le cardiomyocyte lors de l'hypoxie cardiaque, et dans l'hypoxie tumorale. L'identification d'un ITAF commun aux différents IRES des facteurs (lymph)angiogéniques régulant leur activation en hypoxie permettrait de cibler ce mécanisme alternatif de synthèse protéique à des fins thérapeutiques.

Chapitre I : Etude de la régulation de l'expression des facteurs (lymph)angiogéniques dans les cardiomyocytes en hypoxie

Lors de l'ischémie cardiaque, l'hypoxie générée par occlusion d'une branche d'une artère coronaire est un stress régulateur de l'expression des gènes. Les processus d'angiogenèse et lymphangiogenèse surviennent alors pour reperfusionner la zone lésée, charrier les déchets générés par la nécrose du tissu et faire circuler les cellules immunes. Une première réponse de la cellule passe par le facteur de transcription HIF, stabilisé en hypoxie, ciblant le gène majeur de l'angiogenèse VEGFA^{278,328}. Cependant, deux autres facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques, VEGFC et FGF2, sont également induits lors de l'hypoxie de façon indépendante de HIF par un mécanisme traductionnel. On constate donc que la régulation de l'expression des gènes par l'hypoxie se fait à différents niveaux. Des IRES (Internal Ribosome Entry Sites) sont présents dans le 5'UTR des ARNm des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques VEGFA, VEGFC, FGF2, mais aussi FGF1 et VEGFD. Ces structures tridimensionnelles permettent une initiation traductionnelle dans un contexte de stress qui équivaut à un blocage global de la synthèse protéique¹³⁴. Aussi nous nous sommes demandés dans cette étude à quel niveau les gènes (lymph)angiogéniques et de réponse aux stress sont régulés lors de l'ischémie cardiaque dans les cardiomyocytes et si ce mécanisme implique les IRES. Nous avons donc étudié grâce à une puce qPCR l'expression du transcriptome de 96 de ces gènes, mais également du traductome à partir de polysomes c'est à dire d'ARN en interaction avec les ribosomes, isolés sur gradient de sucrose. Cette expérience a été réalisée dans une lignée de cardiomyocytes immortalisés, les HL-1, placée en normoxie ou hypoxie. Les résultats suggèrent, de façon étonnante, que ces gènes sont majoritairement régulés au niveau traductionnel si on exclut les cibles connues de HIF. Etant donné que plusieurs des gènes étudiés possèdent des IRES dans leur ARNm, nous avons fait l'hypothèse que ces gènes seraient régulés via leur structure IRES permettant l'entrée interne de ribosome. Aussi nous avons étudié l'activité des IRES des gènes (lymph)angiogéniques et de gènes non liés à la lymphangiogenèse grâce à un rapporteur bicistronique exprimé par lentivecteur. Nous avons pu mettre en évidence que les IRES des facteurs (lymph)angiogéniques sont activés en hypoxie précoce dans les cardiomyocytes et qu'une hypoxie plus tardive active les IRES du proto-oncogène cmyc et l'IRES viral EMCV. Par la suite, nous avons cherché à identifier un facteur qui régule ces IRES en hypoxie, un ITAF (IRES-Trans-Acting Factor). Grâce à la méthode de BIA-MS précédemment mise au point dans l'équipe¹⁷⁴, nous avons identifié la vasohibine 1 (VASH1) fixée à l'IRES du FGF1, protéine décrite comme sécrétée et anti-angiogénique mais aussi comme protéine de tolérance au stress et pro-survie. Nous avons ensuite démontré que VASH1 régule positivement l'activité de l'IRES FGF1 en hypoxie, et que sa déplétion impacte la localisation des gènes étudiés précédemment aux polysomes de façon positive ou négative. Nous avons donc identifié un nouveau régulateur de la réponse au stress dans les cardiomyocytes agissant au niveau traductionnel, le mécanisme précis restant à élucider.

Vasohibin1, a new mouse cardiomyocyte IRES trans-acting factor that regulates translation in early hypoxia

Fransky Hantelys^{1†}, Anne-Claire Godet^{1†}, Florian David^{1†}, Florence Tatin¹, Edith Renaud-Gabardos¹, Françoise Pujol¹, Leila H Diallo¹, Isabelle Ader², Laetitia Ligat³, Anthony K Henras⁴, Yasufumi Sato⁵, Angelo Parini¹, Eric Lacazette¹, Barbara Garmy-Susini¹, Anne-Catherine Prats^{1*}

¹UMR 1048-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France; ²UMR 1031-STROMALAB, Inserm, CNRS ERL5311, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), National Veterinary School of Toulouse (ENVT), Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France; ³UMR 1037-CRCT, Inserm, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Pôle Technologique-Plateau Protéomique, Toulouse, France; ⁴UMR 5099-LBME, CBI, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France; ⁵Department of Vascular Biology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan

Abstract Hypoxia, a major inducer of angiogenesis, triggers major changes in gene expression at the transcriptional level. Furthermore, under hypoxia, global protein synthesis is blocked while internal ribosome entry sites (IRES) allow specific mRNAs to be translated. Here, we report the transcriptome and translome signatures of (lymph)angiogenic genes in hypoxic HL-1 mouse cardiomyocytes: most genes are induced at the translome level, including all IRES-containing mRNAs. Our data reveal activation of (lymph)angiogenic factor mRNA IRESs in early hypoxia. We identify vasohibin1 (VASH1) as an IRES trans-acting factor (ITAF) that is able to bind RNA and to activate the FGF1 IRES in hypoxia, but which tends to inhibit several IRESs in normoxia. VASH1 depletion has a wide impact on the translome of (lymph)angiogenesis genes, suggesting that this protein can regulate translation positively or negatively in early hypoxia. Translational control thus appears as a pivotal process triggering new vessel formation in ischemic heart.

Introduction

Hypoxia constitutes a major stress in different pathologies including both cancer and ischemic pathologies where artery occlusion leads to hypoxic conditions. In all of these pathologies, hypoxia induces a cell response that stimulates angiogenesis to re-feed starved cells with oxygen and nutrients (Pouyssegur et al., 2006). Recently it has been shown that lymphangiogenesis is also induced by hypoxia (Morfoisse et al., 2014). Hypoxia-induced (lymph)angiogenesis is mediated by strong modification of gene expression at both transcriptional and post-transcriptional levels (Pouyssegur et al., 2006; Holcik and Sonenberg, 2005). A major mode of regulation of gene expression is mediated at the transcriptional level by the hypoxia inducible factor 1 (HIF1), a transcription factor stabilized by oxygen deprivation, that activates transcription from promoters containing hypoxia-responsive elements (HRE). One of the well-described HIF1 targets is vascular endothelial growth factor A (VEGFA), a major angiogenic factor (Forsythe et al., 1996; Pagès and Pouyssegur, 2005). However, two other major angiogenic or lymphangiogenic growth factors, fibroblast growth factor 2 (FGF2) and VEGFC, respectively, are induced by hypoxia in a HIF-independent

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

†These authors contributed
equally to this work

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

Funding: See page 22

Received: 18 July 2019

Accepted: 09 December 2019

Published: 09 December 2019

Reviewing editor: Nahum
Sonenberg, McGill University,
Canada

© Copyright Hantelys 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.

manner by a translational mechanism, indicating the importance of the post-transcriptional regulation of gene expression in this process (Morfoisse et al., 2014; Conte et al., 2008).

Translational control of gene expression plays a crucial role in the stress response. In particular, translation of mRNAs by the classical cap-dependent mechanism is silenced, whereas alternative translation mechanisms allow enhanced expression of a small group of messengers that are involved in the control of cell survival (Holcik and Sonenberg, 2005; Baird et al., 2006; Spriggs et al., 2008). One of the major alternative mechanisms that is able to overcome this global inhibition of translation by stress depends on internal ribosome entry sites (IRESs), which correspond to RNA structural elements that allow the direct recruitment of the ribosome onto mRNA. As regards the molecular mechanisms of IRES activation by stress, several studies have reported that RNA-binding proteins, called IRES trans-acting factors (ITAFs), are able to stabilize the adequate RNA conformation, thus allowing ribosome recruitment (Faye and Holcik, 1849; Godet et al., 2019; Liberman et al., 2015; Mitchell et al., 2003; Morfoisse et al., 2016). Interestingly, subcellular relocalization of ITAFs plays a critical role in IRES-dependent translation (Lewis and Holcik, 2008). Indeed, many RNA-binding proteins are known to shuttle between nucleus and cytoplasm, and it has been reported that cytoplasmic relocalization of ITAFs such as PTB, PCBP1, RBM4 or nucleolin is critical to activate IRES-dependent translation (Godet et al., 2019; Morfoisse et al., 2016; Lewis and Holcik, 2008). By contrast, other ITAFs such as hnRNPA1, may have a negative impact on IRES activity when accumulating in the cytoplasm (Lewis et al., 2007). However, how ITAFs participate in the regulation of the hypoxic response remains a challenging question.

IRESs are present in the mRNAs of several (lymph)angiogenic growth factors in the FGF and VEGF families, suggesting that the IRES-dependent mechanism might be a major way to activate angiogenesis and lymphangiogenesis during stress (Morfoisse et al., 2014; Godet et al., 2019; Morfoisse et al., 2016; Huez et al., 1998; Martineau et al., 2004; Stein et al., 1998; Vagner et al., 1995). However, most studies of the role of hypoxia in the regulation of gene expression have been performed in tumoral hypoxia, although it has been reported that tumoral angiogenesis leads to the formation of abnormal vessels that are non-functional, differing strongly from non-tumoral angiogenesis that induces formation of functional vessels (Jain, 2005). This suggests that the regulation of gene expression in response to hypoxia may be different in cancer versus ischemic pathologies. In particular, the role of IRESs in the control of gene expression in ischemic heart, the most frequent ischemic pathology, remains to be elucidated.

Here, we analyzed the transcriptome and the translome of (lymph)angiogenic growth factors in hypoxic cardiomyocytes, and studied the regulation of IRES activities in early and late hypoxia. Data show that in cardiomyocyte, (lymph)angiogenic growth factors are mostly regulated at the translational level. Interestingly, IRESs of several mRNAs in the FGF and VEGF families are activated in early hypoxia in contrast to the IRESs of non-angiogenic messengers. We also looked for ITAFs governing IRES activation in hypoxia, and identified vasohibin1 (VASH1) as a new ITAF that is able to activate the FGF1 IRES in hypoxic cardiomyocytes but not the other IRESs studied here. VASH1 depletion has also a wide impact on the recruitment of (lymph)angiogenic factor mRNAs into polysomes, suggesting that this protein can regulate translation positively or negatively in early hypoxia.

Results

Most (lymph)angiogenic genes are not induced at the transcriptome level of hypoxic cardiomyocytes

In order to analyze the expression of angiogenic and lymphangiogenic growth factors in hypoxic cardiomyocytes, the HL-1 cell line was chosen: although immortalized, it keeps the beating phenotype specific to cardiomyocyte (Claycomb et al., 1998). HL-1 cells were submitted to increasing durations of hypoxia, from 5 min to 24 hr, and their transcriptome was analyzed on a Fluidigm Deltagene PCR array targeting 96 genes of angiogenesis, lymphangiogenesis and/or stress (Figure 1, Figure 1—figure supplement 1, Supplementary file 1). Data showed a significant increase of *Vegfa*, *PAI-1* and *apelin* (*Apln*) mRNA levels, with a peak at 8 hr of hypoxia for *Vegfa* and *PAI1* and 24 hr for *Apln*. These three genes are well-described HIF1 targets (Forsythe et al., 1996; Kietzmann et al., 1999; Ronkainen et al., 2007). However, although 56% of the detected genes were induced over 1.5-fold, few of them were strongly induced. Furthermore, the mRNA levels of several major angio- or

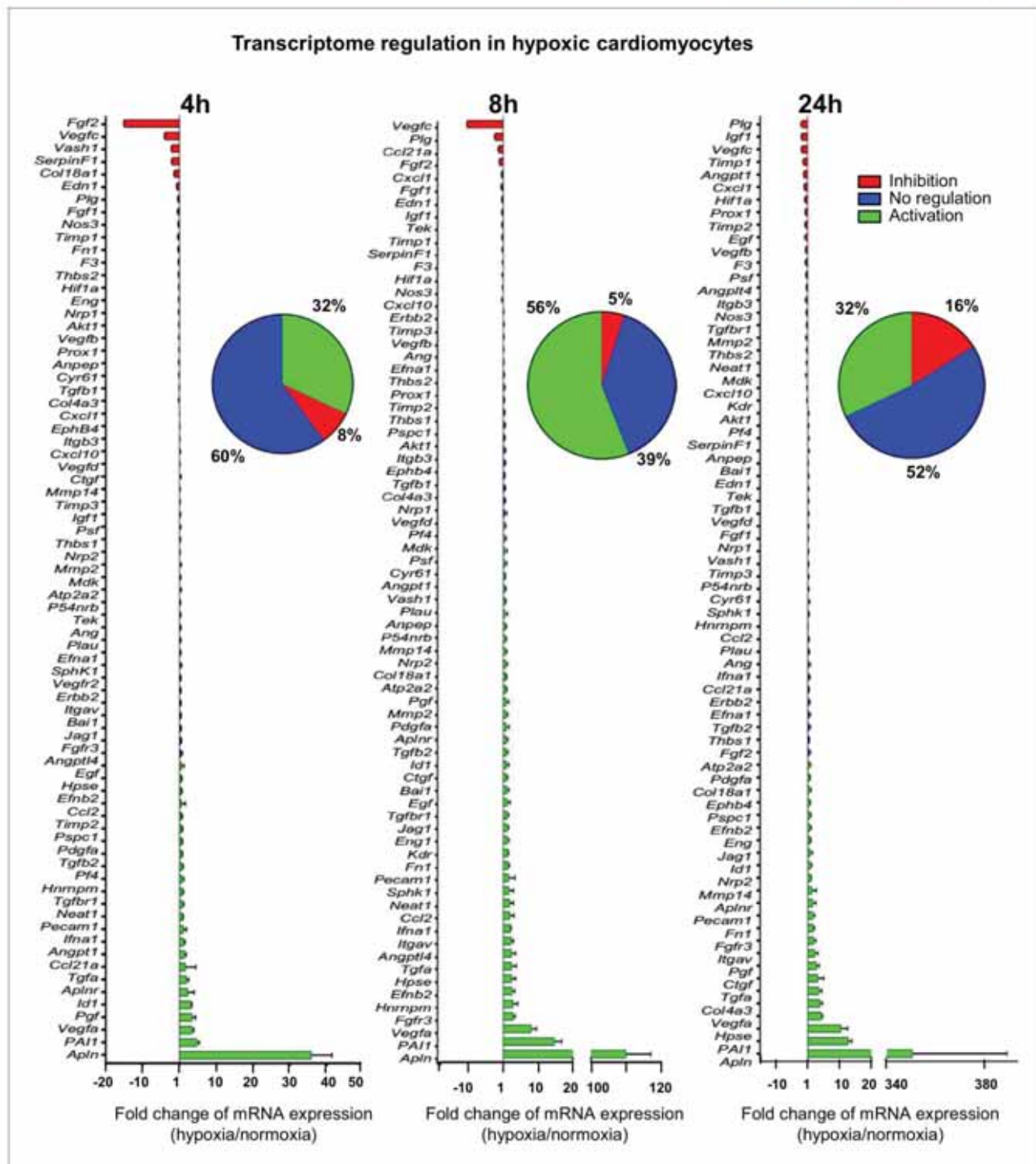


Figure 1. (Lymph)angiogenic genes are not drastically induced at the transcriptome level in hypoxic cardiomyocytes. Total RNA was purified from HL-1 cardiomyocytes submitted to increasing durations (from 5 min to 24 hr) of hypoxia at 1% O₂, as well as from normoxic cardiomyocytes as a control. cDNAs were synthesized and used for a Fluidigm delta gene PCR array dedicated to genes related to (lymph)angiogenesis or stress (Supplementary file 6). Analysis was performed in three biological replicates (cell culture well and cDNA), each of them measured in three technical replicates. Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

replicates (PCR reactions). Relative quantification (RQ) of gene expression during hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to 18S rRNA and to normoxia. mRNA levels are presented as histograms for the times of 4 hr, 8 hr and 24 hr, as the fold change of repression (red) or induction (green) normalized to normoxia. Non-regulated mRNAs are represented in blue. The threshold for induction was set at 1.5. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as $-1/RQ$. The percentage of repressed, induced, and non-regulated mRNAs is indicated for each duration of hypoxia. For shorter durations of 5 min to 2 hr, the percentages are shown in *Figure 1—figure supplement 1*. The detailed values for all of the durations of hypoxia are presented in *Supplementary file 1*.

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

Figure supplement 1. Transcriptome of regulation in hypoxic cardiomyocytes.

lymphangiogenic factors, such as FGF2 and VEGFC, were strongly decreased after 4 hr or 8 hr of hypoxia. These data indicate that the transcriptional response to hypoxia in cardiomyocytes is not the major mechanism controlling the expression of (lymph)angiogenic factors, suggesting that post-transcriptional mechanisms are involved.

mRNAs of most (lymph)angiogenic genes are recruited into polysomes in hypoxic cardiomyocytes

On the basis of the fact that mRNAs that are present in polysomes are actively translated, we tested the hypothesis of translational induction by analyzing the recruitment of mRNAs into polysomes. This experiment was performed in early and late hypoxia. The polysome profile showed that translational activity in normoxic HL-1 cells was low but decreased after 4 hr of hypoxia, with a shift of the polysome to monosome ratio from 1.55 to 1.40 (*Figure 2A*). Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) appeared as a single band and its phosphorylation profile did not change upon hypoxia, suggesting that this protein is already hypophosphorylated in normoxia in these cells (*Figure 2—figure supplement 1A and B*). By contrast, translation blockade was confirmed by the strong phosphorylation of eIF2 α (*Figure 2B, Figure 2—figure supplement 1C*). 94% of the genes of the (lymph)angiogenic array showed a more sustained recruitment into polysomes under hypoxic conditions (*Figure 2C, Supplementary file 2*). This translational induction not only targets genes that encode major angiogenic factors and their receptors (e.g. *Vegfa*, *Fgf1*, *Pdgfa*, *Fgfr3*, *Vegfr2*), but also genes involved in cardiomyocyte survival in ischemic heart (*Igf1*, *Igf1r*) or in inflammation (*Bcl1*, *Tgfb*). These data suggest that, in cardiomyocytes, the main response of (lymph) angiogenic genes to early hypoxia is not transcriptional, but translational.

IRES-containing mRNAs are more efficiently mobilized into polysomes under hypoxic conditions

IRES-dependent translation has been reported to drive the translation of several mRNAs in stress conditions (Morfoisse et al., 2014; Holcik and Sonenberg, 2005; Conte et al., 2008; Morfoisse et al., 2015). Thus, we focused on the regulation of the different IRES-containing mRNAs present in the Fluidigm array (*Figure 3*). Interestingly, the only IRES-containing mRNA to be significantly induced by hypoxia at the transcriptome level was *Vegfa* (*Figure 3A and Figure 3—figure supplement 1*). Expression of the apelin receptor gene (*Aplnr*), which is presumably devoid of IRES but transcriptionally induced during hypoxia, is also shown for comparison.

The polysome recruitment of these IRES-containing mRNAs is shown in *Figure 3B*. Clearly, *Fgf1*, *Vegfa*, *Vegfd*, *Cyr61*, *Hif1a* and *Igf1r* mRNAs were recruited into polysomes under hypoxia, accumulating to levels 2 to 3 times those in normoxia, suggesting an important induction in terms of translation. By contrast, the recruitment of *Aplnr* mRNA into polysomes decreased about three times. The data are not available for *Fgf2* and *Vegfc* mRNAs, which were not detectable. These results indicate that hypoxia in cardiomyocytes, although blocking global cap-dependent translation, induces the translation of all detectable IRES-containing angiogenic factor mRNAs. This mechanism occurs as soon as 4 hr after oxygen deprivation, thus corresponding to an early event in the hypoxic response.

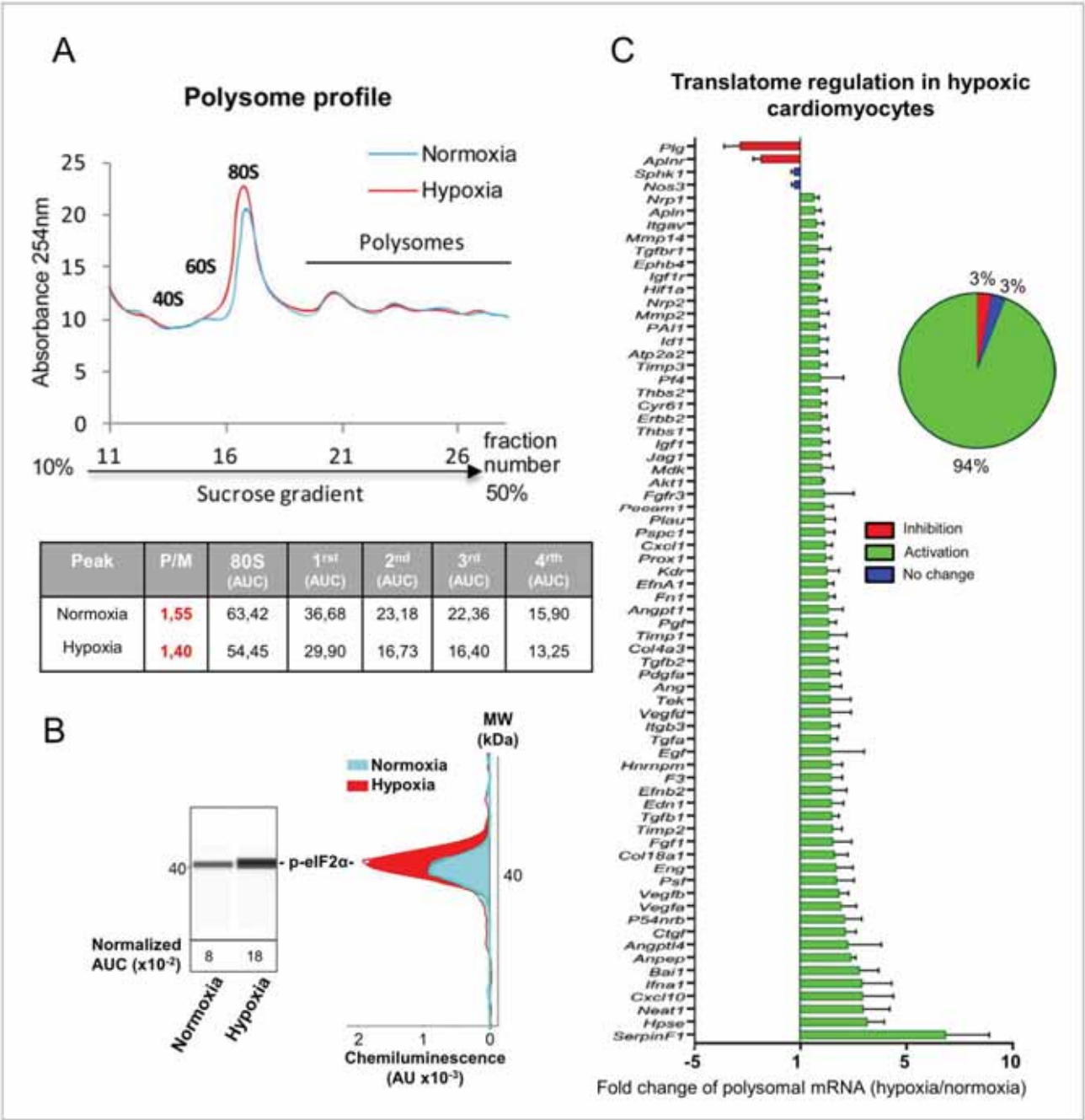


Figure 2 continued

and PCR arrays were performed as in Figure 1. Polysomes profiles are presented for normoxic and hypoxic cardiomyocytes. Relative quantification (RQ) of gene expression during hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to 18S rRNA and to normoxia. mRNA levels (polysomal RNA/total RNA) are shown as fold change of repression (red) or induction (green) in hypoxia normalized to normoxia as in Figure 1C. The threshold for induction was set at 1.5. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as $-1/RQ$. The detailed values are available in Supplementary file 2.

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

Figure supplement 1. Capillary electrophoresis immunodetection of 4E-BP1 and eIF2 α .

IRESs of (lymph)angiogenic factor mRNAs are activated during early hypoxia

To confirm that the polysome recruitment of IRES-containing mRNAs actually corresponds to a stimulation of IRES-dependent translation, IRESs from FGF and VEGF mRNAs were introduced into a bicistronic dual luciferase gene expression cassette (Figure 4A). Two IRESs from non-angiogenic mRNAs, c-myc and EMCV IRESs, were used as controls. A negative control without IRES was provided by a hairpin inserted between the two cistrons (Créancier et al., 2000). The well-established bicistronic vector strategy, previously validated by us and others, allows the measurement of IRES activity, which is revealed by expression of the second cistron, LucF (Morfoisse et al., 2014; Créancier et al., 2000). The bicistronic cassettes were subcloned into lentivectors because HL-1 cells are not efficiently transfected by plasmids but can be easily transduced by lentivectors, with an efficiency of more than 80% (not shown). HL-1 cardiomyocytes were first transduced with the lentivector containing the FGF1 IRES and the kinetics of IRES-dependent translation and protein expression were then examined after between 1 hr and 24 hr of hypoxia. Luciferase activities were measured from cell extracts and IRES activities were reported as the LucF/LucR luminescence ratio.

Data showed an increase in IRES activity between 4 hr and 8 hr of hypoxia whereas this activity decreased between 16 hr and 24 hr of hypoxia (Figure 4B). The expression of endogenous FGF1 was analyzed after 8 hr of hypoxia. FGF1 protein quantification (normalized to total proteins) showed that IRES induction correlates with an increased expression of FGF1 protein (Figure 4C). This is also consistent with the increase of FGF1 mRNA recruitment into polysomes observed above (Figure 3B, Supplementary file 2). To determine whether this transient induction could affect other IRESs, HL-1 cells were then transduced by the complete series of lentivectors described above (Figure 4A) and submitted to 4, 8 or 24 hr of hypoxia. Results showed an increase in all FGF and VEGF IRES activities in early hypoxia, except for VEGFA IRESa (4 hr and/or 8 hr), whereas the c-myc and EMCV IRESs were activated only in late hypoxia after 24 hr (Figure 4D). By contrast, VEGFA and VEGFD IRES activities decreased after 24 hr of hypoxia. The hairpin control was not induced (Supplementary file 3J). These data revealed two groups of IRESs: a first group including IRESs from (lymph)angiogenic growth factor mRNAs (except for VEGFA IRESa) that are activated during early hypoxia, and a second group including 'non-angiogenic' c-myc and EMCV IRESs, which are activated in late hypoxia.

Identification of IRES-bound proteins in hypoxic cardiomyocytes reveals vasohibin1 as a new RNA-binding protein

Early activation of angiogenic factor IRESs during hypoxia suggested that specific ITAFs may be involved between 4 and 8 hr of hypoxia. In an attempt to identify such ITAFs, we used the biomolecular analysis coupled to mass spectrometry (BIA-MS) technology, which had been validated for ITAF identification in two previous studies (Morfoisse et al., 2016; Ainaoui et al., 2015). Biotinylated RNAs corresponding to FGF1 (early activation), VEGFAa (no activation) and EMCV IRESs (late activation) were used as probes for BIA-MS. Hooked proteins from normoxic and hypoxic HL-1 cells were then recovered and identified (Figure 5A–B, Supplementary file 4). Surprisingly, except for nucleolin bound to VEGFAa and EMCV IRES in normoxia, no known ITAF was identified as being bound to these IRESs in normoxia or in hypoxia. Interestingly, besides several proteins unrelated to (lymph)angiogenesis, we detected the presence of vasohibin1 (VASH1), a protein described as an endothelial cell-produced angiogenesis inhibitor and for its role in stress tolerance and cell survival (Figure 5C) (Sato, 2012; Sato, 2015). This secreted protein has never been reported to have any RNA-binding activity. VASH1 interaction with the FGF1 IRES was detected

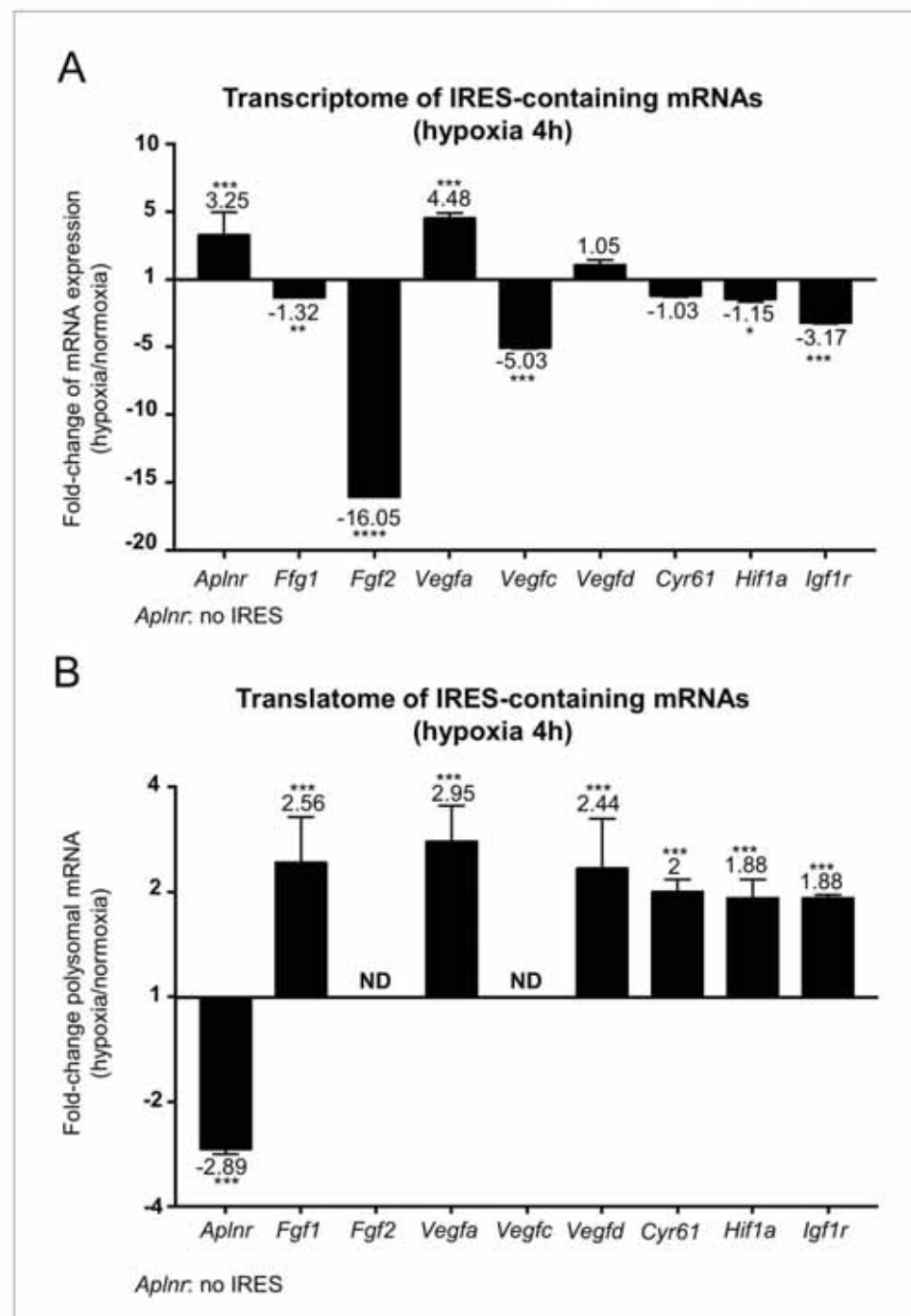


Figure 3. IRES-containing mRNAs are more efficiently associated with polysomes in hypoxic conditions. (A, B) RQ values for the IRES-containing mRNA transcriptome (A) and translome (B) extracted from the PCR arrays shown in Figures 1 and 2. The gene *Aplnr* (apelin receptor) was chosen as a control without an IRES. *Vegfc* and *Fgf2* mRNAs, which are repressed in the transcriptome, were below the detection threshold in polysomes (ND). Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation, with values for hypoxia compared to those for normoxia by a bilateral Student's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. Transcriptome of IRES-containing mRNAs in hypoxic cardiomyocytes.

after 4 hr or 8 hr of hypoxia, but not under normoxia (*Supplementary file 4*). This protein also interacted with the EMCV IRES both in normoxia and in hypoxia but not with the VEGFA IRES. In order to address the RNA-binding potential of VASH1, we performed an *in silico* analysis of VASH1 protein sequence that predicted two conserved RNA-binding domains (RBD) in the N- and C-terminal parts of the full-length protein, respectively (*Figure 5C*, *Figure 5—figure supplement 1A and B*). The direct interaction of VASH1 with FGF1, VEGFAa and EMCV IRESs was assessed by surface plasmon resonance using the full-length recombinant 44-kDa protein, resulting in the measurement of affinity constants of 6.5 nM, 8.0 nM and 9.6 nM, respectively (*Figure 5D–F*). These data indicate that VASH1 exhibits a significant RNA-binding activity.

Vasohibin1 is translationally induced in early hypoxia and is localized in nuclear and cytoplasmic foci

VASH1 has been previously described for its expression in endothelial cells but never in cardiomyocytes (Sato, 2012). The present BIA-MS study provides evidence that it is expressed in HL-1 cardiomyocytes (*Supplementary file 4*). We analyzed the regulation of VASH1 expression during hypoxia: *Vash1* mRNA level strongly decreases after 4 hr of hypoxia whereas it is slightly upregulated after 8 hr (*Supplementary file 1*, *Figure 6A*). By contrast, analysis of *Vash1* mRNA recruitment into polysomes showed a strong increase at 4 hr of hypoxia (about 7-fold) (*Figure 6B*), whereas *Vash1* mRNA was not detectable in polysomes after 24 hr of hypoxia (*Supplementary file 2*). This indicates that *Vash1* mRNA translation is strongly induced in early hypoxia. This was confirmed by capillary Simple Western immunodetection, which showed that VASH1 protein expression increases after 4 hr of hypoxia (*Figure 6C*). Moreover, VASH1 subcellular localization was analyzed by immunocytochemistry: VASH1 appeared as foci in both cytoplasm and nucleus (*Figure 6D*). The number of foci did not change, but their size significantly increased in hypoxia (*Figure 6E and F*).

Vasohibin1 is a new ITAF that is active in early hypoxia

The putative ITAF function of VASH1 was assessed by a knock-down approach using an siRNA smartpool (siVASH1). Transfection of HL-1 cardiomyocytes with siVASH1 was able to knock-down VASH1 mRNA with an efficiency of 73% (*Figure 7A*). The knock-down of VASH1 protein measured by capillary Western was only 59% (*Figure 7B*). This moderate knock-down efficiency was probably due to the long half-life of VASH1, superior to 24 hr (*Figure 7—figure supplement 1*). The effect of VASH1 knock-down was analyzed in HL-1 cells transduced with different IRES-containing bicistronic lentivectors in normoxia or after 8 hr of hypoxia. In normoxia, VASH1 knock-down generated a moderate increase of activity for several IRESs (13–16%), which was significant for VEGFD and EMCV IRESs (*Figure 7C*). By contrast, in hypoxia, VASH1 knock-down resulted in a strong decrease of FGF1 IRES activity, by 64%, whereas it did not significantly affect the other IRESs (*Figure 7D*). These data showed that VASH1 behaves as an activator of FGF IRES in hypoxia, whereas it tends to inhibit several IRESs in normoxia (*Figure 7C*).

Vasohibin1 has a wide impact on the recruitment of (lymph) angiogenesis mRNAs into polysomes

In order to evaluate the possibility of a wider role for VASH1 in translational control, the (lymph) angiogenic factor mRNA polysome profile was analyzed in siVASH1-treated HL-1 cells in normoxia and after 8 hr of hypoxia (*Figure 8*, *Supplementary file 7*). VASH1 knock-down strongly affected the mobilization into polysomes of IRES-containing mRNAs, in normoxia and in hypoxia: *Vegfd* mRNA recruitment increased in normoxia, in concordance with the data shown in *Figure 7C*. *Igf1r* mRNA recruitment into polysomes decreased in hypoxia, whereas recruitment of *Hif1a* and *Vegfa* mRNAs increased. Unfortunately, *Fgf1* and *Vegfd* mRNAs were not detected in hypoxia, whereas *Fgf2* and *Vegfc* mRNAs were detected neither in normoxia nor in hypoxia in this array experiment, probably because they are poorly expressed. Globally, VASH1 depletion activated the polysome

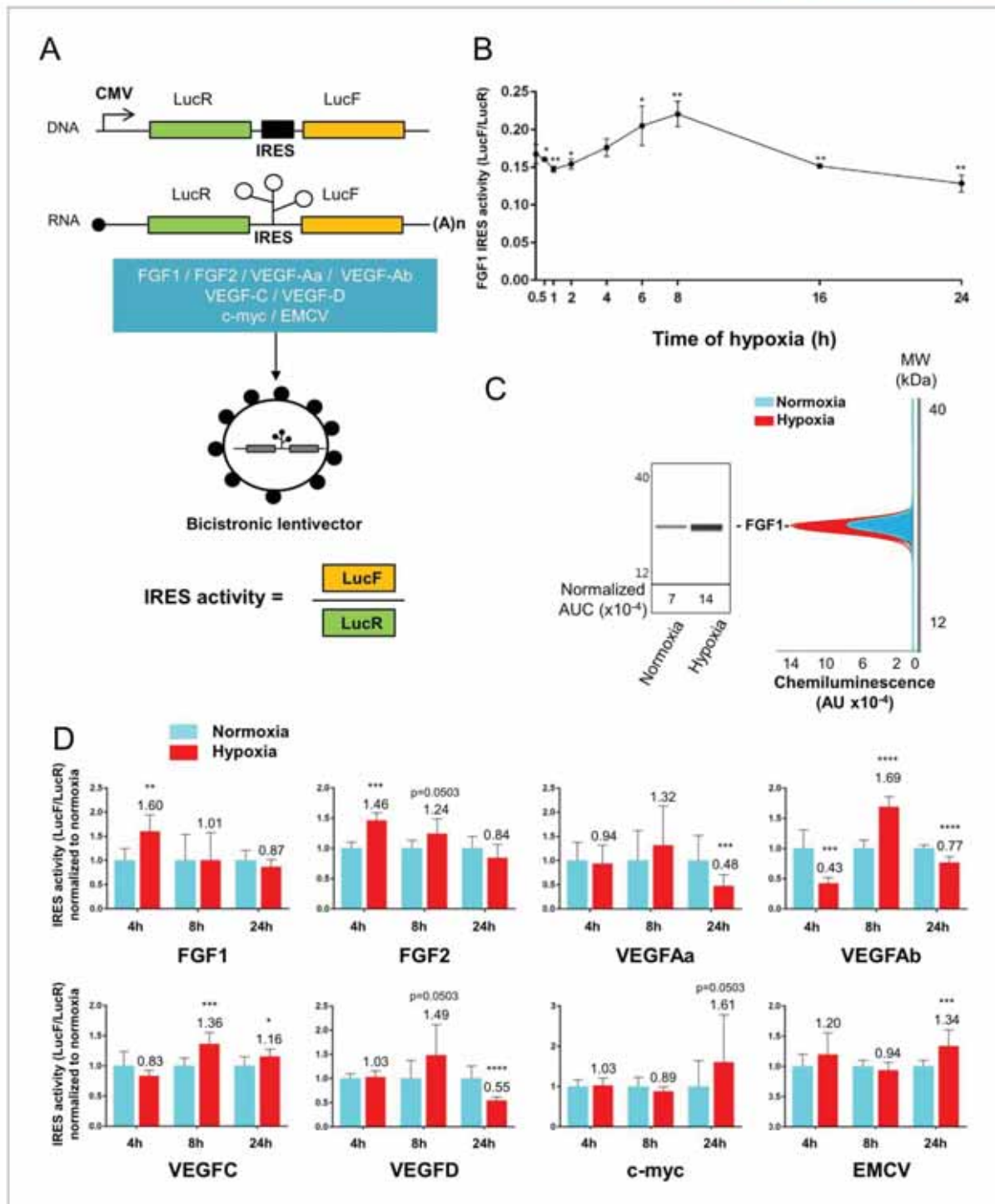


Figure 4. IRESs from (lymph)angiogenic factor mRNAs are activated in early hypoxia. (A–D) To measure IRES-dependent translation during hypoxia, HL-1 cardiomyocytes were transduced with bicistronic dual luciferase lentivectors (termed ‘Lucky-Luke’) containing different IRESs cloned between the genes of renilla (LucR) and firefly (LucF) luciferase (A). In bicistronic vectors, the translation of the first cistron LucR is cap-dependent, whereas translation of the second cistron LucF is IRES-dependent (Créancier et al., 2000). Cardiomyocytes transduced by the CRF1AL+ lentivector Lucky-Luke reporter

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

containing FGF1 IRES were submitted to a hypoxia time-course (0 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 16 hr and 24 hr) and data from each time point were compared to those from normoxia with a non-parametric Mann-Whitney test (B). Endogenous FGF1 protein expression was measured by Jess capillary Simple Western of extracts of cardiomyocytes in normoxia or those submitted to 8 hr of hypoxia (normalized to Jess quantification of total proteins as described in 'Materials and methods'). Three independent experiments were performed; a representative experiment is shown (C). HL-1 cardiomyocytes transduced by different Lucky-Luke constructs were submitted to 4 hr, 8 hr or 24 hr of hypoxia and their luciferase activities were measured. IRES activities during hypoxia, expressed as LucF/LucR ratio, are normalized to those during normoxia. Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation of the mean, data from hypoxic cardiomyocytes compared to those from normoxic cardiomyocytes with a non-parametric Mann-Whitney (M-W) test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. For each IRES, the mean was calculated from nine cell culture biological replicates, each of them being 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 3*. A no-IRES control was also used and values are presented in *Supplementary file 3J*.

recruitment of 22% and 44% of the detected mRNAs in normoxia and in hypoxia, respectively, whereas it inhibited the recruitment into polysomes of 41% versus 29% of detected mRNAs. Although this approach does not provide information about the mechanism of action, it strongly suggests a wide impact of VASH1, direct or indirect, on translation control. Furthermore, these data confirm that VASH1 has a dual role and can be either an activator or an inhibitor of translation.

Discussion

The present study highlights the crucial role of translational control in cardiomyocyte response to hypoxia. Up to now, although a few genes had been described for their translational regulation by hypoxia, it was thought that most genes are transcriptionally regulated. Here, we show that translational control, revealed by mRNA recruitment into polysomes during hypoxia, regulates the majority of the genes involved in angiogenesis and lymphangiogenesis. IRES-dependent translation appears to be a key mechanism in this process, as we show that most of the (lymph)angiogenic mRNAs that are known to contain an IRES are upregulated during hypoxia. Furthermore, our data reveal that IRESs of angiogenic factor mRNAs are activated during early hypoxia, whereas the IRESs of non angiogenic mRNAs are activated in late hypoxia. We have identified an angiogenesis- and stress-related protein, VASH1, as a new ITAF that is responsible for the activation of the FGF1 IRES in early hypoxia, whereas it tends to inhibit other IRES activities in normoxia. VASH1 depletion has a positive or negative impact on the recruitment of many (lymph)angiogenesis mRNAs into polysomes, suggesting that this protein is widely involved, directly or not, in translational control in response to stress.

Pathophysiological impact of a moderate stimulation of translation

A striking feature of our data is that the stimulation of IRES activities by hypoxia in cardiomyocytes is moderate, only by 1.3–1.7-fold. Are such small changes in growth factor expression sufficient to alter cellular programs? Several reports demonstrate that the answer is affirmative. An example is VEGFC IRES activation by hypoxia previously shown in tumor cells (Morfoisse *et al.*, 2014). A 2–3-fold increase in endogenous VEGFC expression has a drastic effect on lymphatic vessel growth. In another study, a 2-fold increase in VEGFD IRES activity resulting from heat shock was sufficient to increase lymphatic vessel diameter (Morfoisse *et al.*, 2016). The FGF1 IRES is activated by 1.7–2-fold during myoblast differentiation, and this is sufficient to promote myotube formation controlled by FGF1 (Ainaoui *et al.*, 2015). We have also observed that cellular IRESs have often been reported previously to have a moderate activity in cell culture, whereas they can be much more active than a viral IRES and drastically regulated *in vivo* (Créancier *et al.*, 2000). This can be explained by the use of cells that are immortalized and not in their physiological environment, which renders them less sensitive to stimuli than cells *in vivo*. Globally, cellular IRESs show a lower degree of activation than viral IRESs, as illustrated by Braunstein *et al.* (2007), who report that the HIF1 α IRES is stimulated by 1.6-fold during hypoxia, whereas the VEGFA IRES is stimulated by 2-fold and the EMCV IRESs by 3.5-fold.

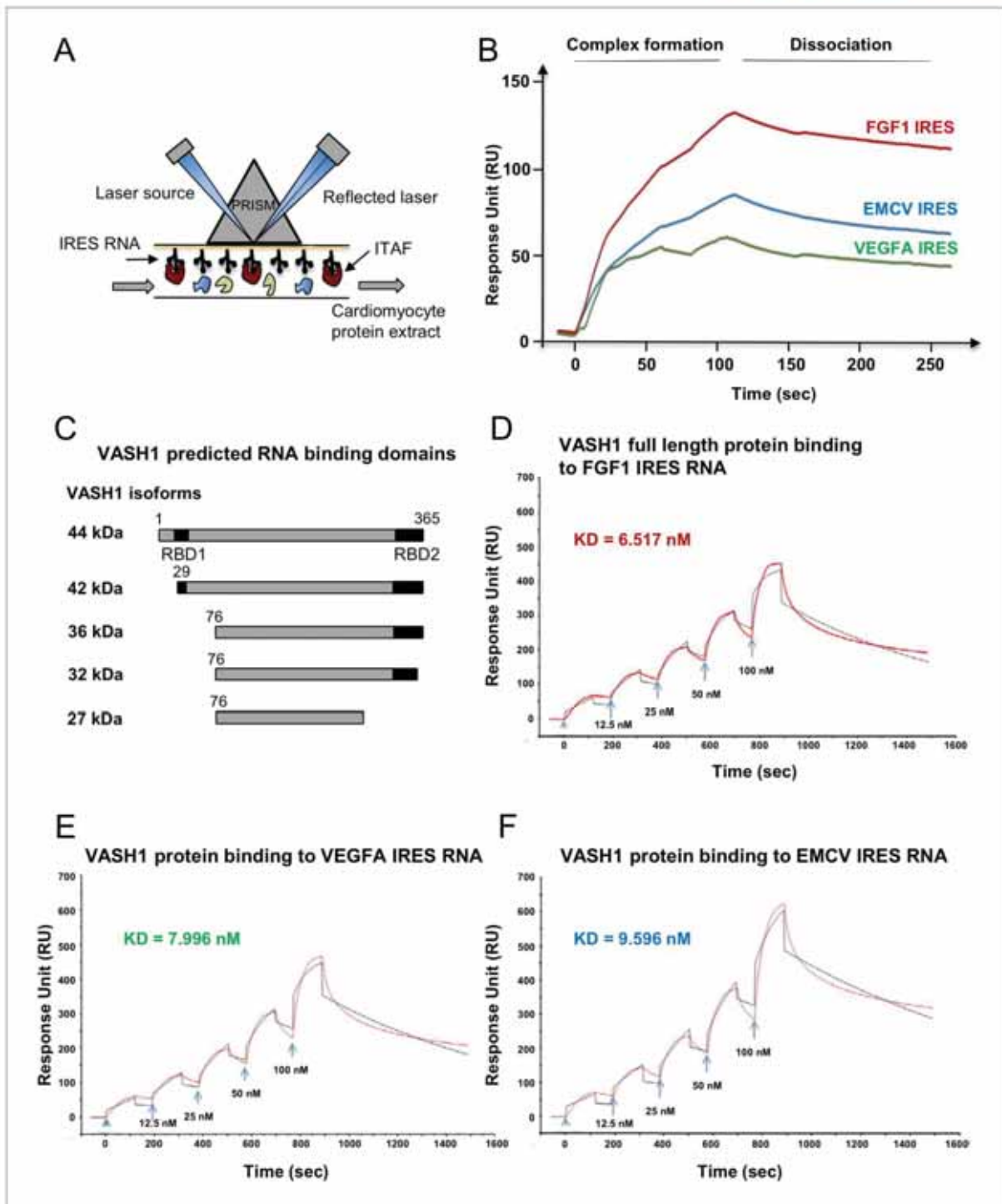


Figure 5. Identification of IRES-bound proteins in hypoxic cardiomyocytes reveals vasohibin1 as a new RNA-binding protein. (A–F) Biotinylated IRES RNAs were transcribed in vitro and immobilized on the sensorchip of the BIAcore T200 optical biosensor device (A). Total cell extracts from normoxic or hypoxic HL-1 cardiomyocytes were injected into the device. Complex formation and dissociation were measured (see 'Materials and methods') (B). Bound proteins were recovered as described in 'Materials and methods', and identified by mass spectrometry (LC-MS/MS) after tryptic digestion. The Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

list of proteins bound in normoxia and hypoxia to FGF1, VEGFAa and EMCV IRESs is shown in *Supplementary file 4*. VASH1 protein was identified as being bound to FGF1 (hypoxia) and EMCV IRESs (hypoxia and normoxia), but not to VEGFA IRES. A diagram of VASH1 RNA-binding properties is shown, with VASH1 isoforms described by *Sonoda et al. (2006)* (C). The predicted RNA-binding domains (RBD1 and RBD2) shown in *Figure 5-figure supplement 1* that are conserved in mouse and human (C). Recombinant full-length 44-kDa VASH1 was injected into the Biacore T200 device containing immobilized FGF1 (D), VEGFAa (E) or EMCV (F) IRES as above. The affinity constants (KD) were calculated (D–F) with a single cycle kinetics (SCK) strategy.

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

Figure supplement 1. Conservation of predicted RNA-binding domains in mouse and human vasohibin-1.

Translational control in tumoral versus non-tumoral hypoxia

Most studies of gene expression in response to stress have been performed at the transcriptome level in tumoral cells of different origins, whereas the present study is focused on cardiomyocytes. HL-1 cardiomyocytes are immortalized but still exhibit the beating phenotype (*Claycomb et al., 1998*). Thus, this cell model, although not perfectly mimicking cardiomyocyte behavior in vivo, is still close to a physiological state. The strong translational response to hypoxia revealed by our data, which differs from the transcriptional response usually observed in tumor cells, may reflect mechanisms occurring in cells that are not engaged in the cell transformation process leading to cancer, or at least not too far along this process. Indeed, HL-1 cells respond to hypoxia very early, whereas the various murine or human tumor cell lines described in other reports require a longer period of hypoxia for IRES-dependent translation to be stimulated. In human breast cancer BT474 cells, VEGFA, HIF and EMCV IRESs are all activated after 24 hr of hypoxia (*Braunstein et al., 2007*). In murine 4T1 and LLC cells (breast and lung tumor, respectively), as well as in human CAPAN-1 pancreatic adenocarcinoma, the VEGFA and VEGFC IRESs are activated after 24 hr of hypoxia whereas the EMCV IRES is not activated (*Morfoisse et al., 2014*). The same observation of late activation in 4T1 cells has been made for the FGF1 IRES, whereas this IRES is activated in early hypoxia in HL-1 cardiomyocytes (AC Godet and AC Prats, unpublished data) (*Figure 4*). These observations suggest that many tumoral cell lines that develop resistance to hypoxia are not able to govern subtle the regulations of gene expression in early hypoxia observed in HL-1 cells.

VASH1, an ITAF of early hypoxia

We also consider the hypothesis that the important process of translational regulation observed in our study may be cardiomyocyte-specific. In such a case, IRES-dependent translation would depend on cell-type-specific ITAFs as well as the early response to hypoxia. These results are of great importance in regard to the acute stress response in ischemic heart that is necessary for recovery. By contrast, a delayed chronic response is known to be deleterious for heart healing (*Silvestre et al., 2008*). In agreement with this hypothesis, VASH1 expression is cell-type-specific: described up to now as endothelial-specific, this protein is not expressed in tumoral cells (*Sato, 2012*). In the present study, we show that this cell-type specificity extends to cardiomyocytes. Consistent with our data, VASH1 has been described as a key actor in striated muscle angio-adaptation (*Kishlyansky et al., 2010*). This protein may thus have a role in the early hypoxic response in a limited number of cell types. The ITAF role of VASH1 identified here is physiologically relevant if one considers the function of VASH1 in angiogenesis and stress tolerance (*Sato, 2015*). According to previous reports, VASH1 is induced during angiogenesis in endothelial cells and halts this process, but its overexpression also renders the same cells resistant to senescence and cell death induced by stress (*Sato, 2015*). Furthermore, it has been reported that VASH1 is induced after 3 hr of cell stress at the protein level but not at the transcriptional level in endothelial cells (*Miyashita et al., 2012*). This is in agreement with our observation in cardiomyocytes where VASH1, although downregulated in the transcriptome in early hypoxia, is more efficiently recruited in polysomes at the same time (*Figure 6*).

It is noteworthy that VASH1 itself seems to be induced translationally by stress (*Figure 6*) (*Miyashita et al., 2012*). In endothelial cells, *Miyashita et al. (2012)* report that the protein HuR

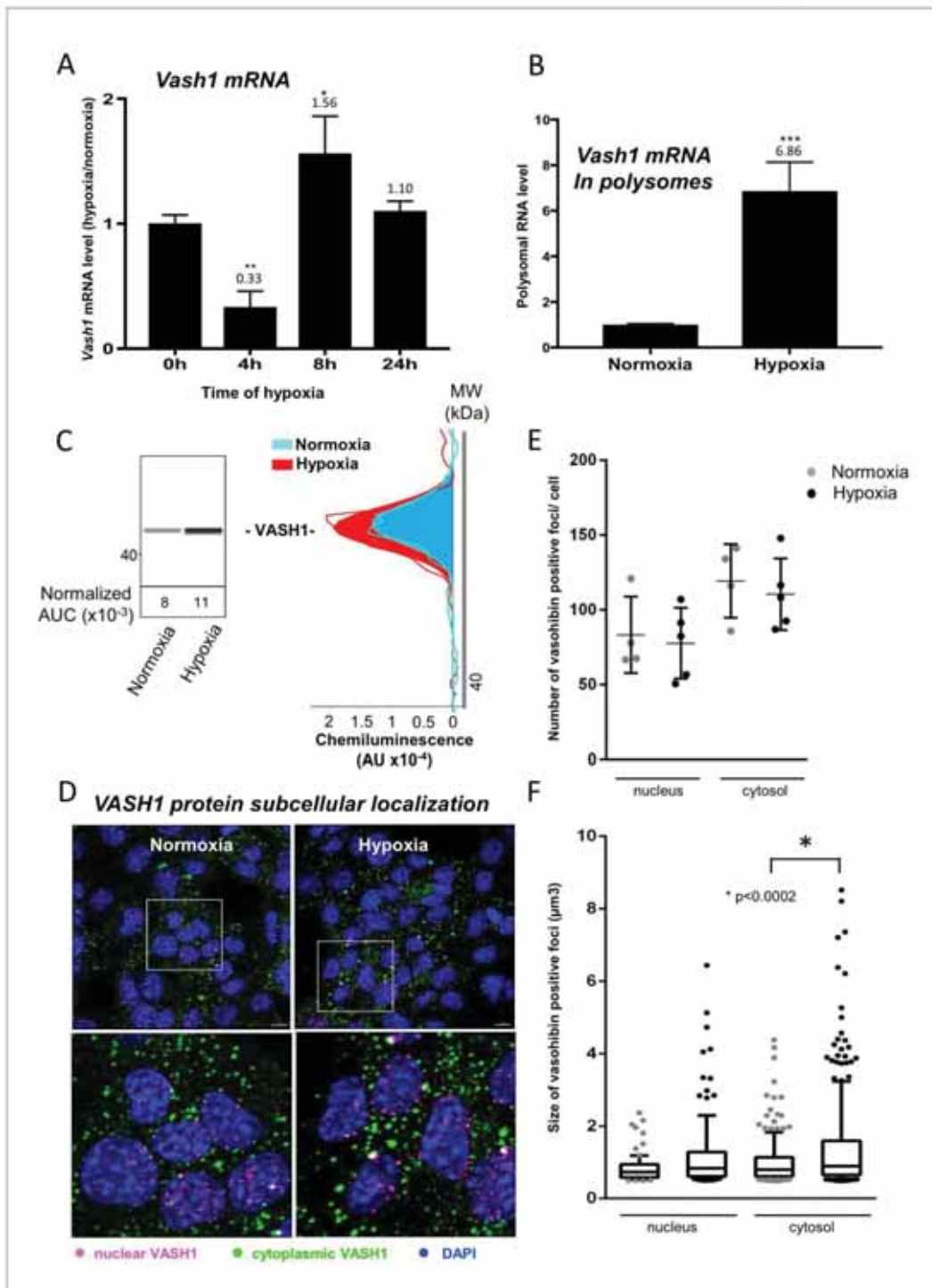


Figure 6. Vasohibin1 is translationally induced in early hypoxia and is localized in nuclear and cytoplasmic foci. (A–D) VASH1 expression was analyzed in HL-1 cardiomyocytes subjected to hypoxia at the transcriptome and translome levels. A fluidigm RT qPCR array (Supplementary file 2) was performed with two biological replicates (cell culture and cDNA), each of them measured in two technical replicates (PCR reactions). Detailed values at 4 hr and 24 hr are presented in Supplementary file 2. As for Figure 2, total RNA was purified from the cell lysate of cardiomyocytes in normoxia or hypoxia. Figure 6 continued on next page

Figure 6 continued

submitted to 4 hr, 8 hr or 24 hr of hypoxia (A). Polysomal RNA was purified from cardiomyocytes in normoxia or after 4 hr of hypoxia, from pooled heavy fractions containing polysomes (fractions 19–27) (B). Histograms correspond to mean $\pm$ standard deviation of the mean, with two-tailed t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ used to compare data from hypoxic and normoxic cardiomyocytes. VASH1 protein expression was measured by capillary Simple Western of extracts from cardiomyocytes in normoxia or submitted to 4 hr of hypoxia (C). VASH1 was immunodetected in HL-1 cardiomyocytes in normoxia or after 4 hr of hypoxia (D). DAPI staining allows to detect VASH1 nuclear localization (MERGE). VASH1 foci in the nucleus are shown in purple and those in the cytoplasm in green using Imaris software. The number of VASH1 foci was quantified in the nucleus and in the cytoplasm in normoxia and after 4 hr of hypoxia ($n = 4$ –5 images with a total cell number of 149 in normoxia and 178 in hypoxia) (E). Boxplots of volume of vasohibin foci in normoxia and hypoxia (F). All foci above $0.5 \mu\text{m}^3$ were counted. Whiskers mark the 10% and the 90% percentiles with the mean in the center. One-way Anova with Tukey's comparisons test was applied.

upregulates VASH1 by binding to its mRNA. HuR may bind to an AU-rich element present in the 3' untranslated region of the VASH1 mRNA. However, in other studies, HuR has also been described as an ITAF, thus it is possible that VASH1 itself may be induced by an IRES-dependent mechanism (Godet et al., 2019; Durie et al., 2011; Galbán et al., 2008).

The anti-angiogenic function of VASH1 may appear inconsistent with its ability to activate the IRES of an angiogenic factor. However, our data also suggest that VASH1 might be an activator or an inhibitor of (lymph)angiogenic factor mRNA translation. Such a double role may explain the unique dual ability of VASH1 to inhibit angiogenesis and to promote endothelial cell survival (Sato, 2015; Miyashita et al., 2012). This could result from the existence of different VASH1 isoforms of 44 kDa, 42 kDa, 36 kDa, 32 kDa and 27 kDa, resulting from alternative splicing and/protein processing (Kishlyansky et al., 2010; Kern et al., 2008; Sato, 2013; Sonoda et al., 2006). Interestingly, p42 and p27 are the main isoforms expressed in heart, where the p44 is undetectable (Kishlyansky et al., 2010; Sonoda et al., 2006). One can expect that the ITAF function is carried by p42, which contains the two predicted RNA-binding domains (Figure 5C, Figure 5—figure supplement 1). VASH1 has been observed in both the nucleus and the cytoplasm, and no striking nucleocytoplasmic relocalization is visible in response to hypoxia, whereas other ITAFs (such as hnRNP1 or nucleolin) shuttle to the cytoplasm upon stress (Godet et al., 2019; Morfaisse et al., 2016; Lewis et al., 2007; Cammas et al., 2007; Dobbryn et al., 2008). Interestingly, VASH1, appears as foci whose size increases in hypoxia, suggesting that it could be partly translocated to stress granules. This translocation has been reported for other ITAFs, such as hnRNP1 and polypyrimidine-tract-binding protein (PTB) (Godet et al., 2019; Borghese and Michiels, 2011; Guil et al., 2006).

VASH1 impact on translational control can be positive or negative

Among the IRESs analyzed in the present study, the FGF1 IRES is the only one strongly regulated by VASH1 in hypoxia. However, VASH1 was also bound to the EMCV IRES in the BIA-MS experiment, and calculation of affinity constants does not reveal significant differences in affinity for FGF1, VEGFA or EMCV IRES. This apparent inconsistency finds an explanation if one considers the effect of VASH1 in normoxia: IRESs tend to be activated upon VASH1 depletion, significantly so for VEGFD and EMCV IRESs. Such data suggest that VASH1 binding is probably not specific to a given IRES, but instead that different VASH1 partners are recruited in the IRESome and result in positive or negative effects of this ITAF. The hypothesis of a dual role for VASH1 in translational control is confirmed by the effect of VASH1 depletion on the translome: recruitment into polysomes is affected negatively or positively for 60–70% of mRNAs, both in normoxia and in hypoxia. Although the RNA-binding ability of VASH1 has been clearly shown in the present study, we cannot affirm that VASH1 impact is direct for all of these mRNAs. Nevertheless, a dual role of activator and inhibitor has been reported for more than ten other ITAFs. Our hypothesis thus remains that the key to the regulation of IRES activity by ITAFs is not RNA-binding specificity but rather IRESome multi-partner composition (Godet et al., 2019).

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Gene (firefly, <i>Photinus</i>)	Luc+	Promega		Modified firefly luciferase
Gene (<i>Renilla reniformis</i>)	LucR	Promega		Renilla luciferase
Strain, strain background (<i>Escherichia coli</i>)	TOP 10	ThermoFisher Scientific		Transformation-competent cells (genotype : F ⁻ mcr A Δ (mrr ⁻ hsd RMS ⁻ mcr BC) ϕ 80lac ZΔ M15 ΔlacX 74 rec A1 ara D139 Δ (araeu) 7697 gal U gal K rps L (StrR) end A1 nup G)
Cell line (<i>Homo sapiens</i>)	293FT	Invitrogen	R700-07	High-transfection performance for lentivector production
Cell line (<i>Homo sapiens</i>)	HT1080	ATCC	CCL-121	
Cell line (<i>Mus musculus</i>)	HL-1	William C. Claycomb (Claycomb et al., 1998)		Cardiomyocyte cell line with beating phenotype
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRHL+	Dryad, Supplementary file 8A (Morfoisse et al., 2014)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by an intergenic palindromic sequence
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRF1AL+	Sequence available on Dryad, (Martineau et al., 2004; Ainaoui et al., 2015)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human FGF1 IRES A
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRFL+	Sequence available on Dryad, (Créancier et al., 2000)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human FGF2 IRES
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRVAL+	Sequence available on Dryad, (Huez et al., 1998)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human VEGFA IRESa
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRVBL+	Sequence available on Dryad, (Huez et al., 1998)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human VEGFA IRESb
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRhVCL+	Sequence available on Dryad, (Morfoisse et al., 2014)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human VEGFC IRES

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRhVDL+	Sequence available on Dryad, (Morfoisse et al., 2016)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human VEGFD IRES
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CRMP2L+	Sequence available on Dryad, (Nanbru et al., 1997)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the human c-myc IRES
Recombinant DNA reagent	pTRIP-CREL+	Sequence available on Dryad, (Créancier et al., 2000)		Bicistronic SIN lentivector construct with the CMV promoter controlling expression of LucR and Luc+ separated by the EMCV IRES
Recombinant DNA reagent	pCMV-dR8.91	Addgene		Trans-complementing plasmid containing the lentiviral protein genes (gag, pol, rev...)
Recombinant DNA reagent	pCMV-VSV-G	Addgene	#8454	Trans-complementing plasmid containing VSV G envelope protein gene
Transfected construct (mouse)	Acell SMARTpool targeting VASH1 (siVASH1)	Dharmacon		siRNA targeting VASH1 (Supplementary file 8B)
Transfected construct (mouse)	Control SMARTpool	Dharmacon		Scramble siRNA (Supplementary file 8B)
Sequence-based reagent	Deltagene assay	Fluidigm Corporation, oligonucleotide sequences available in Supplementary file 6		PCR array with 96 oligonucleotides primer couples
Antibody	Mouse monoclonal anti-VASH-1	Abcam	EPR17420	Jess Western 1:100
Antibody	Mouse monoclonal anti-VASH-1	Abcam	ab176114	IC 1:50
Antibody	Mouse monoclonal anti-FGF1-1	Abcam	EPR19989	Jess Western 1:25
Antibody	Mouse monoclonal anti-p21	Santa Cruz	sc-6546 (F5)	Jess Western 1:10
Antibody	Rabbit polyclonal anti-eIF2 α	Cell Signaling Technology	9721	Jess Western 1:50
Antibody	Mouse monoclonal anti-phospho-eIF2 α	Cell Signaling Technology	2103	Jess Western 1:50
Antibody	Rabbit polyclonal anti-4EBP-1	Cell Signaling Technology	9452	Jess Western 1:50
Antibody	Rabbit polyclonal anti-phospho-4EBP-1	Cell Signaling Technology	9451	Jess Western 1:50
Antibody	Secondary-HRP (ready to use rabbit 'detection module')	Protein Simple	DM-001	Jess Western
Antibody	Donkey anti-rabbit alexa488	Jackson Immunoresearch	711-545-152	Secondary antibody for IC
Software, algorithm	PRISM	Graphpad		Statistical analysis

Lentivector construction and production

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 in which all the predicted splice donor sites have been mutated. The cDNA sequences of the human FGF1, -2, VEGFA, -C, -D, c-myc and EMCV IRESs were introduced between the first (LucR) and the second cistron (LucF) (Vagner et al., 1995; Nanbru et al., 1997; Prats et al., 2013). 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), and 640 nt (EMCV) (Morfoisse et al., 2014; Morfoisse et al., 2016; Huez et al., 1998; Martineau et al., 2004; Vagner et al., 1995; Nanbru et al., 1997). The two IRESs of the VEGFA have been used and are called VEGFAa and VEGFAB, respectively (Huez et al., 1998). The hairpin negative control contains a 63 nt long palindromic sequence cloned between LucR and LucF genes (Supplementary file 8A). This control has been successfully validated in previous studies (Morfoisse et al., 2014; Créancier et al., 2000). 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. All vector sequences are available on Dryad (Ape format). Plasmid construction and amplification was performed in the bacteria strain TOP10 (ThermoFisher Scientific, Illkirch Graffenstaden, France).

Lentivector particles were produced using the CaCl₂ method by tri-transfection with the plasmids pCMV-dR8.91 and pCMV-VSVG, CaCl₂ 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 green fluorescent protein (GFP) and scored for GFP expression by flow cytometry analysis on a BD FACSVerser (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

Cell culture, transfection and transduction

293FT (Invitrogen R700-07) and HT1080 (ATCC CCL-121) cells were provided by Invitrogen (Villebon sur Yvette, France) and ATCC (Manassas, VA, USA), respectively. The 293FT cell line is derived from human embryonic kidney cells transformed by the simian virus 40 (SV40) large T antigen. This cell line is ideal for the production of high titers of lentivectors. HT1080 is a human transformed line expressing activated N-ras oncogene. It was used only for lentivector titration.

The two cell lines 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).

Mouse atrial HL-1 cardiomyocytes were a kind gift from Dr. William C. Claycomb (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, New Orleans) (Claycomb et al., 1998). HL-1 cells are derived from a tumor of a transgenic mouse in which expression of the SV40 large T antigen was targeted to atrial cardiomyocytes. These highly differentiated cardiomyocyte HL-1 cells can be cultured and maintain their cardiac (beating) phenotype. The authentication method is observation of the beating phenotype. As soon as the phenotype is lost, it is necessary to start again with cells from an earlier passage.

All the cell lines were tested negative for mycoplasma contamination every three months. None of them is on the list of the commonly misidentified cell lines maintained by the International Cell Line Authentication Committee.

HL-1 cells were cultured in Claycomb medium containing 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 µg/mL-100 µg/mL), 0.1 mM norepinephrine, and 2 mM L-glutamine. Cell culture flasks were pre-coated with a solution of 0.5% fibronectin and 0.02% gelatin 1 hr at 37°C (Sigma-Aldrich). To keep the HL-1 phenotype, cell culture was maintained as previously described (Claycomb et al., 1998). For hypoxia, cells were incubated at 37°C at 1% O₂. HL-1 cardiomyocytes 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 VASH1 (siVASH1) or as a non-targeting siRNA control (siControl), using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's

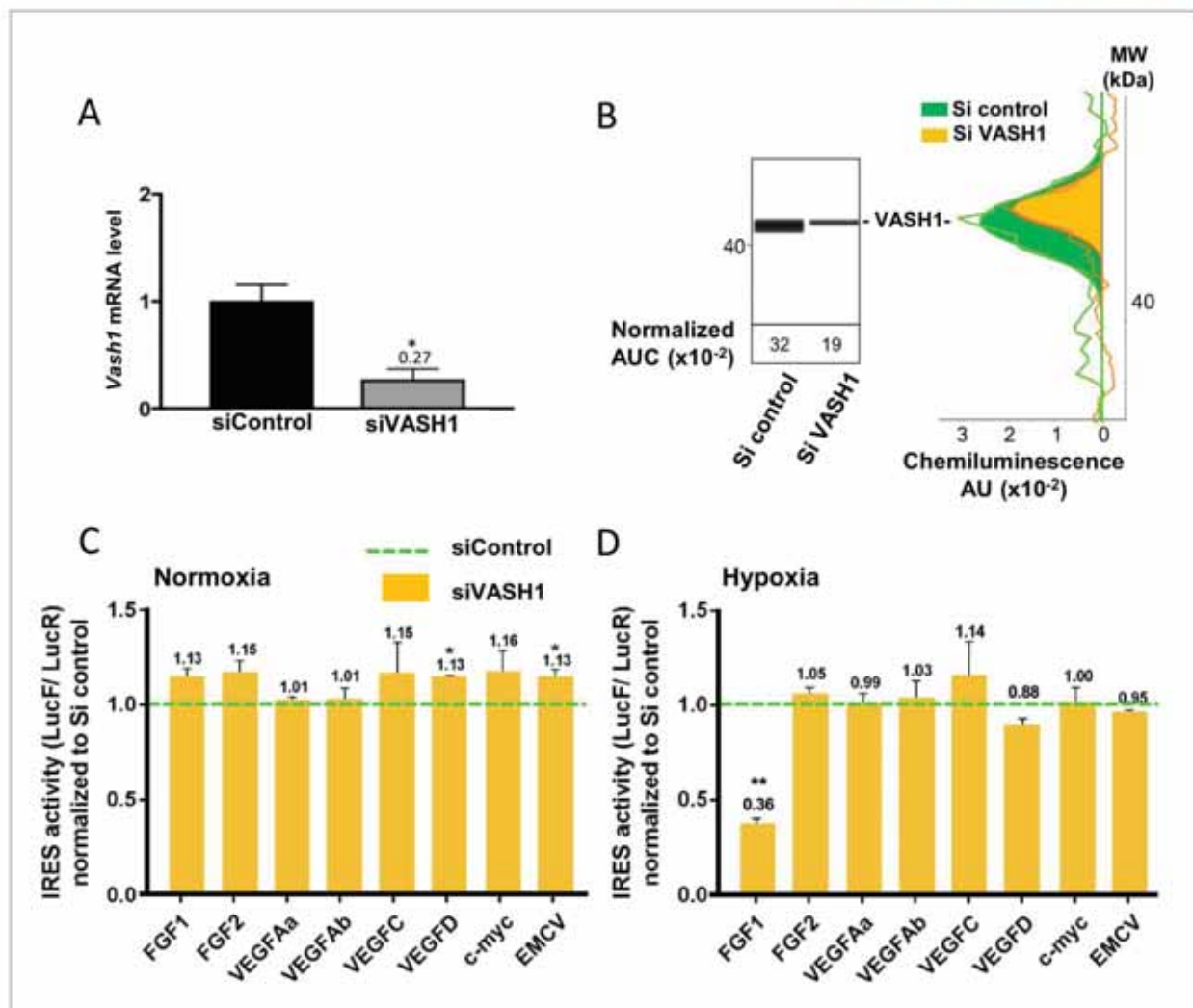


Figure 7. Vasohibin1 is a new ITAF that is active in early hypoxia. (A, B) VASH1 knock-down was performed in HL-1 cardiomyocytes using short-interfering (siRNA) smartpools targeting VASH1 (siVASH1) or control (siControl). VASH1 mRNA level was measured by RT-qPCR (A), and VASH1 protein expression was analyzed by the capillary Simple Western method using an anti-VASH1 antibody and quantified by normalization to total proteins. The experiments were reproduced twice, giving identical results. One of the two experiments is shown (B). Knock-down of VASH-1 was performed on cardiomyocytes transduced by a set of IRES-containing lentivectors used in Figure 4. (C, D) After 8 hr of hypoxia, IRES activities (LucF/LucR ratio) were measured in cell extracts from normoxic (C) and hypoxic cardiomyocytes (D). The IRES activity values have been normalized to the control siRNA. Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation of the mean, and a non-parametric Mann-Whitney test was used to identify significant change from control levels: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. For each IRES the mean was calculated for nine cell culture biological replicates, each of these being 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 5*.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 7:

Figure supplement 1. VASH1 half-life is superior to 24 hr.

recommendations, in a media without penicillin-streptomycin and norepinephrine. Cells were incubated for 72 hr at 37°C with siRNA (siRNA sequences are provided in *Supplementary file 8B*).

For lentivector transduction, 6×10^4 HL-1 cells were plated into each well of a six-well plate and transduced overnight in 1 mL of transduction medium (OptiMEM-GlutaMAX, Life Technologies SAS) containing 5 μ g/mL protamine sulfate in the presence of lentivectors (MOI 2). A lentivector

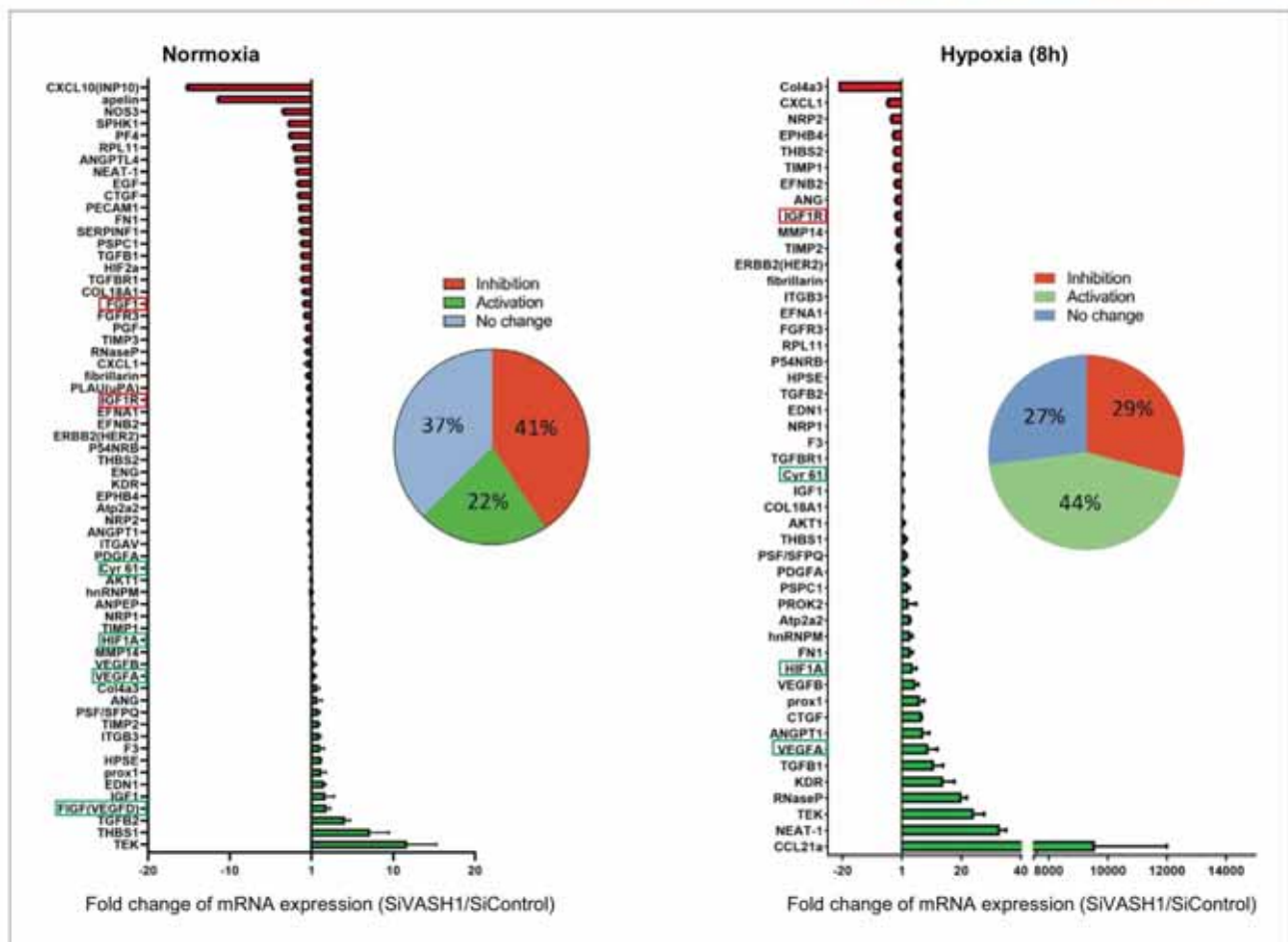


Figure 8. VASH1 depletion has both activating and inhibiting effects on mRNA recruitment into polysomes. HL-1 cardiomyocytes were treated with siVASH1 or siControl and submitted to 8 hr of hypoxia, or maintained in normoxia. RNA was purified from polysome fractions and from cell lysate before loading. cDNA and PCR arrays were performed as in Figure 1. Relative quantification (RQ) of gene expression during hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to 18S rRNA and to SiControl. mRNA levels (polysomal RNA/total RNA) are shown as fold change of repression (red) or induction (green) in siVASH1 cells normalized to SiControl-treated cells. Non-regulated mRNAs are represented in blue. The threshold for induction was set at 1.5. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as $-1/RQ$. The detailed values are available in Supplementary file 7.

expressing GFP was used as a transduction control. GFP-positive cells were quantified 48 hr later by flow cytometry analysis on a BD FACSVerse (BD Biosciences). HL-1 cells were transduced with 80% efficiency. siRNA treatment of transduced cells was performed 72 hr after transduction (and after one cell passage).

To measure protein half-life, HL-1 cardiomyocytes were treated with cycloheximide (InSolution CalBioChem) diluted in PBS to a final concentration of 10 μ g/mL in well plates. Time-course points were taken by stopping cell cultures after 0 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 16 hr or 24 hr of incubation and subsequent capillary Western analysis of cell extracts.

Reporter activity assay

For reporter lentivectors, luciferase activities in vitro and in vivo were measured using a Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Briefly, proteins from HL-1 cells were extracted with Passive Lysis Buffer (Promega France). Quantification of bioluminescence was performed with a luminometer (Centro LB960, Berthold, Thoiry, France).

Capillary electrophoresis and Jess simple western

Diluted protein lysate was mixed with fluorescent master mix and heated at 95°C for 5 min. 3 µL of protein mix containing protein normalization reagent, blocking reagent, wash buffer, target primary antibody (mouse anti-VASH-1 [Abcam EPR17420] diluted 1:100; mouse anti-FGF1 [Abcam EPR19989] diluted 1:25; mouse anti-P21 [Santa Cruz sc-6546 (F5)] diluted 1:10; rabbit anti-eIF2α [Cell Signaling Technology 9721] diluted 1:50; mouse anti-phospho-eIF2α [Cell Signaling Technology 2103] diluted 1:50; rabbit anti-4EBP-1 [Cell Signaling Technology 9452] diluted 1:50; rabbit anti-phospho-4EBP-1 [Cell Signaling Technology 9451] diluted 1:50), secondary-HRP (ready-to-use rabbit 'detection module' [Protein Simple DM-001]), 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-SW001). Data were analyzed using the compass software provided by the manufacturer. Normalization reagent allowed the detection of total proteins in the capillary through the binding of amine group by a biomolecule, and removed housekeeping proteins that can cause inconsistent and unreliable expression. No loading control is required with the Jess technology. The graphs in the figures show chemiluminescence values before normalization.

RNA purification and cDNA synthesis

Total RNA extraction from HL-1 cells was performed using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Gibco BRL, Life Technologies, NY, USA). RNA quality and quantification were assessed using an Xpose spectrophotometer (Trinean, Gentbrugge, Belgium). RNA integrity was verified with an automated electrophoresis system (Fragment Analyzer, Advanced Analytical Technologies, Paris, France).

500 ng RNA was used to synthesize cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Appropriate no-reverse transcription and no-template controls were included in the PCR array 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 array

The DELTAgene Assay was designed by the 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 6*. A total of 1.25 ng of cDNA was preamplified using PreAmp Master Mix (Fluidigm, PN 100-5580, 100-5581; San Francisco, USA) in the plate thermal cycler at 95°C for 2 min, 10 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 4 min. The preamplified cDNA was treated by endonuclease I (New England BioLabs, PN M0293L; Massachusetts, USA) to remove unincorporated primers.

The preamplified cDNA was mixed with 2x SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad, PN 172-5211; California, USA), 50 µM of mixed forward and reverse primers and sample Loading Reagent (Fluidigm, San Francisco, USA). The sample was loaded into the Dynamic Array 96.96 chip (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 2.0.

18S rRNA was used as a reference gene and all data were normalized on the basis of 18S rRNA level. *Hprt* was also assessed as a second reference gene but was not selected as its level was not stable during hypoxia. Relative quantification (RQ) of gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 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 6*.

Polysomal RNA preparation

HL-1 cells were cultured in 150 mm dishes. 15 min prior to harvesting, cells were treated with cycloheximide at 100 µg/ml. Cells were washed three times in PBS cold containing 100 µg/mL cycloheximide and scraped in the PBS/cycloheximide. After centrifugation at 3000 rpm for 2 min at 4°C, cells were lysed by 450 µl hypotonic lysis buffer (5 mM Tris-HCL [pH7.5]; 2.5 mM MgCl₂; 1.5 mM KCl). Cells were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 4°C, before the supernatants were collected and loaded onto a 10–50% sucrose gradient. The gradients were centrifuged in a Beckman SW40Ti rotor

at 39,000 rpm for 2.5 hr at 4°C without 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 19–27), as well as from cell lysate, before gradient loading.

Preparation of biotinylated RNA

The FGF1, VEGFA or EMCV IRESs was cloned in pSCB-A-amp/kan plasmid (Agilent) downstream from the T7 sequence. The plasmids were linearized and in vitro transcription was performed with a MEGAscript T7 kit (Ambion), according to the manufacturer's protocol, in the presence of Biotin-16-UTP at 1 mM (Roche), as previously described (Ainaoui *et al.*, 2015). The synthesized RNA was purified using an RNeasy kit (Qiagen).

BIA-MS experiments

BIA-MS studies based on surface plasmonic resonance (SPR) technology were performed on a BIAcore T200 optical biosensor instrument (GE Healthcare), as described previously (Morfoisse *et al.*, 2016; Ainaoui *et al.*, 2015). Immobilization of biotinylated IRES RNAs was performed on a streptavidin-coated (SA) sensorchip in HBS-EP buffer (10 mM Hepes [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20) (GE Healthcare). All immobilization steps were performed at a flow rate of 2 µl/min with a final concentration of 100 µg/ml.

Binding analyses were performed with normoxic or hypoxic cell protein extracts at 100 µg/ml over the immobilized IRES RNA surface for 120 s at a flow rate of 30 µl/min. The channel (Fc1) was used as a reference surface for non-specific binding measurements. The recovery wizard was used to recover selected proteins from cell protein extracts. This step was carried out with 0.1% SDS. Five recovery procedures were performed to get amounts of proteins sufficient for MS identification.

Eluted protein samples from BIA experiment were digested in gel with 1 µg of trypsin (sequence grade, Promega) at 37°C. Peptides were then subjected to LC-MS/MS analysis. The peptide mixtures were loaded on a YMC-Triart C18 150 × 300 µm capillary column (particle diameter 3 µm) connected to a RS3000 Dionex HPLC system. The run length gradient (acetonitrile and water) was 30 min. Then, on the AB Sciex 5600+ mass spectrometer, data were acquired with a data-dependent analysis. Data were then loaded on Mascot software (Matrix Science) that attributes peptide interpretations to MS/MS recorded scans. The higher the score, the lower the probability of a false positive (a score of 20 corresponds to a 5% probability of a false positive).

Surface plasmon resonance assays

For kinetic analysis, immobilization of biotinylated FGF1 IRES RNA was performed on a streptavidin-coated (SA) sensorchip in HBS-EP buffer (10 mM Hepes [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20) (GE Healthcare). The immobilization step was performed at a flow rate of 2 µl/min with a final concentration of 100 µg/ml. The total amount of immobilized FGF1 IRES RNA was 1500 RU.

Binding analyses were performed with recombinant protein VASH1 (Abnova H00022846-P01) at 100 µg/ml over the immobilized FGF1. This recombinant VASH1 contains the 27-kDa N-terminal part of the protein coupled to glutathione S-transferase. The channel (Fc1) was used as a reference surface for non-specific binding measurements.

A Single-Cycle Kinetics (SCK) analysis to determine association, dissociation and affinity constants (k_a , k_d , and K_D respectively) was carried out by injecting different protein concentrations (16.25–300 nM). Binding parameters were obtained by fitting the overlaid sensorgrams with the 1:1. Langmuir binding model of the BIA evaluation software version 3.0.

Immunocytology

Cells were plated on glass coverslips and incubated for 4 hr of normoxia or hypoxia. They were fixed with cold methanol at –20°C for 5 min, washed three times with PBS, and permeabilized for 1 min with 0.1% Triton. Then, cells were incubated for 5 min with blocking solution (1% FBS, 0.5% BSA) and 30 min with anti-VASH1 antibody (1/50; abcam ab176114) and Alexa 488 conjugated anti-mouse secondary antibody. Images were acquired with a LSM780 Zeiss confocal microscope, camera lens x60 with Z acquisition of 0.36 µm. A single plan is shown *Figure 6C*.

Imaris software was used to represent vasohibin staining in Figure 6C. To differentiate vasohibin in the nucleus and cytoplasm, the nucleus was delimited with DAPI staining and all vasohibin foci in the nucleus are shown in purple, whereas those in the cytoplasm are shown in green.

Using Imaris software, the mean number of vasohibin foci was counted and the volume of vasohibin foci was quantified, a threshold was applied and all particles above 0.5 μm^3 were selected and quantified.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using two-tailed Student's t-tests (Figure 3), Mann-Whitney tests (Figure 4 and Figure 7) or one-way Anova with Tukey's comparisons test (Figure 6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Acknowledgements

Our thanks go to JJ Maoret and F Martins from the Inserm UMR1048 GeT-TQ plateau of the GeT platform Genotoul (Toulouse), F Lopez and L Tonini from the proteomic platform Genotoul (Toulouse), J Iacovoni from the Inserm UMR 1048 bioinformatics plateau, as well as L van den Berghe and C Segura from the Inserm UMR1037 vectorology plateau (Toulouse) and A Lucas from the We-Met Functional Biochemistry Facility (Toulouse). We also thank J Cavaille, C Müller and V Poinot for helpful discussion and W Claycomb for providing HL-1 cells.

This work was supported by Région Midi-Pyrénées, Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), European funding (REFBIO), Fondation Toulouse Cancer Santé and Agence Nationale de la Recherche ANR-18-CE11-0020-RIBOCARD. FH received fellowships from the Région Midi-Pyrénées and from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). ERG had a fellowship from AFM-Telethon. AC Godet had a fellowship from LNCC.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Region Midi-Pyrenees		Anne-Catherine Prats
AFM-Téléthon		Edith Renaud-Gabardos Anne-Catherine Prats
Association pour la Recherche sur le Cancer		Anne-Catherine Prats
European Commission	REFBIO VEMT	Anne-Catherine Prats
Fondation Toulouse Cancer-Santé		Barbara Garmy-Susini
Agence Nationale de la Recherche	ANR-18-CE11-0020-RIBOCARD	Anne-Catherine Prats
Ligue Contre le Cancer		Fransky Hantelys Anne-Claire Godet

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

Author contributions

Fransky Hantelys, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology; Anne-Claire Godet, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology; Florian David, Conceptualization, Investigation, Methodology; Florence Tatin, Formal analysis, Methodology; Edith Renaud-Gabardos, Resources, Formal analysis, Investigation; Françoise Pujol, Leila H Diallo, Investigation, Methodology; Isabelle Ader, Supervision, Investigation; Laetitia Ligat, Formal analysis,

Investigation, Methodology; Anthony K Henras, Supervision, Methodology; Yasufumi Sato, Resources, Formal analysis, Methodology; Angelo Parini, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition; Eric Lacazette, Barbara Garmy-Susini, Conceptualization, Supervision, Methodology; Anne-Catherine Prats, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Project administration

Author ORCIDs

Anne-Catherine Prats  <https://orcid.org/0000-0002-5282-3776>

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.50094.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.50094.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Transcriptome of (lymph)angiogenic factor genes in hypoxic HL-1 cardiomyocytes. Total RNA was purified from HL-1 cardiomyocytes submitted to increasing periods from 5 min to 24 hr of hypoxia at 1% O₂, as well as from normoxic cardiomyocytes as a control. cDNA was synthesized and used for a Fluidigm delta gene PCR array dedicated to genes related to (lymph)angiogenesis or stress (Supplementary file 6). Analysis was performed in three biological replicates (cell culture well and cDNA), each of them measured in three technical replicates (PCR reactions). Relative quantification (RQ) of gene expression in hypoxia was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method with normalization to 18S and to normoxia. Standard deviation is indicated. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as -1/RQ. ND means 'non detected'. '-' means that the gene was not included in the array.
- Supplementary file 2. Translatome of (lymph)angiogenic factor genes in hypoxic HL-1 cardiomyocytes. Polysomes were purified on a sucrose gradient from HL-1 cardiomyocytes, either in normoxia or after 4 hr or 24 hr of hypoxia at 1% O₂, as described in 'Materials and Methods'. RNA was purified from polysome-bound fractions and from cell lysate (before gradient loading). cDNA and PCR arrays were performed as in Figure 1 and in Supplementary file 1. Relative quantification (RQ) of gene expression in hypoxia was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method (polysomal RNA/total RNA normalized to normoxia). The 4 hr of hypoxia array was repeated in two independent arrays (RQ1 and RQ2). The values presented in Figures 2 and 3 correspond to RQ1 values. In Figure 6A and B, values are from RQ2. For RQ1, gene expression analysis was performed in three biological replicates (cell culture well and cDNA), each of them measured in three technical replicates (PCR reactions). For RQ2 (4 hr and 24 hr), analysis was performed in two biological replicates, each of them measured in two technical replicates. Standard deviation is indicated. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as -1/RQ. ND means 'non detected'. '-' means that the gene was not included in the array.
- Supplementary file 3. IRES activities after different periods of hypoxia in HL-1 cells. Luciferase activity values and IRES activities corresponding to the experiments presented in Figure 4. (A) Kinetics of FGF1 IRES activity from 30 min to 24 hr. (B–I) Activities of the different IRES after 4 hr, 8 hr and 24 hr of hypoxia. (J) Negative control with a lentivector containing a hairpin (no IRES) between the two luciferase cistrons. For each IRES and for each time, nine biological replicates were performed (n = 9). Each biological replicate corresponds to the mean of three technical replicates. Means, standard deviations (SD) and Mann-Whitney P values comparing IRES activities in hypoxia and in normoxia were calculated. The means are reported in the histograms shown in Figure 4. P-value significance is indicated: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.
- Supplementary file 4. BIA-MS analysis of IRES-bound proteins in hypoxic cardiomyocytes. (A–C) Total cell extracts from normoxic or hypoxic HL-1 cardiomyocytes were injected into the BIAcore T200 optical biosensor device where biotinylated IRES RNAs had been immobilized. The list of bound proteins identified by mass spectrometry (LC-MS/MS) after tryptic digestion is shown for FGF1 (A), VEGF-Aa (B) or EMCV (C) IRESs, respectively. The score and the number of spectra and

peptides identified are indicated. For each duration of hypoxia, cells were cultivated for the same period in normoxia as a control (normoxia 4 hr and 8 hr).

- Supplementary file 5. Knock-down of VASH1 in HL-1 cells. HL-1 cells transduced by the different IRES-containing lentivectors were transfected with siRNA SiVASH or SiControl and submitted to 8 hr of hypoxia. Luciferase activity and IRES activities (ratio LucF/LucR x 100) were measured. For each IRES, nine biological replicates were performed with SiVASH1 or SiControl (n = 9). Each biological replicate corresponds to the mean of three technical replicates. Means, standard deviations (SD) and Mann-Whitney P values comparing IRES activities with SiVASH1 or SiControl were calculated. IRES activities corresponding to the means of all biological replicates are reported in the histograms shown in Figure 7. P-value significance is indicated: *p<0.05, **p<0.01, ns = non-significant.

- Supplementary file 6. List of genes and primer couples used in the Fluidigm Deltagene PCR array.

- Supplementary file 7. VASH1 depletion has both activating and inhibiting effects on mRNA recruitment into polysomes. HL-1 cardiomyocytes were treated with siVASH1 or siControl and submitted to 8 hr of hypoxia or maintained in normoxia (see also Figure 8). RNA was purified from polysome fractions and from cell lysate before loading. cDNA and PCR array were performed as in Figure 1. Relative quantification (RQ) of gene expression during hypoxia was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method with normalization to 18S rRNA and to SiControl. mRNA levels (polysomal RNA/total RNA) are shown. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as -1/RQ. 'ND' means that RNA was not detected.

- Supplementary file 8. Hairpin and siRNA sequences. (A) Sequence of the hairpin inserted in the bicistronic lentivector between the LucR and Luc+ genes. The LucR stop codon and the Luc+ start codon are indicated. The complementary sequences are indicated in red and in blue, respectively. (B) Sequences of the four siRNAs present in the siControl and siVASH1 smartpools.

- Transparent reporting form

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files. Lentivector plasmid complete maps and sequences are available on Dryad.

The following dataset was generated:

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, Ligat L, Henras A, Sato Y, Parini A, Lacazette E, Garmy-Susini B, Prats A, Ader I	2019	Data from: Vasohibin1, a new IRES trans-acting factor for induction of (lymph)angiogenic factors in early hypoxia	https://dx.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 AC. 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
- Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M. 2006. Searching for IRES. *RNA* **12**:1755–1785. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.157806>, PMID: 16957278
- Borghese F, Michiels T. 2011. The leader protein of Cardioviruses inhibits stress granule assembly. *Journal of Virology* **85**:9614–9622. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00480-11>, PMID: 21752908
- 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. *Molecular Cell* **28**:501–512. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.019>, PMID: 17996713
- Cammas A, Pileur F, Bonnal S, Lewis SM, L  v  que N, Holcik M, Vagner S. 2007. Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Molecular Biology of the Cell* **18**:5048–5059. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-06-0603>, PMID: 17898077

- 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
- Conte C, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnal JF, Lenfant F, Prats AC. 2008. FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLOS ONE* **3**:e3078. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003078>, PMID: 18728783
- 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
- Debbyn HC, Hill K, Hamilton TL, Spriggs KA, Pickering BM, Coldwell MJ, de Moor CH, Bushell M, Willis AE. 2008. Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene* **27**:1167–1174. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210723>, PMID: 17700523
- Durie D, Lewis SM, Liwak U, Kisilewicz M, Gorospe M, Holcik M. 2011. RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation. *Oncogene* **30**:1460–1469. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncr.2010.527>
- Faye MD, Holcik M. 1849. The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* **2015**:887–897. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbaggm.2014.09.012>
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology* **16**:4604–4613. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4604>, PMID: 8756616
- Galb n S, Kuwano Y, Pullmann R, Martindale JL, Kim HH, Lal A, Abdelmohsen K, Yang X, Dang Y, Liu JO, Lewis SM, Holcik M, Gorospe M. 2008. RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and Cellular Biology* **28**:93–107. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00973-07>, PMID: 17967866
- 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. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:924. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>
- Guil S, Long JC, C ceres JF. 2006. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Molecular and Cellular Biology* **26**:5744–5758. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00224-06>, PMID: 16847328
- 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>
- 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
- Jain RK. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**:58–62. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1104819>, PMID: 15637262
- Kern J, Bauer M, Rychli K, Wojta J, Ritsch A, Gastl G, Gunsilius E, Untergasser G. 2008. Alternative splicing of vasohibin-1 generates an inhibitor of endothelial cell proliferation, migration, and capillary tube formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28**:478–484. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.160432>, PMID: 18187668
- Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. 1999. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**:4177–4185. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V94.12.4177>, PMID: 10590062
- Kishlyansky M, Vojnovic J, Roudier E, Gineste C, Decary S, Forn P, Bergeron R, Desplanches D, Birot O. 2010. Striated muscle angio-adaptation requires changes in Vasohibin-1 expression pattern. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**:359–364. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.076>, PMID: 20659423
- 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. *Molecular Biology of the Cell* **18**:1302–1311. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.06-06-0515>, PMID: 17287399
- Lewis SM, Holcik M. 2008. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* **27**:1033–1035. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210777>, PMID: 17767196
- Liberman N, Gandin V, Svitkin YV, David M, Virgili G, Jaramillo M, Holcik M, Nagar B, Kimchi A, Sonenberg N. 2015. DAP5 associates with eIF2  and eIF4A1 to promote internal ribosome entry site driven translation. *Nucleic Acids Research* **43**:3764–3775. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv205>, PMID: 25779044
- 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
- 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. *Molecular Cell* **11**:757–771. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00093-5)
- Miyashita H, Watanabe T, Hayashi H, Suzuki Y, Nakamura T, Ito S, Ono M, Hoshikawa Y, Okada Y, Kondo T, Sato Y. 2012. Angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1. *PLOS ONE* **7**:e46459. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046459>, PMID: 23056314

- Morfoisse F, Kuchnio A, Frainay C, Gomez-Brouchet A, Delisle MB, Marzi S, Helfer AC, Hantelys F, Pujol F, Guillermet-Guibert J, Bousquet C, Dewerchin M, Pyronnet S, Prats AC, Carmeliet P, Garmy-Susini B. 2014. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Reports* **6**:155–167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.011>, PMID: 24388748
- Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, Prats AC, Garmy-Susini B. 2015. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Molecular & Cellular Oncology* **2**:e1024821. DOI: <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1024821>, PMID: 27308508
- Morfoisse F, Tatin F, Hantelys F, Adoue A, Helfer AC, Cassant-Sourdy S, Pujol F, Gomez-Brouchet A, Ligat L, Lopez F, Pyronnet S, Courty J, Guillermet-Guibert J, Marzi S, Schneider RJ, Prats AC, 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
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **272**:32061–32066. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32061>, PMID: 9405401
- Pagès G, Pouyssegur J. 2005. Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovascular Research* **65**:564–573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.032>, PMID: 15664382
- Pouyssegur 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
- 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
- Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hänninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T, Poellinger L, Vuolteenaho O, Tavi P. 2007. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *The FASEB Journal* **21**:1821–1830. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.06-7294com>, PMID: 17341685
- Sato Y. 2012. The vasohibin family: novel regulators of angiogenesis. *Vascular Pharmacology* **56**:262–266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.01.002>, PMID: 22286022
- Sato Y. 2013. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. *Journal of Biochemistry* **153**:5–11. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvs128>, PMID: 23100270
- Sato Y. 2015. Novel link between inhibition of angiogenesis and tolerance to vascular stress. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **22**:327–334. DOI: <https://doi.org/10.5551/jat.28902>, PMID: 25739825
- Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, Lévy BI. 2008. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovascular Research* **78**:242–249. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn027>, PMID: 18252762
- Sonoda H, Ohta H, Watanabe K, Yamashita H, Kimura H, Sato Y. 2006. Multiple processing forms and their biological activities of a novel angiogenesis inhibitor vasohibin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**:640–646. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.185>, PMID: 16488400
- Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE. 2008. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biology of the Cell* **100**:27–38. DOI: <https://doi.org/10.1042/BC20070098>
- Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. 1998. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* **18**:3112–3119. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.18.6.3112>, PMID: 9584152
- 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

SUPPLEMENTARY FILE LEGENDS.

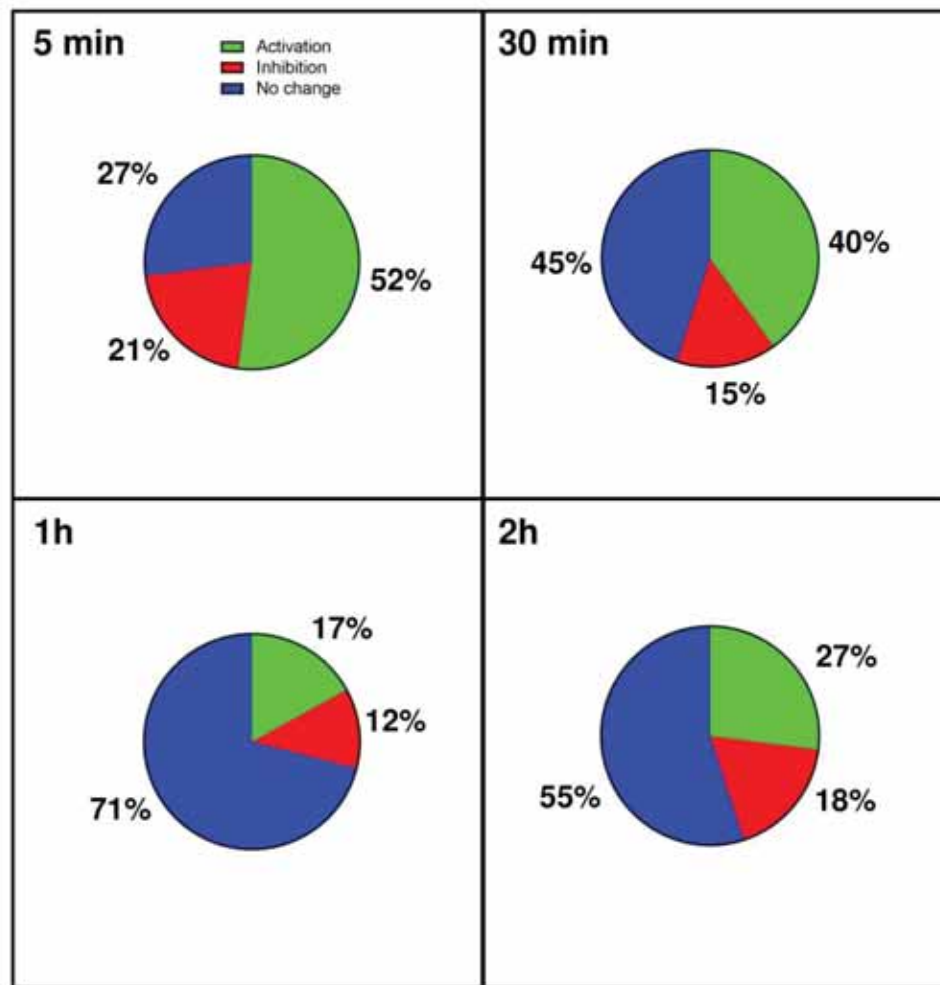


Figure 1- figure supplement 1. Transcriptome of regulation in hypoxic cardiomyocytes.

Total RNA was purified from HL-1 cardiomyocytes submitted to increasing times from 5 min to 24 h of hypoxia at 1% O₂, as well as from normoxic cardiomyocytes as a control. cDNA was synthesized and used for a Fluidigm deltagene PCR array dedicated to genes related to (lymph)angiogenesis or stress (Sup File 6). Relative quantification (RQ) of gene expression during hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to 18S and to normoxia. The percentage of repressed (red), induced (green) and non-regulated (blue) mRNAs is shown for the earlier times of the kinetics. The later times are shown in Fig. 1. The threshold was set at 1.5 as in figure 1. The detailed values for all the times of the kinetics are presented in Sup File 1.

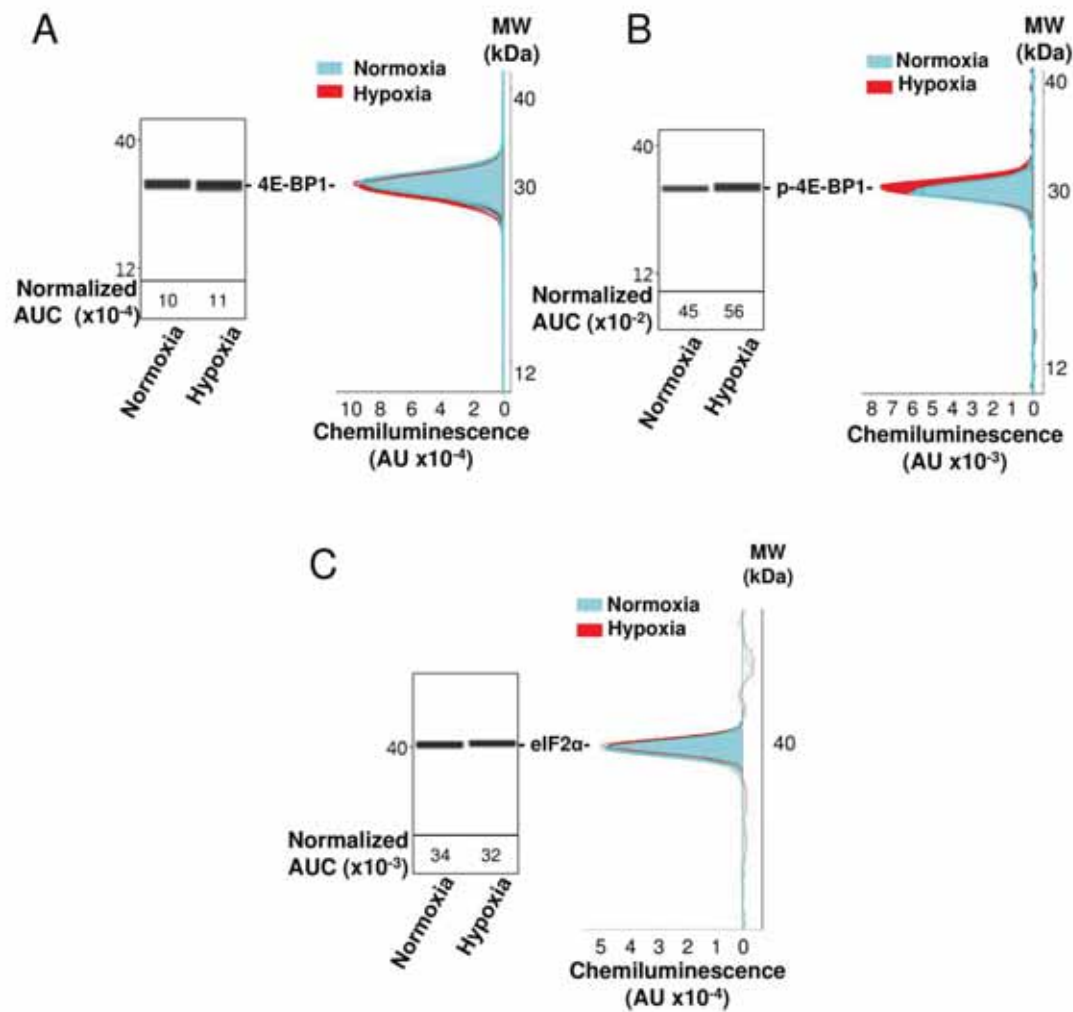


Figure 2-figure supplement 1. Capillary electrophoresis immunodetection of 4E-BP1 and eIF2α.

A-C 4E-BP1 expression (A) and phosphorylation (B), as well as eIF2α expression (C) in normoxia and hypoxia (8 h) were analysed and quantified by capillary Simple Western, as described in Mat. & Meth. The quantified values, expressed in arbitrary units of luminescence (AUC) are normalized to total proteins. Analysis of eIF2α phosphorylation is shown in Figure 2. Three independent experiments were done; a representative experiment is shown.

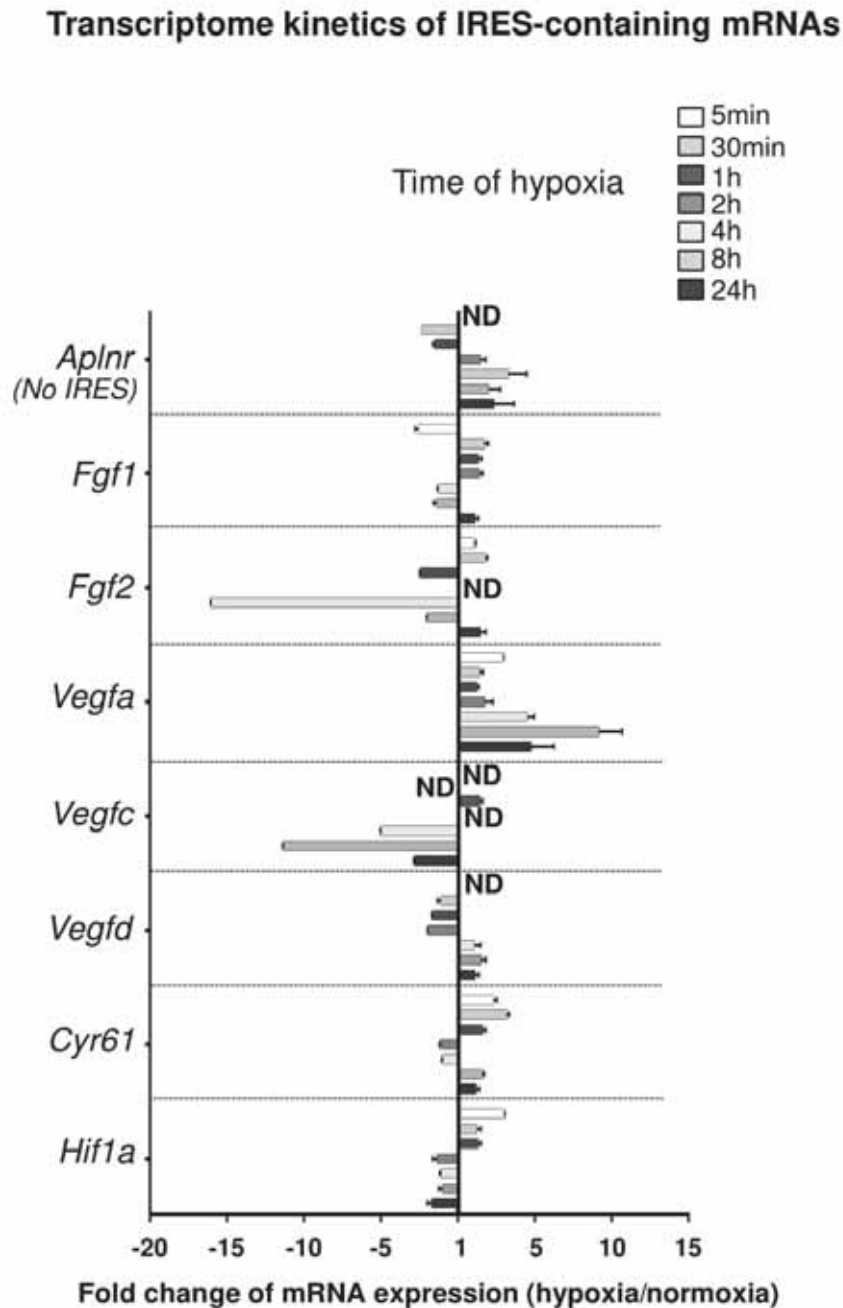
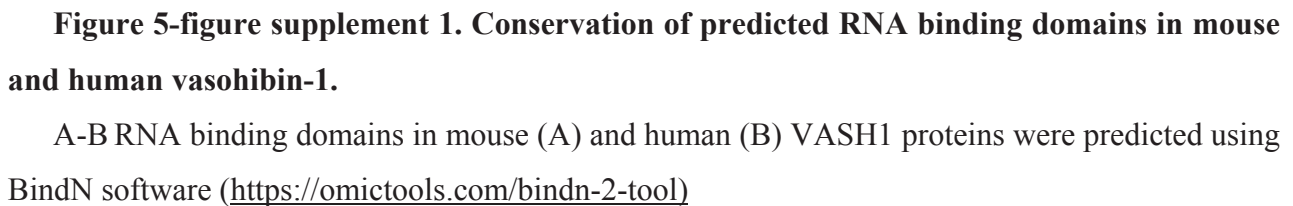


Figure 3-figure supplement 1. Transcriptome of IRES-containing mRNAs in hypoxic cardiomyocytes.

RQ values for IRES-containing mRNA transcriptome kinetics extracted from the PCR arrays shown in Sup File 1. The gene *Aplnr* (apelin receptor) was chosen as a control without an IRES. Relative quantification (RQ) of gene expression in hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to 18S and to normoxia. Standard deviation is indicated. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as $-1/RQ$. ND means “non detected”.



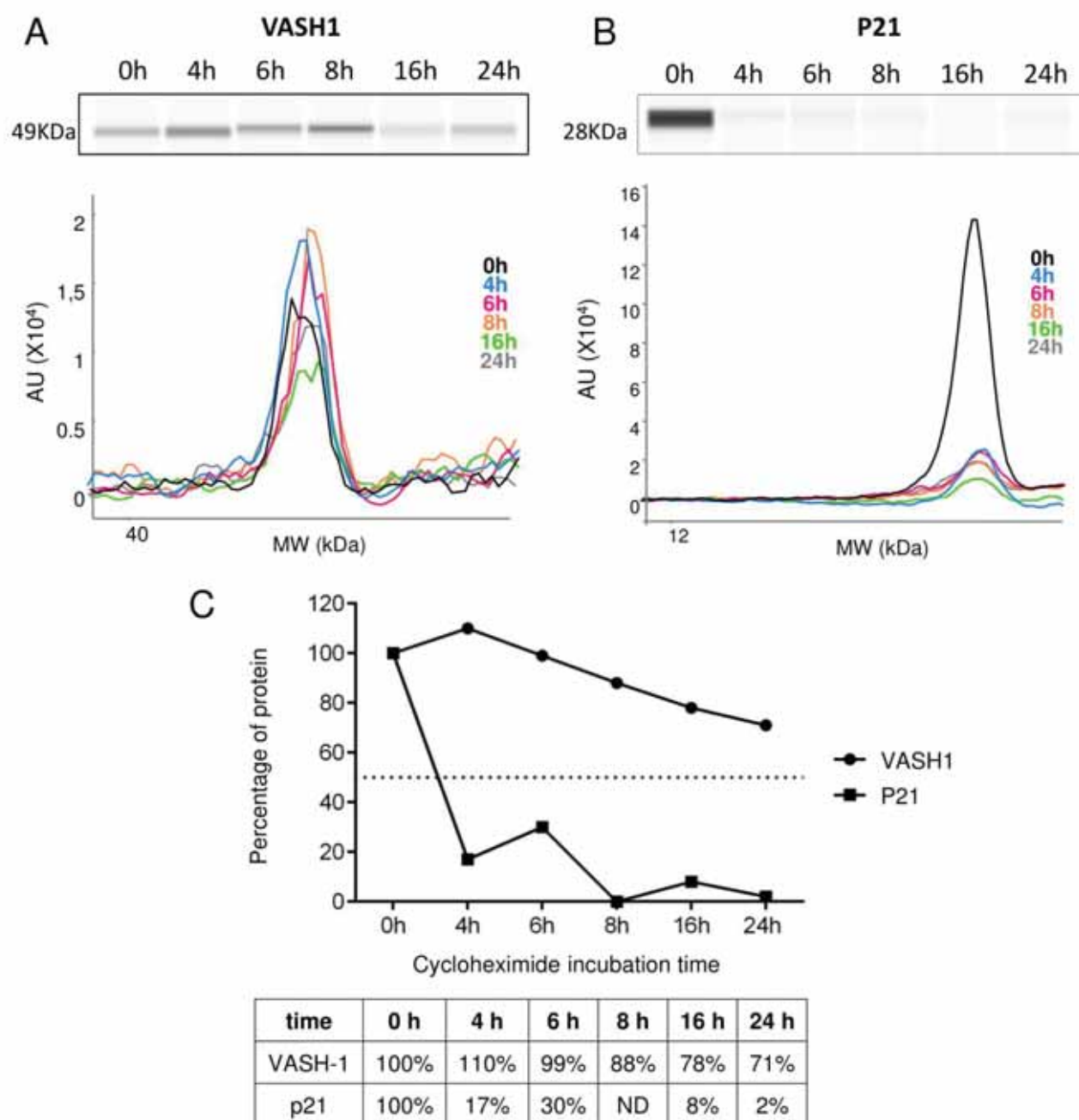


Figure 7-figure supplement 1. VASH1 half life is superior to 24 h.

A-C VASH1 half-life determination experiment were performed by blocking protein synthesis with cycloheximide at 10 $\mu\text{g/mL}$, with time-course points at 0 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h and 24 h. VASH1 (A) and P21 (B) protein stability was measured by capillary Simple Western with normalization to 0 h time-course point. P21 was used as a control for its short half-life (C). Three independent experiments were performed. A representative experiment is shown.

Hantelys et al, Supplementary File 1

Hypoxia time	5min	30min	1h	2h	4h	8h	24h
Gene name	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ
Akt1	1.60 ±0.13	1.30 ±0.06	1.20 ±0.15	1.36 ±0.25	-1.10 ±0.09	1.40 ±0.13	1.00 ±0.32
Ang	2.65 ±0.25	1.23 ±0.36	-1.04 ±0.12	1.24 ±0.04	1.24 ±0.12	1.09 ±0.08	1.26 ±0.28
Angpt1	5.51 ±0.17	1.20 ±0.30	1.19 ±0.07	1.90 ±0.49	2.43 ±0.36	1.56 ±0.43	-2.27 ±0.06
Angptl4	1.03 ±0.02	-3.14 ±0.09	1.65 ±0.54	1.60 ±0.46	1.56 ±0.67	3.50 ±1.07	-1.37 ±0.35
Anpep	ND	-3.26 ±0.29	1.65 ±0.81	-8.05 ±0.06	-1.04 ±0.14	1.62 ±0.62	1.03 ±0.43
Apln (Apln)	2.11	-19.21 ±0.01	-6.17 ±0.05	-29.04 ±0.01	36.77 ±5.59	109.98 ±6.88	335.72 ±57.52
Aplnr	ND	-2.36 ±0.03	-1.57 ±0.10	1.44 ±0.32	3.25 ±1.70	1.96 ±0.72	2.31 ±1.29
Atp2a2 (SERCA2)	1.46 ±0.08	1.21 ±0.13	1.26 ±0.14	1.50 ±0.01	1.20 ±0.06	1.84 ±0.18	1.48 ±0.32
Bai1	-1.52 ±0.19	2.90 ±0.91	1.17 ±0.06	1.65 ±0.52	1.36 ±0.13	2.05 ±0.60	1.04 ±0.30
Ccl2	ND	-1.09 ±0.48	1.76 ±0.48	-2.76 ±0.16	1.57 ±1.01	2.99 ±1.13	1.23
Ccl21a	ND	-32.39 ±0.01	2.97 ±0.85	-1.90 ±0.03	2.65 ±2.78	-2.27 ±0.21	1.32 ±0.39
Col18a1	1.66 ±0.71	1.58 ±0.39	1.14 ±0.14	1.45 ±0.04	-1.69 ±0.09	1.82 ±0.43	1.57 ±0.43
Col4a3	19.64 ±0.07	1.52 ±0.19	1.20 ±0.21	1.31 ±0.04	1.00 ±0.03	1.45 ±0.30	4.40 ±0.80
Ctgf	1.29 ±0.09	1.67 ±0.26	1.16 ±0.06	1.30 ±0.13	1.06 ±0.13	2.05 ±0.30	3.66 ±0.78
Cxcl1	1.32 ±0.64	1.11 ±0.27	1.67 ±0.19	1.58 ±0.12	1.01 ±0.09	-1.43 ±0.08	-2.04 ±0.13
Cxcl10	1.37 ±0.86	1.36 ±0.29	1.11 ±0.14	1.33 ±0.25	1.05 ±0.09	-1.02 ±0.13	-1.08 ±0.23
Cyr61	2.30 ±0.18	3.14 ±0.14	1.59 ±0.18	-1.18 ±0.07	-1.03 ±0.06	1.56 ±0.12	1.15 ±0.21
Edn1	-2.43 ±0.28	2.93 ±0.31	1.72 ±0.32	-1.4 ±0.24	-1.39 ±0.06	-1.33 ±0.09	1.04 ±0.26
Edna1	2.08 ±0.15	1.23 ±0.10	-1.52 ±0.12	-1.16 ±0.19	1.25 ±0.09	1.17 ±0.05	1.35 ±0.33
Ednb2	1.74 ±0.14	1.55 ±0.25	1.14 ±0.23	-1.03 ±0.18	1.57 ±0.18	3.71 ±0.61	1.65 ±0.42
Egf	ND	1.35 ±0.14	1.32 ±0.30	1.56 ±0.44	1.56 ±0.11	2.14 ±0.53	-1.61 ±0.35
Eng	2.96 ±0.94	1.55 ±0.39	1.18 ±0.19	-1.02 ±0.14	-1.11 ±0.15	2.27 ±0.33	1.65 ±0.34
Ephb4	2.22 ±0.13	1.67 ±0.16	-1.03 ±0.14	1.10 ±0.13	1.01 ±0.12	1.45 ±0.09	1.57 ±0.21
ErbB2 (Her2)	1.87 ±0.19	1.85 ±0.26	-1.01 ±0.18	1.16 ±0.18	1.32 ±0.11	1.00 ±0.18	1.34 ±0.09
F3	1.12 ±0.94	1.45 ±0.18	1.28 ±0.11	-1.57 ±0.23	-1.23 ±0.07	-1.09 ±0.10	-1.56 ±0.21
Fgf1 (aFGF)	-2.63 ±0.18	1.69 ±0.23	1.29 ±0.22	1.37 ±0.21	-1.32 ±0.05	-1.43 ±0.20	1.08 ±0.20
Fgf2 (bFGF)	1.06 ±0.04	1.76 ±0.13	-2.5 ±0.03	ND	-16.05 ±0.02	-2.05 ±0.07	1.43 ±0.35
Fgf3	1.41 ±0.07	1.34 ±0.27	-1.08 ±0.12	1.38 ±0.31	1.47 ±0.27	3.93 ±0.55	2.69 ±0.39

1

Hypoxia time	5min	30min	1h	2h	4h	8h	24h
Gene name	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ
Ftn1	3.30 ±0.07	1.70 ±0.15	-1.02 ±0.17	1.16 ±0.01	-1.25 ±0.06	2.45 ±0.36	2.61 ±0.49
Hif1a	2.97 ±0.03	1.20 ±0.24	1.28 ±0.18	-1.42 ±0.26	-1.15 ±0.06	-1.06 ±0.21	-1.75 ±0.22
Hmmpm	1.55 ±0.18	1.17 ±0.18	1.54 ±0.15	2.26 ±0.20	1.86 ±0.25	3.86 ±1.33	1.23 ±0.26
Hise	ND	3.23 ±1.07	1.25 ±0.34	1.64 ±0.16	1.56 ±0.14	3.52 ±1.07	11.04 ±1.95
Id1	-1.61 ±1.12	1.58 ±0.18	2.63 ±0.30	3.01 ±1.27	4.23 ±0.19	2.01 ±0.40	1.79 ±0.64
Itna1	ND	1.72 ±0.17	-1.09 ±0.06	1.73 ±0.07	2.19 ±0.33	3.11 ±0.25	1.31 ±0.69
Igf1	10.07 ±0.59	1.54 ±0.22	1.42 ±0.15	1.06 ±0.04	1.10 ±0.22	-1.25 ±0.14	-2.86 ±0.14
Igf1r	-	-	-	-	-3.17 ±0.08	2.37 ±0.20	5.14 ±0.32
Itgav	ND	1.19 ±0.11	-1.36 ±0.14	1.33 ±0.29	1.33 ±0.12	3.41 ±0.56	2.82 ±0.64
Itgb3	-4.33 ±0.30	1.34 ±0.19	-1.35 ±0.02	1.04 ±0.20	1.03 ±0.20	1.42 ±0.34	-1.37 ±0.10
Jag1	2.13 ±0.08	1.80 ±0.24	1.03 ±0.13	1.66 ±0.46	1.46 ±0.06	2.26 ±0.37	1.76 ±0.21
Mdk	1.14 ±0.21	2.45 ±0.17	-1.07 ±0.17	-1.27 ±0.00	1.16 ±0.32	1.52 ±0.38	-1.16 ±0.46
Mmp14	-1.77 ±0.03	1.30 ±0.22	1.02 ±0.06	-1.16 ±0.17	1.06 ±0.11	1.70 ±0.24	1.95 ±0.15
Mmp2	1.46 ±0.18	1.96 ±0.50	1.20 ±0.05	1.68 ±0.44	1.14 ±0.33	1.94 ±0.66	-1.23 ±0.37
Neaf1	4.03 ±0.48	-1.17 ±0.23	-1.59 ±0.05	2.65 ±0.06	1.89 ±0.15	2.96 ±1.02	-1.16 ±0.29
Nos3	9.29	-4.01 ±0.10	2.00 ±0.54	-2.58 ±0.26	-1.30 ±0.14	-1.02 ±0.40	-1.32 ±0.19
Nrp1	2.46 ±0.06	1.32 ±0.17	1.04 ±0.15	-1.25 ±0.25	-1.10 ±0.07	1.47 ±0.25	1.10 ±0.16
Nrp2	2.50 ±0.07	1.55 ±0.05	1.02 ±0.12	1.02 ±0.12	1.14 ±0.19	1.72 ±0.32	1.83 ±0.39
P54nr6	2.96 ±0.09	1.58 ±0.42	1.21 ±0.20	1.42 ±0.29	1.22 ±0.13	1.66 ±0.30	1.11 ±0.23
PAI1 (SerpinE1)	-1.73 ±0.12	2.18 ±0.54	1.46 ±0.15	1.74 ±0.65	5.75 ±0.57	15.76 ±2.01	13.18 ±1.02
Pdgfra	3.65 ±0.43	1.45 ±0.18	1.29 ±0.26	1.59 ±0.36	1.71 ±0.11	1.97 ±0.35	1.54 ±0.34
Pecam1	1.48	-11.55 ±0.02	-1.09 ±0.24	2.86 ±1.08	2.09 ±0.77	2.70 ±1.72	2.60 ±0.86
P4	ND	-39.36 ±0.02	-1.79 ±0.33	-2.20 ±0.18	1.80 ±0.40	1.48 ±0.55	1.01 ±0.28
Pgf	ND	2.17 ±0.14	-1.36 ±0.19	-7.89 ±0.09	4.47 ±0.89	1.85 ±0.29	3.22 ±0.85
Ptas (upa)	1.13 ±0.29	-1.04 ±0.24	-1.36 ±0.16	-1.31 ±0.13	1.25 ±0.30	1.58 ±0.26	1.24 ±0.24
Ptg	ND	-2.71 ±0.26	-1.05 ±0.03	2.45 ±0.83	-1.35 ±0.19	-3.33 ±0.16	-2.94 ±0.25
Prox1	7.13 ±0.20	1.48 ±0.23	1.26 ±0.14	-1.13 ±0.14	-1.08 ±0.13	1.27 ±0.29	-1.72 ±0.07

2

Hypoxia time	5min	30min	1h	2h	4h	8h	24h
Gene name	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ
PatS1p2	1.45 ±0.17	1.37 ±0.09	1.30 ±0.19	1.22 ±0.08	1.10 ±0.15	1.55 ±0.59	-1.43 ±0.16
Pspc1	1.00 ±0.80	1.34 ±0.11	1.50 ±0.01	1.64 ±0.58	1.67 ±0.19	1.37 ±0.31	1.59 ±0.23
SerpinF1	ND	-31.89 ±0.02	-9.09 ±0.01	-1.91 ±0.33	-2.38 ±0.11	-1.14 ±0.17	1.02 ±0.37
Sphk1	ND	1.91 ±0.80	1.70 ±0.04	-1.51 ±0.19	1.30 ±0.11	2.78 ±1.20	1.17 ±0.43
Tek	1.97 ±1.55	1.98 ±0.23	1.55 ±0.41	1.48 ±0.20	1.24 ±0.14	-1.25 ±0.09	1.04 ±0.13
Tgfa	ND	-2.01 ±0.13	-7.94 ±0.05	-6.9 ±0.03	2.91 ±0.63	3.50 ±1.29	4.05 ±1.71
Tgfb1	-5.26 ±0.02	1.22 ±0.23	-1.45 ±0.14	1.03 ±0.10	-1.02 ±0.22	1.45 ±0.24	1.05 ±0.25
Tgfb2	-2.45 ±0.08	1.50 ±0.31	1.22 ±0.07	1.37 ±0.12	1.78 ±0.24	2.00 ±0.39	1.43 ±0.40
Tgfr1	-2.03 ±0.57	1.33 ±0.16	1.28 ±0.25	1.48 ±0.14	1.86 ±0.34	2.23 ±0.77	-1.27 ±0.16
Thbs1	2.65 ±0.09	1.88 ±0.12	1.19 ±0.09	1.47 ±0.33	1.12 ±0.07	1.30 ±0.22	1.44 ±0.08
Thbs2	2.15 ±0.12	1.52 ±0.10	1.03 ±0.16	1.20 ±0.18	-1.20 ±0.01	1.21 ±0.15	-1.22 ±0.21
Timp1	-2.20 ±0.04	1.13 ±0.27	-1.32 ±0.29	-1.96 ±0.17	-1.28 ±0.12	-1.22 ±0.11	-2.33 ±0.19
Timp2	2.21 ±0.04	1.46 ±0.22	1.14 ±0.01	1.13 ±0.09	1.67 ±0.13	1.28 ±0.12	-1.69 ±0.15
Timp3	ND	2.70 ±0.43	1.40 ±0.23	1.98 ±0.46	1.09 ±0.16	1.04 ±0.29	1.11 ±0.17
Vash1	-	-	-	-	-3.01 ±0.14	1.56 ±0.30	1.10 ±0.08
Vegfa	2.90 ±0.02	1.40 ±0.18	1.20 ±0.12	1.72 ±0.50	4.48 ±0.43	9.12 ±1.48	4.71 ±0.69
Vegfb	1.38 ±0.04	1.33 ±0.10	-1.2 ±0.11	1.02 ±0.04	-1.09 ±0.07	1.04 ±0.22	-1.59 ±0.10
Vegfc	ND	ND	1.38 ±0.18	ND	-5.03 ±0.05	-11.37 ±0.03	-2.86 ±0.16
Vegfd	ND	-1.19 ±0.17	-1.73 ±0.22	-1.09 ±0.23	1.05 ±0.37	1.48 ±0.29	1.08 ±0.24
Vegfr2 (Kdr)	-2.05 ±0.05	1.25 ±0.13	1.07 ±0.04	1.43 ±0.21	1.31 ±0.10	2.29 ±0.38	-1.01 ±0.30

Supplementary File 1. Transcriptome of (lymph)angiogenic factor genes in hypoxic HL-1 cardiomyocytes.

Total RNA was purified from HL-1 cardiomyocytes submitted to increasing times from 5 min to 24 h of hypoxia at 1% O₂, as well as from normoxic cardiomyocytes as a control. cDNA was synthesized and used for a Fluidigm deltagene PCR array dedicated to genes related to (lymph)angiogenesis or stress (Supplementary File 6). Analysis was performed in three biological replicates (cell culture well and cDNA), each of them measured in three technical replicates (PCR reactions). Relative quantification (RQ) of gene expression in hypoxia was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method with normalization to 18S and to normoxia. Standard deviation is indicated. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as -1/RQ. ND means “non detected”. “-” means that the gene was not included in the array.

Hantelys et al. Supplementary File 2

Hypoxia: 4 h

Gene name	Total mRNA		Polysome bound mRNA		Fold change		Standard deviation	
	RQ 1	RQ 2	RQ 1	RQ 2	RQ(polysomes)/ RQ(total mRNA) 1	RQ(polysomes)/ RQ(total mRNA) 2	ST DEV 1	ST DEV 2
<i>Akt1</i>	0.54	0.63	1.12	1.45	2.07	2.29	0.07	0.05
<i>Ang</i>	0.22	0.59	0.54	0.44	2.42	-1.35	0.53	0.01
<i>Angpt1</i>	0.16	0.48	0.37	0.32	2.35	-1.48	0.67	0.01
<i>Angptl4</i>	0.21	0.39	0.67	0.48	3.26	1.23	1.56	0.15
<i>Anpep</i>	0.41	0.40	1.39	1.59	3.41	3.96	0.21	0.83
<i>Apelin</i>	35.38	2.85	60.39	4.47	1.71	1.57	0.27	0.10
<i>Aplnr</i>	3.25	ND	1.12	ND	-2.86	ND	0.35	ND
<i>Atp2a2</i>	0.31	0.45	0.6	0.84	1.94	1.84	0.34	0.07
<i>Bai1</i>	0.16	0.39	0.61	1.97	3.8	5.06	0.89	0.30
<i>Ccl2</i>	1.57	1.96	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Ccl21a</i>	2.65	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Col18a1</i>	0.45	0.57	1.18	0.88	2.64	1.53	0.61	0.19
<i>Col4a3</i>	0.37	0.51	0.87	1.15	2.36	2.24	0.41	0.13
<i>Ctgf</i>	0.29	0.48	0.9	0.13	3.15	-3.77	0.49	0.00
<i>Cxcl1</i>	0.1	0.56	0.22	0.29	2.21	-1.95	0.3	0.04
<i>Cxcl10 (inp10)</i>	0.19	0.43	0.74	0.13	3.96	-3.26	1.43	0.02
<i>Cyr 61</i>	0.45	0.72	0.91	0.62	2	-1.16	0.24	0.04
<i>Edn1</i>	0.27	0.48	0.68	0.68	2.49	1.42	0.55	0.03
<i>Efna1</i>	0.3	0.48	0.69	0.82	2.29	1.69	0.29	0.16
<i>Efnb2</i>	0.53	0.55	1.31	0.68	2.48	1.23	0.71	0.01
<i>Egf</i>	0.21	0.56	0.53	2.34	2.46	4.16	1.56	0.67
<i>Eng</i>	0.8	0.63	2.16	1.36	2.71	2.16	0.78	0.25
<i>Ephb4</i>	0.31	0.50	0.58	0.68	1.87	1.36	0.23	0.05
<i>ErbB2(her2)</i>	0.27	0.41	0.55	0.60	2.02	1.44	0.24	0.08
<i>F3</i>	0.44	0.78	1.1	0.51	2.48	-1.53	0.51	0.00
<i>Fgf1</i>	0.3	0.40	0.76	1.16	2.56	2.90	0.87	0.19
<i>Fgf2</i>	0.06	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Fgfr3</i>	0.63	0.70	1.35	0.88	2.15	1.25	0.41	0.12
<i>Fibrillarin</i>	ND	0.61	ND	1.06	ND	1.73	ND	0.04
<i>Fn1</i>	0.48	0.46	1.13	0.57	2.34	1.23	0.3	0.04
<i>Hif1a</i>	0.52	0.55	0.97	0.90	1.88	1.63	0.36	0.18
<i>Hif2a</i>	ND	0.39	ND	0.64	ND	1.64	ND	0.14
<i>Hnrnpm</i>	0.74	0.68	1.84	1.42	2.48	2.08	0.5	0.01
<i>Hpse</i>	0.66	0.61	2.75	1.26	4.17	2.07	0.79	0.16
<i>Id1</i>	0.47	ND	0.9	0.87	1.93	ND	0.38	ND

<i>Ifna1</i>	0.34	ND	1.35	1.91	3.93	ND	1.38	ND
<i>Igf1</i>	0.22	0.40	0.44	0.79	2.03	1.97	0.54	0.13
<i>Igf1r</i>	1.05	0.79	1.97	1.49	1.88	1.88	0.06	0.06
<i>Itgav</i>	0.48	0.61	0.86	0.75	1.79	1.22	0.31	0.01
<i>Itgb3</i>	0.48	0.56	1.18	0.52	2.44	-1.07	0.4	0.09
<i>Jag1</i>	0.17	ND	0.35	ND	2.03	ND	0.38	ND
<i>Mdk</i>	0.47	ND	0.96	0.66	2.03	ND	0.35	ND
<i>Mmp14</i>	0.44	0.79	0.82	0.90	1.85	1.13	0.18	0.13
<i>Mmp2</i>	0.27	0.24	0.52	1.26	1.91	5.14	0.44	2.48
<i>Neat-1</i>	0.22	0.43	0.88	4.21	3.98	9.90	1.24	0.03
<i>Nos3</i>	1.08	0.20	0.84	2.35	-1.30	11.86	0.1	4.49
<i>Nrp1</i>	0.54	0.48	0.9	0.35	1.67	-1.37	0.22	0.00
<i>Nrp2</i>	0.51	0.60	0.96	0.78	1.88	1.29	0.18	0.09
<i>P54nrb</i>	0.57	0.73	1.77	1.32	3.12	1.81	0.78	0.09
<i>Pai-1</i>	4.77	2.31	9.15	5.12	1.92	2.22	0.27	0.27
<i>Pdgfa</i>	0.41	0.59	0.99	1.33	2.42	2.24	0.48	0.06
<i>Pecam1</i>	0.55	0.93	1.18	0.95	2.15	1.03	1.37	0.15
<i>Pf4</i>	0.44	0.54	0.86	0.47	1.97	-1.15	1.07	0.03
<i>Pgf</i>	0.65	0.20	1.53	3.70	2.36	18.38	0.83	2.53
<i>PLAU(upa)</i>	0.31	0.36	0.68	0.73	2.16	2.03	0.5	0.59
<i>Plg</i>	0.67	ND	0.17	ND	-3.85	ND	0.77	ND
<i>Prox1</i>	0.33	0.51	0.72	1.52	2.22	2.95	0.27	0.51
<i>Psf/sfpq</i>	0.44	0.65	1.21	0.75	2.74	1.15	0.8	0.02
<i>Pspc1</i>	0.36	0.47	0.8	0.79	2.19	1.68	0.43	0.03
<i>Serpinf1</i>	0.31	0.12	1.79	0.89	5.7	7.61	2.05	0.95
<i>Sphk1</i>	0.58	0.63	0.45	2.32	-1.30	3.65	0.12	1.09
<i>Tek</i>	0.22	0.44	0.54	1.15	2.43	2.62	0.95	0.24
<i>Tgfa</i>	0.85	0.43	2.09	1.03	2.45	2.40	0.31	1.00
<i>Tgfb1</i>	0.29	0.52	0.74	0.57	2.52	1.08	0.31	0.03
<i>Tgfb2</i>	0.3	0.63	0.72	0.52	2.39	-1.22	0.39	0.04
<i>Tgfb1r</i>	0.44	0.52	0.81	0.51	1.86	-1.02	0.57	0.02
<i>Thbs1</i>	0.31	0.48	0.62	0.38	2.03	-1.27	0.3	0.23
<i>Thbs2</i>	0.35	0.47	0.7	0.67	1.98	1.43	0.28	0.01
<i>Timp1</i>	0.27	0.46	0.63	0.43	2.36	-1.07	0.34	0.15
<i>Timp2</i>	0.27	0.52	0.69	0.90	2.55	1.73	0.42	0.04
<i>Timp3</i>	0.22	0.57	0.44	0.77	1.95	1.35	0.31	0.02
<i>Vash1</i>	-	0.33	-	2.28	-	6.86	-	4.27
<i>Vegfa</i>	1.82	2.09	5.38	2.28	2.95	1.09	0.7	0.04
<i>Vegfb</i>	2.94	0.59	8.39	1.40	2.85	2.37	0.43	0.07
<i>Vegfc</i>	1.05	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Vegfd</i>	0.23	0.48	0.56	0.85	2.44	1.78	0.96	0.23
<i>Vegfr2 (kdr)</i>	0.25	0.37	0.58	0.57	2.29	1.55	0.55	0.15

Hypoxia: 24 h

Gene name	Total mRNA	Polysome bound mRNA	Fold change	Standard deviation
<i>Akt1</i>	1.80	5.69	3.17	0.22
<i>Ang</i>	1.88	2.38	1.26	0.15
<i>Angpt1</i>	1.17	2.62	2.24	0.08
<i>Angptl4</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Anpep</i>	4.68	ND	ND	ND
<i>Apelin</i>	31.49	ND	ND	ND
<i>Aplnnr</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Atp2a2</i>	3.34	2.73	-1.22	0.12
<i>Bai1</i>	1.39	ND	ND	ND
<i>Ccl2</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Ccl21a</i>	ND	0.83	ND	ND
<i>Col18a1</i>	4.29	12.60	2.94	0.27
<i>Col4a3</i>	5.14	9.53	1.85	0.21
<i>Ctgf</i>	1.83	2.75	1.50	0.07
<i>Cxcl1</i>	1.09	1.04	-1.06	0.23
<i>Cxcl10 (inp10)</i>	10.42	ND	ND	ND
<i>Cyr 61</i>	4.57	5.52	1.21	0.12
<i>Edn1</i>	2.40	2.13	-1.12	0.04
<i>Efna1</i>	4.02	2.79	-1.44	0.04
<i>Efnb2</i>	2.86	3.03	1.06	0.07
<i>Egf</i>	2.33	ND	ND	ND
<i>Eng</i>	4.50	ND	D	ND
<i>Ephb4</i>	2.67	3.37	1.26	0.01
<i>ErbB2(her2)</i>	2.26	4.96	2.20	0.34
<i>F3</i>	3.72	5.21	1.40	0.06
<i>Fgf1</i>	1.00	ND	ND	ND
<i>Fgf2</i>	-	-	-	-
<i>Fgfr3</i>	5.01	9.20	1.84	0.35
<i>Fibrillarin</i>	2.13	2.49	1.17	0.22
<i>Fn1</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Hif1a</i>	1.24	2.75	2.21	0.21
<i>Hif2a</i>	1.56	ND	ND	ND
<i>Hnrnpm</i>	1.25	7.91	6.34	0.76
<i>Hpse</i>	17.68	7.70	-2.30	0.07
<i>Id1</i>	1.75	ND	ND	ND
<i>Ifna1</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Igf1</i>	1.73	1.42	-1.22	0.07
<i>Igf1r</i>	4.65	4.94	1.06	0.00
<i>Itgav</i>	5.01	7.29	1.46	0.17
<i>Itgb3</i>	1.99	15.07	7.56	0.49

<i>Jag1</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Mdk</i>	2.08	ND	ND	ND
<i>Mmp14</i>	3.04	4.42	1.45	0.17
<i>Mmp2</i>	2.88	ND	ND	ND
<i>Neat-1</i>	3.20	3.44	1.08	0.17
<i>Nos3</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Nrp1</i>	3.04	2.84	-1.07	0.12
<i>Nrp2</i>	4.42	5.27	1.19	0.07
<i>P54nrb</i>	2.55	7.61	2.99	0.08
<i>Pai-1</i>	18.19	ND	ND	ND
<i>Pdgfa</i>	2.90	10.05	3.46	0.34
<i>Pecam1</i>	11.37	ND	ND	ND
<i>Pf4</i>	1.16	ND	ND	ND
<i>Pgf</i>	6.82	ND	ND	ND
<i>PLAU(upa)</i>	4.42	2.28	-1.94	0.00
<i>Plg</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Prox1</i>	1.10	3.35	3.04	0.28
<i>Psf/sfpq</i>	0.86	4.59	5.32	0.05
<i>Pspc1</i>	1.23	1.73	ND	ND
<i>Serpinf1</i>	15.49	ND	ND	ND
<i>Sphk1</i>	6.11	ND	ND	ND
<i>Tek</i>	4.07	5.49	1.35	0.16
<i>Tgfa</i>	4.75	ND	ND	ND
<i>Tgfb1</i>	3.41	5.67	1.66	0.14
<i>Tgfb2</i>	4.72	1.80	-2.63	0.06
<i>Tgfb1</i>	2.08	2.37	1.14	0.23
<i>Thbs1</i>	5.35	4.11	-1.30	0.10
<i>Thbs2</i>	3.77	3.29	-1.15	0.01
<i>Timp1</i>	2.75	2.05	-1.34	0.12
<i>Timp2</i>	2.12	1.94	-1.09	0.14
<i>Timp3</i>	5.20	ND	ND	ND
<i>Vash1</i>	7.43	ND	ND	ND
<i>Vegfa</i>	8.15	14.73	1.81	0.19
<i>Vegfb</i>	1.94	6.41	3.31	0.34
<i>Vegfc</i>	-	-	-	-
<i>Vegfd</i>	2.77	ND	ND	ND
<i>Vegfr2 (kdr)</i>	3.04	2.28	-1.33	0.13

Supplementary File 2. Translatome of (lymph)angiogenic factor genes in hypoxic HL-1 cardiomyocytes. Polysomes were purified on sucrose gradient from HL-1 cardiomyocytes either in normoxia or after 4 h or 24 h of hypoxia at 1% O₂, as described in Materials and Methods. RNA was purified from polysome-bound and from cell lysate (before gradient loading). cDNA and PCR array was performed as in Figure 1 and in Sup File 1. Relative quantification (RQ) of gene expression in hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (polysomal RNA/total RNA normalized to normoxia). The 4 h time of hypoxia array was repeated in two independent arrays (RQ1 and RQ2). The values presented in Figures 2 and 3 correspond to RQ1 values. In Figure 6 A and 6 B, values are from RQ2. For RQ1, gene expression analysis was performed in three biological replicates (cell culture well and

cDNA), each of them measured in three technical replicates (PCR reactions). For RQ2 (4 h and 24 h), analysis was performed in two biological replicates, each of them measured in two technical replicates. Standard deviation is indicated. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as - 1/RQ. ND means “non detected”. “-” means that the gene was not included in the array.

Hantelys et al, Supplementary File 3

A/ Kinetics of FGF1 IRES activity in hypoxia (30 min to 24 h)

Normoxia

LucF	1	2	3
0.5 h/ 16 h	1379893	1430614	1379161
1 h	1125637	1523078	1518366
2 h	1261000	1469939	1356217
4 h	1154339	1436444	1532732
6 h	1357302	1583219	1525817
8 h/ 24 h	1772344	1668645	1416015

LucR	1	2	3
0.5 h/ 16 h	7946845	8739701	8113491
1 h	7848356	8700328	8205407
2 h	7763820	8766358	8196176
4 h	6957128	8160444	8944535
6 h	8571896	9444154	9233090
8 h/ 24 h	8896288	8402478	7130206

LucF/LucR	1	2	3
0.5 h/ 16 h	0.1736	0.1637	0.1700
1 h	0.1434	0.1751	0.1850
2 h	0.1624	0.1677	0.1655
4 h	0.1659	0.1760	0.1714
6 h	0.1583	0.1676	0.1653
8 h/ 24 h	0.1992	0.1986	0.1986

Hypoxia

LucF	1	2	3
0.5 h	1758060	1725309	1674165
1 h	1475799	1562285	1591315
2 h	1728494	1889719	1927154
4 h	1891657	1744526	2255783
6 h	1815024	2151709	2541526
8 h	2143188	2354330	2311918
16 h	1860159	1762647	1940120
24 h	1733141	1936317	2026315

LucR	1	2	3
0.5 h	11000223	10866380	10294397
1 h	10257343	10319905	10828619
2 h	11652705	11702822	12633961
4 h	10450445	10725351	12210832
6 h	10117963	10586170	10958961
8 h	10592865	10001462	10350135
16 h	12250023	11839180	12615589
24 h	14326454	13708075	16512683

LucF/LucR	1	2	3
0.5 h	0.1598	0.1588	0.1626
1 h	0.1439	0.1514	0.1470
2 h	0.1483	0.1615	0.1525
4 h	0.1810	0.1627	0.1847
6 h	0.1794	0.2033	0.2319
8 h	0.2023	0.2354	0.2234
16 h	0.1518	0.1489	0.1538
24 h	0.1210	0.1413	0.1227

IRES activity

Hypoxia time (h)	LucF/LucR Mean	SD	IRES activity: LucF/LucR *100	SD	Mann-Whitney test P Value	Significance
0 (n=18)	0.1726	0.0131	17.26	1.31		
0.5 (n=3)	0.1604	0.0020	16.04	0.20	0.0444	*
1 (n=3)	0.1474	0.0038	14.74	0.38	0.0098	**
2 (n=3)	0.1541	0.0067	15.41	0.67	0.0158	**
4 (n=3)	0.1761	0.0118	17.61	1.18	0.7308	
6 (n=3)	0.2049	0.0263	20.49	2.63	0.0165	*
8 (n=3)	0.2204	0.0167	22.04	1.67	0.0015	**
16 (n=3)	0.1515	0.0025	15.15	0.25	0.0098	**
24 (n=3)	0.1283	0.0112	12.83	1.12	0.0015	**

*= p<0.05

**=p<0.01

B/ FGF1 IRES

LucF

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	77 310	91 175	63 445	52 728	58 279	56 285	59 485	53 665	53 223
	Hypoxia	248 088	192 876	303 300	138 626	171 997	152 394	110 552	157 006	149 316
8h	Normoxia	3 721	5 041	2 401	72 622	72 505	73 578	121 992	112 068	132 044
	Hypoxia	10 760	12 896	8 624	70 529	72 640	33 059	118 486	109 078	112 198
24h	Normoxia	231 071	198 199	263 943	208 454	220 996	210 670	226 971	199 587	262 787
	Hypoxia	138 279	153 534	123 025	100 770	113 450	99 785	105 268	70 597	90 603

LucR

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	604 174	507 891	700 457	452 118	345 763	472 356	495 500	529 252	547 526
	Hypoxia	996 143	899 215	1 093 070	714 978	915 991	757 182	754 720	974 680	917 680
8h	Normoxia	12 580	13 628	11 532	700 579	710 733	712 400	912 286	860 603	855 579
	Hypoxia	35 746	46 304	25 188	631 364	634 140	633 140	826 664	827 015	822 262
24h	Normoxia	1 010 280	1 134 589	885 971	1 021 135	1 036 550	1 020 270	956 252	896 252	789 825
	Hypoxia	662 414	716 741	608 087	519 324	514 720	769 988	455 239	386 245	351 256

LucF/LucR

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.1280	0.1795	0.0906	0.1166	0.1686	0.1192	0.1201	0.1014	0.0972
	Hypoxia	0.2490	0.2145	0.2775	0.1939	0.1878	0.2013	0.1465	0.1611	0.1627
8h	Normoxia	0.2958	0.3699	0.2082	0.1037	0.1020	0.1033	0.1337	0.1302	0.1543
	Hypoxia	0.3010	0.2785	0.3424	0.1117	0.1145	0.0522	0.1433	0.1319	0.1365
24h	Normoxia	0.2287	0.1747	0.2979	0.2041	0.2132	0.2065	0.2374	0.2227	0.3327
	Hypoxia	0.2338	0.1478	0.1675	0.1974	0.2435	0.1885	0.2312	0.1828	0.2579

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	12.46	3.07		0.0012	**
	Hypoxia	19.94	4.27	1.60		
8h	Normoxia	17.79	9.57		0.8633	
	Hypoxia	17.91	10.10	1.01		
24h	Normoxia	23.53	4.95		0.2581	
	Hypoxia	20.46	3.56	0.87		

C/ FGF2 IRES

LucF

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	89 743	98 302	91 878	104 059	102 906	102 632	80 652	78 568	70 687
	Hypoxia	109 876	111 252	98 034	109 548	111 252	120 034	85 698	90 565	84 568
8h	Normoxia	146 589	149 931	129 865	84 185	90 263	75623	80 256	77 895	79 568
	Hypoxia	124 357	130 350	152 345	85 227	82 565	78 265	80 268	82 568	79 635
24h	Normoxia	116 853	120 498	124 567	226 539	198 256	161 526	178 258	170 625	168 262
	Hypoxia	182 431	173 530	165 431	245 261	256 154	198 782	258 684	298 365	224 265

LucR

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	628834	603251	508251	686008	676840	627525	458252	398254	405258
	Hypoxia	457353	502343	376543	492213	456687	475340	386685	356812	298568
8h	Normoxia	876234	1012834	786352	647158	709937	655582	478584	489656	505362
	Hypoxia	508675	642576	756243	592213	556687	604257	425542	398568	405268
24h	Normoxia	576834	715157	496642	686695	677527	628212	578568	550268	562454
	Hypoxia	780284	1173705	987564	1242151	1051822	1054542	978587	857258	895635

LucF/LucR

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.1427	0.1630	0.1808	0.1517	0.1520	0.1636	0.1760	0.1973	0.1744
	Hypoxia	0.2402	0.2215	0.2604	0.2226	0.2436	0.2525	0.2216	0.2538	0.2832
8h	Normoxia	0.1673	0.1480	0.1651	0.1301	0.1271	0.1154	0.1677	0.1591	0.1574
	Hypoxia	0.2445	0.2029	0.2014	0.1439	0.1483	0.1295	0.1886	0.2072	0.1965
24h	Normoxia	0.2026	0.1685	0.2508	0.3299	0.2926	0.2571	0.3081	0.3101	0.2992
	Hypoxia	0.2338	0.1478	0.1675	0.1974	0.2435	0.1885	0.2643	0.3480	0.2504

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	16.68	1.70		<0.0001	****
	Hypoxia	24.44	2.08	1.46		
8h	Normoxia	14.86	1.96		0.0503	ns
	Hypoxia	18.48	3.69	1.24		
24h	Normoxia	26.88	5.41		0.0939	ns
	Hypoxia	22.68	6.03	0.84		

D/ VEGFA IRES a

LucF

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	106 987	7 470	80 384	80 568	75 356	78 658	68 256	60 658	58 698
	Hypoxia	198 708	10 543	112 982	187 525	175 862	168 568	105 364	121 231	135 682
8h	Normoxia	140 987	13 381	229 805	100 578	96 235	97268	230 264	214 235	221 658
	Hypoxia	291 799	15 874	217 091	186 568	202 525	164 570	402 562	380 256	351 214
24h	Normoxia	95 467	11 501	66 548	102 540	110 402	98 758	125 214	123 214	110 254
	Hypoxia	43 998	3 278	18 093	60 568	55 845	68 025	70 658	65 252	64 154

LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	557 863	620 150	654 367	512 362	458 685	398 568	369 568	398 658	405 235
	Hypoxia	1 387 607	1 255 594	987 656	985 365	987 878	865 258	875 698	870 258	865 234
8h	Normoxia	1 098 767	1 618 781	1 579 760	758 652	684 594	705635	656 265	652 485	698 584
	Hypoxia	1 465 480	1 285 249	1 354 320	1 025 268	985 698	1 014 254	878 258	852 012	878 565
24h	Normoxia	1 246 587	1 620 876	1 674 890	878 985	985 635	868 457	758 587	765 625	720 258
	Hypoxia	1 054 689	879 823	987 698	1 121 245	1 002 568	987 685	975 685	985 625	945 252

LucF/LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.1918	0.0120	0.1228	0.1572	0.1643	0.1974	0.1847	0.1522	0.1448
	Hypoxia	0.1432	0.0084	0.1144	0.1903	0.1780	0.1948	0.1203	0.1393	0.1568
8h	Normoxia	0.1283	0.0083	0.1455	0.1326	0.1406	0.1378	0.3509	0.3283	0.3173
	Hypoxia	0.1991	0.0124	0.1603	0.1820	0.2055	0.1623	0.4584	0.4463	0.3998
24h	Normoxia	0.0766	0.0071	0.0397	0.1167	0.1120	0.1137	0.1651	0.1609	0.1531
	Hypoxia	0.0417	0.0037	0.0183	0.0540	0.0557	0.0689	0.0724	0.0662	0.0679

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	14.75	5.61		0.4363	ns
	Hypoxia	13.84	5.66	0.94		
8h	Normoxia	18.77	11.64		0.1359	ns
	Hypoxia	24.73	15.24	1.32		
24h	Normoxia	10.50	5.47		0.0244	*
	Hypoxia	4.99	2.42	0.48		

E/ VEGFA IRES b

LucF

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	140 874	98 149	100 854	102 368	112 327	106 258	104 241	124 251	114 212
	Hypoxia	100 976	91 883	93 743	86 358	87 652	85 365	80 242	78 658	81 542
8h	Normoxia	159 873	208 754	170 983	130 254	112 584	112 547	124 212	110 226	102 265
	Hypoxia	378 983	513 871	389 750	298 654	305 265	300 245	310 245	302 142	298 265
24h	Normoxia	499 864	537 099	556 098	498 567	465 856	475 554	487 568	452 028	435 982
	Hypoxia	350 980	439 788	345 230	345 268	344 568	324 265	285 475	284 658	235 268

LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	1 087 650	2 019 783	1 876 580	986 256	968 586	987 584	876 548	857 625	985 562
	Hypoxia	2 098 750	2 993 873	3 542 712	1 987 584	1 876 258	1 785 625	1 685 265	1 457 235	1 471 457
8h	Normoxia	2 178 659	2 269 092	2 157 890	1 587 568	1 658 258	1 785 547	1 325 328	1 245 258	1 475 682
	Hypoxia	2 765 909	3 127 386	2 987 652	2 258 586	2 457 268	2 358 625	2 425 241	2 574 625	2 145 258
24h	Normoxia	3 987 600	3 794 801	3 654 780	3 685 658	3 545 658	3 365 245	3 258 654	3 214 651	3 254 478
	Hypoxia	3 265 890	3 614 913	2 764 579	2 998 586	3 058 248	3 124 025	3 021 214	2 875 625	2 874 246

LucF/LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.1295	0.0486	0.0537	0.1038	0.1160	0.1076	0.1189	0.1449	0.1159
	Hypoxia	0.0481	0.0307	0.0265	0.0434	0.0467	0.0478	0.0476	0.0540	0.0554
8h	Normoxia	0.0734	0.0920	0.0792	0.0820	0.0679	0.0630	0.0937	0.0885	0.0693
	Hypoxia	0.1370	0.1643	0.1305	0.1322	0.1242	0.1273	0.1279	0.1174	0.1390
24h	Normoxia	0.1254	0.1415	0.1522	0.1353	0.1314	0.1413	0.1496	0.1406	0.1340
	Hypoxia	0.1075	0.1217	0.1249	0.1151	0.1127	0.1038	0.0945	0.0990	0.0819

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	10.43	3.25		0.0005	***
	Hypoxia	4.45	0.98	0.43		
8h	Normoxia	7.88	1.11		<0.0001	****
	Hypoxia	13.33	1.33	1.69		
24h	Normoxia	13.90	0.85		<0.0001	****
	Hypoxia	10.68	1.37	0.77		

F/ VEGFC IRES

LucF

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	17 645	16 237	15 672	15 245	14 582	13 258	18 750	16 985	19 754
	Hypoxia	21 673	18 377	17 834	19 875	18 625	17 485	17 258	16 238	14 587
8h	Normoxia	21 673	18 377	17 834	20 235	20 146	19 826	16 987	17 258	16 784
	Hypoxia	27 742	18 374	19 875	26 587	21 457	20 358	30 268	31 245	30 216
24h	Normoxia	23 451	21 422	22 765	21 568	20 148	18 759	19 867	20 235	28 220
	Hypoxia	30 194	22 544	26 876	28 568	27 532	26 352	19 287	24 568	22 586

LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	287 654	316 145	365 786	195 685	185 247	182 457	205 236	204 325	210 214
	Hypoxia	302 234	354 485	345 290	298 538	290 265	284 242	280 142	270 268	262 874
8h	Normoxia	425 763	455 482	480 013	390 584	382 546	367 856	356 258	321 252	384 276
	Hypoxia	403 294	341 909	375 634	390 268	352 632	342 268	410 226	401 236	410 256
24h	Normoxia	420 632	391 071	375 100	410 214	402 158	402 387	398 268	396 216	381 568
	Hypoxia	452 093	342 612	410 973	402 358	412 586	398 574	398 265	396 246	362 142

LucF/LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.0613	0.0514	0.0428	0.0779	0.0787	0.0727	0.0914	0.0831	0.0940
	Hypoxia	0.0717	0.0518	0.0516	0.0666	0.0642	0.0615	0.0616	0.0601	0.0555
8h	Normoxia	0.0509	0.0403	0.0372	0.0518	0.0527	0.0539	0.0477	0.0537	0.0437
	Hypoxia	0.0688	0.0537	0.0529	0.0681	0.0608	0.0595	0.0738	0.0779	0.0737
24h	Normoxia	0.0558	0.0548	0.0607	0.0526	0.0501	0.0466	0.0499	0.0511	0.0740
	Hypoxia	0.0668	0.0658	0.0654	0.0710	0.0667	0.0661	0.0484	0.0620	0.0624

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	7.26	1.75			
	Hypoxia	6.05	0.67	0.83	0.1359	ns
8h	Normoxia	4.80	0.62			
	Hypoxia	6.55	0.91	1.36	0.0003	***
24h	Normoxia	5.50	0.82			
	Hypoxia	6.38	0.64	1.16	0.0315	*

G/ VEGFD IRES

LucF

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	1 123 453	1 092 536	1 242 342	125 682	123 122	120 268	1 252 025	985 986	1 025 254
	Hypoxia	1 087 648	1 129 996	1 250 434	110 236	112 025	99 856	1 452 638	1 258 326	1 425 325
8h	Normoxia	899 766	837 544	657 889	89 526	75 862	78 588	1 418 588	1 325 682	1 312 022
	Hypoxia	1 141 352	977 778	855 973	112 252	85 211	92 252	1 912 212	1 858 562	1 757 552
24h	Normoxia	1 187 460	1 382 536	1 289 532	147 214	132 250	145 258	1 547 252	1 457 258	1 325 206
	Hypoxia	521 596	706 269	506 468	50 231	48 215	47 528	485 625	465 258	475 528

LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	11 987 690	12 069 833	12 069 833	1 265 226	1 125 268	1 125 363	10 252 682	9 253 258	11 220 214
	Hypoxia	10 657 845	12 059 630	11 656 849	1 025 236	989 265	1 125 236	11 212 241	13 258 233	12 258 225
8h	Normoxia	13 799 872	14 349 216	12 764 891	1 325 662	1 685 236	1 256 364	12 452 120	11 572 582	11 457 582
	Hypoxia	11 678 964	10 969 410	12 345 654	1 152 635	1 232 568	1 152 332	10 214 785	9 865 236	11 525 852
24h	Normoxia	14 908 768	16 101 138	15 779 780	1 658 235	1 751 820	1 256 250	10 475 685	11 452 232	10 254 362
	Hypoxia	8 765 789	9 428 743	9 076 890	895 652	952 325	875 252	9 258 352	8 562 265	8 956 825

LucF/LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.0937	0.0905	0.1029	0.0993	0.1094	0.1069	0.1221	0.1066	0.0914
	Hypoxia	0.1021	0.0937	0.1073	0.1075	0.1132	0.0887	0.1296	0.0949	0.1163
8h	Normoxia	0.0652	0.0584	0.0515	0.0675	0.0450	0.0626	0.1139	0.1146	0.1145
	Hypoxia	0.0977	0.0891	0.0693	0.0974	0.0691	0.0801	0.1872	0.1884	0.1525
24h	Normoxia	0.0796	0.0859	0.0817	0.0888	0.0755	0.1156	0.1477	0.1272	0.1292
	Hypoxia	0.0595	0.0749	0.0558	0.0561	0.0506	0.0543	0.0525	0.0543	0.0531

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	10.25	1.01		0.5043	ns
	Hypoxia	10.59	1.28	1.03		
8h	Normoxia	7.70	2.88		0.0503	ns
	Hypoxia	11.45	4.83	1.49		
24h	Normoxia	10.35	2.67		<0.0001	****
	Hypoxia	5.68	0.72	0.55		

H/ c-myc IRES

LucF

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	2 567 872	3 651 734	3 454 332	356 812	375 210	351 278	360 212	410 251	420 215
	Hypoxia	2 029 809	3 147 437	3 256 210	275 895	265 826	245 628	310 215	325 230	312 020
8h	Normoxia	3 546 872	3 161 720	3 478 284	368 258	450 268	452 025	415 231	398 652	350 652
	Hypoxia	3 508 730	2 749 546	2 876 921	325 120	301 245	298 547	350 655	316 522	310 222
24h	Normoxia	7 768 312	8 684 097	6 987 312	358 582	258 625	247 583	362 025	352 014	342 062
	Hypoxia	7 513 771	5 782 962	7 981 903	486 250	460 258	410 258	658 250	568 260	487 210

LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	29 784 420	27 508 124	26 098 324	3 025 325	2 758 632	2 658 985	2 879 258	2 586 258	2 586 258
	Hypoxia	20 988 822	19 862 926	21 341 228	2 025 128	2 212 570	2 325 201	2 145 251	2 014 214	2 147 542
8h	Normoxia	24 900 832	29 630 539	30 983 221	2 856 985	2 140 236	2 562 120	3 125 368	2 582 321	2 836 124
	Hypoxia	23 987 042	24 750 406	25 987 577	2 653 213	2 012 251	2 120 124	2 785 624	2 658 325	2 625 258
24h	Normoxia	36 987 908	35 408 692	23 788 902	3 856 658	4 021 522	4 010 698	4 025 215	4 085 368	4 125 214
	Hypoxia	18 898 912	13 608 479	16 988 904	4 582 632	4 658 230	4 215 120	4 658 284	4 075 250	4 875 251

LucF/LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.0862	0.1328	0.1324	0.1179	0.1360	0.1321	0.1251	0.1586	0.1625
	Hypoxia	0.0967	0.1585	0.1526	0.1362	0.1201	0.1056	0.1446	0.1615	0.1453
8h	Normoxia	0.1424	0.1067	0.1123	0.1289	0.2104	0.1764	0.1329	0.1544	0.1236
	Hypoxia	0.1463	0.1111	0.1107	0.1225	0.1497	0.1408	0.1259	0.1191	0.1182
24h	Normoxia	0.2100	0.2453	0.2937	0.0930	0.0643	0.0617	0.0899	0.0862	0.0829
	Hypoxia	0.3976	0.4250	0.4698	0.1061	0.0988	0.0973	0.1413	0.1394	0.0999

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	13.15	2.23		0.6048	ns
	Hypoxia	13.57	2.32	1.03		
8h	Normoxia	14.31	3.30		0.2973	ns
	Hypoxia	12.71	1.48	0.89		
24h	Normoxia	13.63	8.82		0.0503	ns
	Hypoxia	21.95	16.04	1.61		

I/ EMCV IRES

LucF

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	1 698 754	1 842 473	1 523 420	1 852 625	1 798 265	1 658 985	1 985 625	1 895 032	1 758 320
	Hypoxia	1 768 791	1 848 197	1 212 320	1 658 986	1 725 542	1 875 258	1 254 214	1 158 220	1 258 210
8h	Normoxia	2 453 998	2 217 362	2 178 642	2 547 240	2 580 264	1 985 520	2 652 124	2 758 210	2 650 210
	Hypoxia	1 098 422	1 388 910	1 053 523	1 658 250	1 752 220	1 425 632	1 452 025	1 252 620	1 158 203
24h	Normoxia	2 987 530	3 331 188	3 097 981	2 658 568	2 784 240	2 645 280	2 875 620	2 750 215	2 458 982
	Hypoxia	3 208 903	3 551 010	3 254 552	2 985 568	3 025 106	3 685 210	3 025 240	2 920 213	3 857 920

LucR

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	1 897 642	1 739 558	1 676 425	1 325 225	1 250 265	1 325 052	2 015 210	1 989 570	1 997 212
	Hypoxia	1 497 245	1 416 380	1 123 235	998 565	865 258	1 125 580	1 328 620	1 285 210	1 275 487
8h	Normoxia	2 453 210	2 270 622	1 987 430	2 025 872	2 125 672	2 110 253	2 251 012	2 325 026	2 452 012
	Hypoxia	1 345 232	1 423 859	1 125 412	1 257 253	1 520 252	1 427 856	1 352 210	1 245 253	1 124 210
24h	Normoxia	2 234 123	2 586 791	3 142 423	1 987 562	2 358 268	2 145 214	2 454 210	2 325 620	2 332 210
	Hypoxia	2 076 764	1 593 918	2 090 845	2 125 147	2 235 126	1 989 987	2 452 012	2 145 217	2 052 982

LucF/LucR

		Biological replicates								
Time	Condition	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4h	Normoxia	0.8952	1.0592	0.9087	1.3980	1.4383	1.2520	0.9853	0.9525	0.8804
	Hypoxia	1.1814	1.3049	1.0793	1.6614	1.9943	1.6660	0.9440	0.9012	0.9865
8h	Normoxia	1.0003	0.9765	1.0962	1.2574	1.2139	0.9409	1.1782	1.1863	1.0808
	Hypoxia	0.8165	0.9755	0.9361	1.3189	1.1526	0.9984	1.0738	1.0059	1.0302
24h	Normoxia	1.3372	1.2878	0.9859	1.3376	1.1806	1.2331	1.1717	1.1826	1.0544
	Hypoxia	1.5451	2.2278	1.5566	1.4049	1.3534	1.8519	1.2338	1.3613	1.8792

IRES activity (AU : LucF/LuR x 100)

Time	Condition	Total mean	SD	H/N ratio	M-W test P value	Significance
4h	Normoxia	108.55	22.02		0.1903	ns
	Hypoxia	130.21	38.62	1.20		
8h	Normoxia	110.34	11.29		0.2224	ns
	Hypoxia	103.42	14.11	0.94		
24h	Normoxia	119.68	11.99		0.0003	***

	Hypoxia	160.16	32.22	1.34		

J/ Control without IRES (hairpin)

LucF

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
8 h	Normoxia	2082	2490	1901	4203	4273	3176	5188	5900	6041
	Hypoxia	1937	3592	2125	5664	1600	4811	3270	4499	ND
24 h	Normoxia	2262	1232	1692						
	Hypoxia	2063	3082	4574						

LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
8 h	Normoxia	91411	99067	79850	155803	142912	127454	163996	161011	198604
	Hypoxia	98850	86360	51747	100895	73120	120118	69871	75614	ND
24 h	Normoxia	95815	50314	72697						
	Hypoxia	49263	68572	104606						

LucF/ LucR

Time	Condition	Biological replicates								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
8 h	Normoxia	0.0228	0.0251	0.0238	0.0270	0.0299	0.0249	0.0239	0.0239	0.0239
	Hypoxia	0.0236	0.0245	0.0233	0.0561	0.0219	0.0400	0.0238	0.0238	0.0238
24 h	Normoxia	0.0196	0.0416	0.0411						
	Hypoxia	0.0419	0.0449	0.0437						

		AU : LucF/LucR *100		M-W test P value	Significance
Time	Condition	Total mean (n=9)	SD		
8h	Normoxia	2.80	0.45	0.4129	ns
	Hypoxia	3.88	1.47		

Supplementary File 3. IRES activities at different times of hypoxia in HL-1 cells.

Luciferase activity values and IRES activities corresponding to the experiments presented Figure

4.

A Kinetics of FGF1 IRES activity from 30 min to 24 h.

B-I Activities of the different IRES at 4 h, 8 h and 24 h of hypoxia.

J Negative control with a lentivector containing a hairpin (no IRES) between the two luciferase cistrons.

For each IRES and for each time, nine biological replicates were performed (n=9). Each biological replicates corresponds to the mean of three technical replicates. Means, standard deviation (SD) and Mann-Whitney P values comparing IRES activities in hypoxia and in normoxia were calculated. The

means are reported in the histograms of Figure 4. P-value significance is indicated: *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001.

Hantelys, Supplementary File 4

A. Proteins bound to FGF1 IRES

Normoxia (0 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	29	2	1
KCTD9_MOUSE	BTB/POZ domain-containing protein KCTD9 OS=Mus musculus GN=Kctd9 PE=2 SV=1	23	1	1
EMAL6_MOUSE	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6 OS=Mus musculus GN=Emi6 PE=2 SV=1	35	1	1
EF1A1_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Mus musculus GN=Eef1a1 PE=1 SV=3	53	1	1
H11_MOUSE	Histone H1.1 OS=Mus musculus GN=H1h1a PE=1 SV=2	28	1	1
GPR19_MOUSE	Probable G-protein coupled receptor 19 OS=Mus musculus GN=Gpr19 PE=2 SV=2	22	1	1
GUF1_MOUSE	Translation factor Guf1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Guf1 PE=1 SV=1	13	4	1

Hypoxia (4 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	51	2	2
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atpsa1 PE=1 SV=1	52	2	2
C2CD2_MOUSE	C2 domain-containing protein 2-like OS=Mus musculus GN=C2cd2 PE=1 SV=3	25	1	1
PDE8B_MOUSE	High affinity cAMP-specific and IBMK-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8B OS=Mus musculus GN=Pde8b PE=1 SV=1	23	1	1
GVIN1_MOUSE	Interferon-induced very large GTPase 1 OS=Mus musculus GN=Gvin1 PE=1 SV=1	29	1	1
ACOX1_MOUSE	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Mus musculus GN=Acox1 PE=1 SV=5	23	1	1
TAMM1_MOUSE	Phosphatidate cytidyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Tamm1 PE=1 SV=2	23	1	1
ALBU_MOUSE	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	35	1	1
TCF3_MOUSE	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Mus musculus GN=Ctcf3 PE=1 SV=1	28	1	1
VASH1_MOUSE	Vasohibin-1 OS=Mus musculus GN=Vash1 PE=2 SV=4	26	2	1

Normoxia (4 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	48	1	1
EMAL6_MOUSE	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6 OS=Mus musculus GN=Emi6 PE=2 SV=1	43	2	1
FXL14_MOUSE	F-box/LRR-repeat protein 14 OS=Mus musculus GN=Fx14 PE=2 SV=1	15	1	1
BRCC3_MOUSE	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Mus musculus GN=Brcc3 PE=1 SV=1	20	1	1
MYB1_MOUSE	Myb-related protein A OS=Mus musculus GN=Myb1 PE=1 SV=2	26	1	1
NUDC2_MOUSE	NudC domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Nudc2 PE=1 SV=1	17	1	1
GUF1_MOUSE	Translation factor Guf1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Guf1 PE=1 SV=1	14	25	1
TMPSD_MOUSE	Transmembrane protease serine 13 OS=Mus musculus GN=Tmps13 PE=2 SV=2	15	1	1

Hypoxia (8 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ACTA_MOUSE	Actin, aortic smooth muscle OS=Mus musculus GN=Acta2 PE=1 SV=1	36	1	1
ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a4 PE=1 SV=4	32	1	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	51	2	2
C2CD2_MOUSE	C2 domain-containing protein 2-like OS=Mus musculus GN=C2cd2 PE=1 SV=3	22	1	1
CSPRS_MOUSE	Component of Sp100-rs OS=Mus musculus GN=Csprs PE=2 SV=1	23	1	1
MCM8_MOUSE	DNA helicase MCM8 OS=Mus musculus GN=Mcm8 PE=1 SV=3	25	1	1
EMAL6_MOUSE	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6 OS=Mus musculus GN=Emi6 PE=2 SV=1	34	2	1
GKAP1_MOUSE	G-kinase-anchoring protein 1 OS=Mus musculus GN=Gkap1 PE=1 SV=1	26	1	1
H1T_MOUSE	Histone H1t OS=Mus musculus GN=H1st1t PE=1 SV=4	41	1	1
ALBU_MOUSE	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	41	1	1
SPE39_MOUSE	Spermatogenesis-defective protein 39 homolog OS=Mus musculus GN=Vipas39 PE=1 SV=1	20	1	1
GUF1_MOUSE	Translation factor Guf1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Guf1 PE=1 SV=1	22	1	1
VASH1_MOUSE	Vasohibin-1 OS=Mus musculus GN=Vash1 PE=2 SV=4	28	1	1

Normoxia (8 h)		Score	Spectres	Peptides
Symbol	Full name			
RM17_MOUSE	39S ribosomal protein L17, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mpl17 PE=1 SV=1	26	1	1
RS10_MOUSE	40S ribosomal protein S10 OS=Mus musculus GN=Rps10 PE=1 SV=1	42	1	1
RS19_MOUSE	40S ribosomal protein S19 OS=Mus musculus GN=Rps19 PE=1 SV=3	41	1	1
RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Mus musculus GN=Rps4x PE=1 SV=2	28	1	1
RS7_MOUSE	40S ribosomal protein S7 OS=Mus musculus GN=Rps7 PE=2 SV=1	57	2	2
ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a4 PE=1 SV=4	604	9	5
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	83	5	1
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	515	14	10
ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2	582	15	11
ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5c1 PE=1 SV=1	67	3	2
ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5o PE=1 SV=1	579	20	9
ATAD3_MOUSE	ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Atad3 PE=1 SV=1	19	1	1
CE295_MOUSE	Centrosomal protein of 295 kDa OS=Mus musculus GN=Cep295 PE=1 SV=3	32	4	1
CERU_MOUSE	Ceruloplasmin OS=Mus musculus GN=Cp PE=1 SV=2	106	5	3
CC178_MOUSE	Coiled-coil domain-containing protein 178 OS=Mus musculus GN=Ccdc178 PE=2 SV=2	21	1	1
TRIM3_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM3 OS=Mus musculus GN=Trim3 PE=1 SV=2	78	4	1
EC1_MOUSE	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Eci1 PE=1 SV=2	30	1	1
HNRPU_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Mus musculus GN=Hnmpu PE=1 SV=1	72	2	2
H12_MOUSE	Histone H1.2 OS=Mus musculus GN=H1h1c PE=1 SV=2	146	7	3
H2AV_MOUSE	Histone H2A.V OS=Mus musculus GN=H2afv PE=1 SV=3	60	3	2
H2B1B_MOUSE	Histone H2B type 1-B OS=Mus musculus GN=H1h2bb PE=1 SV=3	203	7	4
H4_MOUSE	Histone H4 OS=Mus musculus GN=Hist1h4 PE=1 SV=2	25	1	1
HXA1_MOUSE	Homeobox protein Hox-A1 OS=Mus musculus GN=Hoxa1 PE=1 SV=2	25	1	1
ITIH2_MOUSE	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Mus musculus GN=Itih2 PE=1 SV=1	43	2	2
MYBA_MOUSE	Myb-related protein A OS=Mus musculus GN=Mybl1 PE=1 SV=2	26	1	1
MTA7_MOUSE	N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL3 OS=Mus musculus GN=Mettl3 PE=1 SV=2	35	1	1
MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1	51	1	1
PDXA3_MOUSE	Plexin-A3 OS=Mus musculus GN=Plna3 PE=1 SV=2	25	1	1
PTRF_MOUSE	Polymerase I and transcript release factor OS=Mus musculus GN=Ptf1 PE=1 SV=1	67	2	2
BSN_MOUSE	Protein bassoon OS=Mus musculus GN=Bsn PE=1 SV=4	25	1	1
RTNK2_MOUSE	Rhotekin-2 OS=Mus musculus GN=Rtkn2 PE=1 SV=2	29	1	1
RUNX1_MOUSE	Runt-related transcription factor 1 OS=Mus musculus GN=Runx1 PE=1 SV=1	25	1	1
AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Mus musculus GN=Atp2a2 PE=1 SV=2	28	1	1
SPTC2_MOUSE	Serine palmitoyltransferase 2 OS=Mus musculus GN=Sptlc2 PE=1 SV=2	125	8	1
SDPR_MOUSE	Serum deprivation-response protein OS=Mus musculus GN=5dpr PE=1 SV=3	56	2	2
SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=5udg1 PE=1 SV=4	25	1	1
SAE1_MOUSE	SUMO-activating enzyme subunit 1 OS=Mus musculus GN=Sae1 PE=1 SV=1	21	1	1
GUF1_MOUSE	Translation factor Guf1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Guf1 PE=1 SV=1	17	1	1
ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadha PE=1 SV=1	119	3	3
ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadhb PE=1 SV=1	81	3	3
TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle OS=Mus musculus GN=Tnni2 PE=1 SV=2	23	1	1
RSZ7A_MOUSE	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Mus musculus GN=Rps27a PE=1 SV=2	35	1	1
CN159_MOUSE	UPF0817 protein C14orf159 homolog, mitochondrial OS=Mus musculus PE=1 SV=1	26	2	1
VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Vdac1 PE=1 SV=3	48	1	1
VDAC2_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Mus musculus GN=Vdac2 PE=1 SV=2	64	2	2

B. Proteins bound to VEGFA IRES

Normoxia (0 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
NUCL_MOUSE	Nucleolin OS=Mus musculus GN=Nd PE=1 SV=2	209	7	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	28	3	1
RN181_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase RN181 OS=Mus musculus GN=Rn181 PE=1 SV=1	26	3	1
CSPRS_MOUSE	Component of Sp100-rs OS=Mus musculus GN=Csprs PE=2 SV=1	23	4	1
C2C2L_MOUSE	C2 domain-containing protein 2-like OS=Mus musculus GN=C2c2l PE=1 SV=3	14	1	1
SAE1_MOUSE	SUMO-activating enzyme subunit 1 OS=Mus musculus GN=Sae1 PE=1 SV=1	14	1	1

Hypoxia (4 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	42	1	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	38	3	1
RN181_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase RN181 OS=Mus musculus GN=Rn181 PE=1 SV=1	30	2	1
DOC10_MOUSE	Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Mus musculus GN=Dock10 PE=1 SV=3	26	2	1
NID2_MOUSE	Nidogen-2 OS=Mus musculus GN=Nid2 PE=1 SV=2	26	2	1
C2C2L_MOUSE	C2 domain-containing protein 2-like OS=Mus musculus GN=C2c2l PE=1 SV=3	25	3	1
PLCL1_MOUSE	Inactive phospholipase C-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Plcl1 PE=1 SV=3	21	1	1

Normoxia (4 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	912	25	16
ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5o PE=1 SV=1	374	12	7
ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2	372	9	8
ADIT2_MOUSE	ADP/ATP translocase 2 OS=Mus musculus GN=Slc25a6 PE=1 SV=3	364	8	5
HNRP1_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Mus musculus GN=Hnmpu PE=1 SV=1	348	12	9
ACTA_MOUSE	Actin, aortic smooth muscle OS=Mus musculus GN=Acta2 PE=1 SV=1	147	2	1
EOHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadha PE=1 SV=1	134	8	8
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1 OS=Mus musculus GN=Actb PE=1 SV=1	119	1	1
ALBU_MOUSE	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	100	1	1
SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sudg1 PE=1 SV=4	86	1	1
ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5c1 PE=1 SV=1	78	1	1
THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acaa2 PE=1 SV=3	57	1	1
SERP1_MOUSE	Serpin H1 OS=Mus musculus GN=Serp1h1 PE=1 SV=3	54	1	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	52	3	1
PTRF_MOUSE	Polymerase I and transcript release factor OS=Mus musculus GN=Ptf1 PE=1 SV=1	51	1	1
AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Mus musculus GN=Atp2a2 PE=1 SV=2	46	1	1
ILF2_MOUSE	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Mus musculus GN=Ilf2 PE=1 SV=1	43	2	2
MOC53_MOUSE	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOC53 OS=Mus musculus GN=Mocs3 PE=1 SV=1	39	1	1
MYOG_MOUSE	Myogenin OS=Mus musculus GN=Myog PE=1 SV=2	33	1	1
TAGAP_MOUSE	T-cell activation Rho GTPase-activating protein OS=Mus musculus GN=Tagap PE=2 SV=2	27	1	1
OH10_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 PE=1 SV=1	26	1	1
C2C2L_MOUSE	C2 domain-containing protein 2-like OS=Mus musculus GN=C2c2l PE=1 SV=3	25	2	1
EFC14_MOUSE	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 14 OS=Mus musculus GN=Efcab14 PE=2 SV=1	24	1	1
SPR1_MOUSE	Protein spire homolog 1 OS=Mus musculus GN=Spire1 PE=1 SV=1	24	1	1
ATAD3_MOUSE	ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Atad3 PE=1 SV=1	20	1	1

Hypoxia (8 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
SPTC2_MOUSE	Serine palmitoyltransferase 2 OS=Mus musculus GN=Sptc2 PE=1 SV=2	20	1	1
CCD66_MOUSE	Coiled-coil domain-containing protein 66 OS=Mus musculus GN=Ccdc66 PE=1 SV=3	28	1	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	35	1	1

Normoxia (8 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
SPTC2_MOUSE	Serine palmitoyltransferase 2 OS=Mus musculus GN=Sptc2 PE=1 SV=2	20	1	1
CDC66_MOUSE	Coiled-coil domain-containing protein 66 OS=Mus musculus GN=Cdc66 PE=1 SV=3	28	1	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	35	1	1
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	60	1	1
PHRF1_MOUSE	PHD and RING finger domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Phrf1 PE=1 SV=2	41	7	1
OXR1_MOUSE	Oxidation resistance protein 1 OS=Mus musculus GN=Oxr1 PE=1 SV=3	26	1	1
KCTD9_MOUSE	BTB/POZ domain-containing protein KCTD9 OS=Mus musculus GN=Kctd9 PE=2 SV=1	24	2	1
Bik_MOUSE	Bcl-2-interacting killer OS=Mus musculus GN=Bik PE=1 SV=1	21	2	1

C. Proteins bound to EMCV IRES

Normoxia (0 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	55	2	1
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	70	2	2
KCTD9_MOUSE	BTB/POZ domain-containing protein KCTD9 OS=Mus musculus GN=Kctd9 PE=2 SV=1	23	1	1
BRCC3_MOUSE	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Mus musculus GN=Brcc3 PE=1 SV=1	30	1	1
NDE1_MOUSE	Nuclear distribution protein nudE homolog 1 OS=Mus musculus GN=Nde1 PE=1 SV=1	21	1	1
VASH1_MOUSE	Vasohibin-1 OS=Mus musculus GN=Vash1 PE=2 SV=4	26	1	1

Hypoxia (4 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	81	5	1
KCTD9_MOUSE	BTB/POZ domain-containing protein KCTD9 OS=Mus musculus GN=Kctd9 PE=2 SV=1	23	2	1
NUDC2_MOUSE	NudC domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Nudc2 PE=1 SV=1	20	1	1
PLPL1_MOUSE	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Plpla1 PE=2 SV=1	24	1	1
TAMM1_MOUSE	Phosphatidate cytidylyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Tamm41 PE=1 SV=2	21	1	1
VASH1_MOUSE	Vasohibin-1 OS=Mus musculus GN=Vash1 PE=2 SV=4	22	3	1

Normoxia (4 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
LOX15_MOUSE	Arachidonate 15-lipoxygenase OS=Mus musculus GN=Lox15 PE=1 SV=4	23	1	1
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	88	6	1
KCTD9_MOUSE	BTB/POZ domain-containing protein KCTD9 OS=Mus musculus GN=Kctd9 PE=2 SV=1	23	2	1
BRCC3_MOUSE	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Mus musculus GN=Brcc3 PE=1 SV=1	27	1	1
PCLO_MOUSE	Protein piccolo OS=Mus musculus GN=Pclo PE=1 SV=4	24	1	1
RPAP1_MOUSE	RNA polymerase II-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Rpap1 PE=1 SV=2	23	1	1
ALBU_MOUSE	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	73	1	1
GUF1_MOUSE	Translation factor Guf1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Guf1 PE=1 SV=1	24	1	1

Hypoxia (8 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides
ASAP2_MOUSE	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	36	2	1
EMAL6_MOUSE	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6 OS=Mus musculus GN=Emil6 PE=2 SV=1	30	1	1
BRCC3_MOUSE	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Mus musculus GN=Brcc3 PE=1 SV=1	24	1	1
RPAP1_MOUSE	RNA polymerase II-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Rpap1 PE=1 SV=2	23	1	1
VASH1_MOUSE	Vasohibin-1 OS=Mus musculus GN=Vash1 PE=2 SV=4	26	1	1

Normoxia (8 h)

Symbol	Full name	Score	Spectres	Peptides

ASAP2_MOUSE	Arl-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Asap2 PE=1 SV=3	38	4	1
ATAD3_MOUSE	ATPase family AAA domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Atad3 PE=1 SV=1	26	2	1
DOC1D_MOUSE	Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Mus musculus GN=Dock10 PE=1 SV=3	24	1	1
NUCL_MOUSE	Nucleolin OS=Mus musculus GN=Ncl PE=1 SV=2	40	1	1
RPAP1_MOUSE	RNA polymerase II-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Rpap1 PE=1 SV=2	29	1	1
VASH1_MOUSE	Vasohibin-1 OS=Mus musculus GN=Vash1 PE=2 SV=4	28	3	1

Supplementary File 4. BIA-MS analysis of IRES-bound proteins in hypoxic cardiomyocytes.

A-C Total cell extracts from normoxic or hypoxic HL-1 cardiomyocytes were injected into the BIAcore T200 optical biosensor device where biotinylated IRES RNAs had been immobilized. The list of bound proteins identified by mass spectrometry (LC-MS/MS) after tryptic digestion is shown for FGF1 (A), VEGF-Aa (B) or EMCV (C) IRESs, respectively. The score and the number of spectra and peptides identified are indicated. For each time of hypoxia, cells were cultivated the same time in normoxia as a control (normoxia 4 h and 8 h).

Hantelys, Supplementary File 5

FGF1 IRES

LucF		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	6165	5235	4839	9056	8546	8165	24718	28513	71475
	Si VASH1	6061	4321	6130	2819	4382	4771	25587	41809	41011
Hypoxia	Si Control	23268	23282	ND	9056	7434	4327	35934	27425	41617
	Si VASH1	3476	3798	3703	918	794	159	35078	27053	26439

LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	31326	43193	26638	18202	41546	215819	361595	537143	71475
	Si VASH1	25524	46369	20966	30708	37007	169661	310210	232371	41011
Hypoxia	Si Control	28719	24302	47957	40352	28489	166883	126093	212489	41617
	Si VASH1	14606	17491	6722	7810	5492	202073	157173	139745	26439

LucF/LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.1154	0.1671	0.1120	0.1325	0.1124	0.1632	0.1145	0.0789	0.1331
	Si VASH1	0.1235	0.1379	0.1419	0.0954	0.1482	0.1614	0.1508	0.1348	0.1765
Hypoxia	Si Control	1.1574	0.8107	ND	0.1888	0.1840	0.1520	0.2153	0.2175	0.1959
	Si VASH1	0.1729	0.1323	0.1524	0.1364	0.1016	0.0289	0.1736	0.1721	0.1892

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)					Normalized to Si control		
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	12.54	2.74	1.00	0.22		
	Si VASH1	14.12	2.31	1.13	0.18	0.2973	ns
Hypoxia	Si Control	39.02	37.86	1.00	0.97		
	Si VASH1	13.99	4.96	0.36	0.13	0.0037	**

FGF2 IRES

LucF		Biological replicates								
	SIRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	22826	21218	12844	1378436	1082836	1164807	83190	93828	99601
	Si VASH1	21094	24819	20555	2209438	826675	1840332	67392	76305	73470
Hypoxia	Si Control	19965	12844	11697	1017433	1179299	829663	67103	78868	71632
	Si VASH1	15522	15043	16528	893314	749103	966069	59989	68906	68663

LucR		Biological replicates								
	SIRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	180511	135180	129077	12202038	11842478	11986298	590388	751723	757328
	Si VASH1	125421	125058	135793	14135403	8953356	10851103	556354	613876	606021
Hypoxia	Si Control	96016	67708	75468	6222023	7669135	5269169	334572	394644	375540
	Si VASH1	68476	61198	64605	4535768	4011896	5170671	392981	376414	347094

LucF/LucR		Biological replicates								
	SIRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.1265	0.1570	0.0995	0.1130	0.0914	0.0972	0.1409	0.1248	0.1315
	Si VASH1	0.1169	0.1836	0.1592	0.1563	0.0923	0.1696	0.1211	0.1243	0.1212
Hypoxia	Si Control	0.2079	0.1897	0.1550	0.1635	0.1538	0.1575	0.2006	0.1998	0.1907
	Si VASH1	0.1617	0.2222	0.2190	0.1969	0.1867	0.1868	0.1526	0.1831	0.1978

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	12.02	2.18	1.00	0.18		
	Si VASH1	13.83	2.99	1.15	0.25	0.3401	ns
Hypoxia	Si Control	17.98	2.21	1.00	0.12		
	Si VASH1	18.97	2.31	1.05	0.13	0.7304	ns

VEGFA IRES a

LucF		Biological replicates								
	SIRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	1063	768	835	10177	10903	9795	8927	10090	10353
	Si VASH1	ND	ND	ND	12008	10355	13047	7081	6763	7085
Hypoxia	Si Control	944	938	958	21334	25229	24602	6919	8893	10550
	Si VASH1	985	1284	1040	18934	25104	26388	6087	5714	5375

LucR		Biological replicates								
	SIRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	110313	88187	88187	858315	1006460	1131780	800801	851785	976533
	Si VASH1	104087	104234	88328	1122644	949786	1245834	781558	904997	1041730
Hypoxia	Si Control	110313	88187	88187	1201671	1239986	1269291	397755	412761	462290
	Si VASH1	104087	104234	88328	1178924	1314113	1411139	397766	338569	370795

LucF/LucR		Biological replicates								
	SIRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.0084	0.0083	0.0091	0.0119	0.0108	0.0087	0.0111	0.0118	0.0106
	Si VASH1	ND	ND	ND	0.0107	0.0109	0.0105	0.0089	0.0098	0.0101
Hypoxia	Si Control	0.0086	0.0106	0.0109	0.0178	0.0203	0.0194	0.0178	0.0164	0.0153
	Si VASH1	0.0089	0.0146	0.0118	0.0161	0.0191	0.0187	0.0153	0.0169	0.0145

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	1.01	0.15	1.00	0.14		
	Si VASH1	1.01	0.07	1.01	0.07	0.9546	ns
Hypoxia	Si Control	1.52	0.42	1.00	0.28		
	Si VASH1	1.51	0.32	0.99	0.21	0.7464	ns

VEGFA IRES b

LucF		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	24407	29293	28866	636888	673362	711456	336029	485230	456130
	Si VASH1	26057	23895	24286	754530	811206	796490	377720	490184	368048
Hypoxia	Si Control	25539	27250	27360	1455967	1495875	1461388	252396	325862	292610
	Si VASH1	29633	27197	27734	1442573	1496275	1406109	290051	301154	292703

LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	204606	259243	265657	3953413	4461082	4955118	2785870	3180830	2979085
	Si VASH1	129783	131937	114093	4588230	4469611	4706020	3035339	3373906	2706872
Hypoxia	Si Control	207937	216079	211792	5227968	5137726	5358864	1206699	1464757	1496579
	Si VASH1	179775	171019	145280	5346747	5752000	5164154	1221397	1296195	1237799

LucF/LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.1193	0.1130	0.1087	0.1611	0.1509	0.1436	0.1206	0.1525	0.1531
	Si VASH1	0.1274	0.0922	0.0914	0.1644	0.1815	0.1692	0.1244	0.1453	0.1360
Hypoxia	Si Control	0.1228	0.1261	0.1292	0.2785	0.2912	0.2727	0.2092	0.2225	0.1955
	Si VASH1	0.1425	0.1259	0.1309	0.2698	0.2601	0.2723	0.2375	0.2323	0.2365

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	13.59	2.02	1.00	0.15		
	Si VASH1	13.69	3.20	1.01	0.24	0.7962	ns
Hypoxia	Si Control	20.53	6.76	1.00	0.33		
	Si VASH1	21.20	6.10	1.03	0.30	0.8633	ns

VEGFC IRES

LucF		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	246375	242933	314902	217056	137257	253247	34901	43369	30196
	Si VASH1	487878	477149	492814	229290	246978	182056	38245	41693	27884
Hypoxia	Si Control	335045	434617	425637	281808	313489	279125	24456	25053	23295
	Si VASH1	356286	400146	398669	307224	258394	357857	20099	20436	22661

LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	3487442	3595724	2160847	1940200	1317594	1986534	517859	522417	438634
	Si VASH1	5663195	5510976	2230869	1895114	2069968	1309904	562597	580376	487313
Hypoxia	Si Control	3743871	4296534	1914906	2035704	2389202	2247759	288505	254400	261953
	Si VASH1	3382601	3988748	1245215	2242942	2337124	2558068	190852	185250	218449

LucF/LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.0706	0.0676	0.1457	0.1119	0.1042	0.1275	0.0674	0.0830	0.0688
	Si VASH1	0.0861	0.0866	0.2209	0.1210	0.1193	0.1390	0.0680	0.0718	0.0572
Hypoxia	Si Control	0.0895	0.1012	0.2223	0.1384	0.1312	0.1242	0.0848	0.0985	0.0889
	Si VASH1	0.1053	0.1003	0.3202	0.1370	0.1106	0.1399	0.1053	0.1103	0.1037

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	9.41	2.94	1.00	0.31		
	Si VASH1	10.78	5.05	1.15	0.54	0.6048	ns
Hypoxia	Si Control	11.99	4.32	1.00	0.36		
	Si VASH1	13.70	7.02	1.14	0.59	0.2867	ns

VEGFD IRES

LucF		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	145323	155346	154191	47796	48288	42436	75842	68756	63160
	Si VASH1	194207	225219	224077	41472	53177	48922	50506	69895	67848
Hypoxia	Si Control	195382	241996	212936	86899	103834	88966	38323	41266	45431
	Si VASH1	179053	197152	112369	79555	81056	77725	29441	36166	41950

LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	1907458	2093765	2160847	567674	597668	541654	858060	837030	638997
	Si VASH1	1991236	2298870	2230869	517993	560985	512755	593777	780959	789452
Hypoxia	Si Control	1619167	1897011	1914906	525002	615275	500416	326465	350347	383692
	Si VASH1	1641814	1672889	1245215	536248	545353	584930	278668	318382	374719

LucF/LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.0762	0.0742	0.0714	0.0842	0.0808	0.0783	0.0884	0.0821	0.0988
	Si VASH1	0.0975	0.0980	0.1004	0.0801	0.0948	0.0954	0.0851	0.0895	0.0859
Hypoxia	Si Control	0.1207	0.1276	0.1112	0.1655	0.1688	0.1778	0.1174	0.1178	0.1184
	Si VASH1	0.1091	0.1179	0.0902	0.1484	0.1486	0.1329	0.1057	0.1136	0.1120

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	8.16	0.83	1.00	0.10		
	Si VASH1	9.19	0.70	1.13	0.09	0.0188	*
Hypoxia	Si Control	13.61	2.65	1.00	0.19		
	Si VASH1	11.98	1.97	0.88	0.14	0.1359	ns

c-myc IRES

LucF		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	252109	291920	918687	325307	384619	326642	249643	233046	183453
	Si VASH1	1424225	1180035	1295701	352401	300184	317795	186267	182128	179026
Hypoxia	Si Control	816497	422387	80789	575691	601917	534370	183838	194270	220011
	Si VASH1	622268	530019	497331	518194	406193	591820	178636	177011	163963

LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	2603194	2581366	4956962	1216742	1371688	1207546	1738743	1532354	1438325
	Si VASH1	6466612	5522384	5429788	1197183	1080280	1156255	1513541	1375704	1410980
Hypoxia	Si Control	3585096	2670578	530645	1405500	1480296	1467212	775271	746257	985294
	Si VASH1	2552808	2119514	2073981	1449064	1365072	1405441	868202	777132	863443

LucF/LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.0968	0.1131	0.1853	0.2674	0.2804	0.2705	0.1436	0.1521	0.1275
	Si VASH1	0.2202	0.2137	0.2386	0.2944	0.2779	0.2748	0.1231	0.1324	0.1269
Hypoxia	Si Control	0.2277	0.1582	0.1522	0.4096	0.4066	0.3642	0.2371	0.2603	0.2233
	Si VASH1	0.2438	0.2501	0.2398	0.3576	0.2976	0.4211	0.2058	0.2278	0.1899

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	18.19	7.26	1.00	0.40		
	Si VASH1	21.13	6.83	1.16	0.38	0.4363	ns
Hypoxia	Si Control	27.10	9.91	1.00	0.37		
	Si VASH1	27.04	7.55	1.00	0.28	0.7962	ns

EMCV IRES

LucF		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	1702630	1760136	1302068	107301	144501	143440	330170	293299	266000
	Si VASH1	5352755	7029602	3647215	112778	121482	113111	291868	245382	237669
Hypoxia	Si Control	2686430	2928766	2764654	223538	216316	233362	244519	254123	209543
	Si VASH1	ND	886021	2250249	221733	209587	204733	216546	204516	186109

LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	2208003	2016725	1796654	147772	179110	161146	365365	327375	301181
	Si VASH1	5336122	6838676	2959448	144691	146769	138309	316197	262296	254808
Hypoxia	Si Control	2156164	2373157	1936666	177395	182885	198846	173211	189437	175377
	Si VASH1	ND	730239	1752792	191909	168829	202128	170625	166261	149249

LucF/LucR		Biological replicates								
	SiRNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normoxia	Si Control	0.7711	0.8728	0.7247	0.7261	0.8068	0.8901	0.9037	0.8959	0.8832
	Si VASH1	1.0031	1.0279	1.2324	0.7794	0.8277	0.8178	0.9231	0.9355	0.9327
Hypoxia	Si Control	1.2459	1.2341	1.4275	1.2601	1.1828	1.1736	1.4117	1.3415	1.1948
	Si VASH1	ND	1.2133	1.2838	1.1554	1.2414	1.0129	1.2691	1.2301	1.2470

IRES activities (AU : LucF/LucR x 100)				Normalized to Si control			
Time	Condition	Total mean	SD	Ratio	SD	M-W P value	Significance
Normoxia	Si Control	83.05	7.41	1.00	0.09		
	Si VASH1	94.22	13.73	1.13	0.17	0.0315	*
Hypoxia	Si Control	127.47	9.64	1.00	0.08		
	Si VASH1	120.66	8.74	0.95	0.07	0.4234	ns

Supplementary File 5. Knockdown of VASH1 in HL-1 cells.

HL-1 cells transduced by the different IRES-containing lentivectors were transfected with siRNA SiVASH of SiControl and submitted to 8 h of hypoxia. Luciferase activity and IRES activities (ratio LucF/LucR x 100) were measured. For each IRES, nine biological replicates were performed with SiVASH1 or SiControl (n=9). Each biological replicate corresponds to the mean of three technical replicates. Means, standard deviation (SD) and Mann-Whitney P values comparing IRES activities with SiVASH1 or SiControl were calculated.

IRES activities corresponding to means of all biological replicates are reported in the histograms of Figure 7. P-value significance is indicated: *p<0.05, **p<0.01, ns=non significant.

Hantelys et al, Supplementary File 6

Target	Forward primer 5' to 3'	Reverse primer 5' to 3'
<i>Akt1</i>	AGAACTCTAGGCATCCCTTCC	CGTTGGCATACTCCATGACA
<i>Ang</i>	TCCTGACTCAGCACCATGAC	ACATCTTTGCAGGGTGAGGTTA
<i>Angpt1</i>	ACAACACCGGGAAGATGGAA	TTCACCAGAGGGATTCCCAAAA
<i>Angpt2</i>	GAACCAGACAGCAGCACAAA	TCGAGTCTTGTCGTCTGGTTTA
<i>Angptl4</i>	CTTGGGACCAAGACCATGAC	TGGCTACAGGTACCAAAACCA
<i>Anpep</i>	TGGGACTTTGTCCGAAGCA	TCCCTGGATGAGATTGGCAAA
<i>Apln (Apelin)</i>	GCAGGAGGAAATTTGCGAGAC	ACTTGGCGAGCCCTTCAA
<i>Aplnr</i>	TTGACTGGCCTTTTGGAACC	GCAAAAGACACTGGCGTACA
<i>Atp2a2</i>	CGGTCCAAGAGTCTCCTTCTA	GCACAATCCACTCCATCGAA
<i>Bai1</i>	GGTCCTGAGAAGCAAACCAA	GACCATTCGTTCCAGTTTCCA
<i>Ccl11 (Eotaxin)</i>	CAACAACAGATGCACCCTGAA	CACAGATCTCTTTGCCCAACC
<i>Ccl2 (mcp-1)</i>	AGCAGCAGGTGTCCCAAA	TTCTTGGGGTCAGCACAGAC
<i>Ccl21a</i>	GTCAGGACTGTGCCTTAAGTA	GCTTCTATAGCCTCGGACAA
<i>Cdh5</i>	AACGAGGACAGCAACTTCAC	TGGCATGCTCCCGATTAAAC
<i>Col18a1</i>	CAGGACCAAAGGGTGACAAA	TTCCAGGTGGAAGAGGTCAA
<i>Col4a3</i>	GCTGGTACAAGGGCAACAA	TAAGCCTGGCAATCCATCCA
<i>Ctgf</i>	AAGCTGACCTGGAGGAAAACA	TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC
<i>Cxcl1</i>	CCTGAAGCTCCCTTGGTTCA	TTCTCCGTTACTTGGGGACAC
<i>Cxcl10 (lipo10)</i>	ATCCGGAATCTAAGACCATCAAGAA	GCTCTCTGCTGTCCATCCA
<i>Cxcl5 (ena78/lix)</i>	GGCATTTCTGTTGCTGTTTAC	TGCGGCTATGACTGAGGAA
<i>Cxcl9</i>	AGCCCCAATTGCAACAAAAC	TCTTCACATTTGCCGAGTCC
<i>Cyr61</i>	CCACACCAAGGGGTTGGAA	CACAGGGTCTGCCTTCTGAC
<i>Edn1</i>	CCTGGACATCATCTGGGTCAA	AACGCTTGGACCTGGAAGAA
<i>Efn1</i>	TGGGCAAGGAGTTCAAGGAA	GCACTGGGATTCTGATGGTA
<i>Efnb2</i>	TGCCAGACAAGAGCCATGAA	GTCTTGTTGGACCGTGATTCC
<i>Egf</i>	GGAGAGACTGCTGAGTGTC	AGCCAGCACACACTCATCTA
<i>Eng</i>	AGGCATCCAACACCATCGAA	TCTAGCTGGACTGTGACCTCA
<i>Ephb4</i>	CCTCACGGAATTCATGGAGAAC	ACCAGCTGGATGACTGTGAA
<i>ErbB2 (Her2)</i>	ATTCTCAGACGCCGTTCA	TTGGCCCCAAAGGTCATCA
<i>F3</i>	ACCCAAACCCACCAACTATACC	GTGTCTGTGGTCGAGAAGCA
<i>Fgf1 (aFGF)</i>	TGGACACCGAAGGGCTTTTA	GCATGCTTCTTGAGGTGTAA
<i>Fgf2 (bFGF)</i>	TCTTCTGCGCATCCATCC	GCACACACTCCCTTGATAGACA
<i>Fgfr3</i>	AGGATTTAGACCGCATCCTCAC	CCTGGCGAGTACTGCTCAAA
<i>Flt1</i>	TTGCACGGGAGAGACTGAAA	GCCAAATGCAGAGGCTTGAA
<i>Fn1</i>	CGTCATTGCCCTGAAGAACA	AAGGGTAACCAAGTTGGGGAA
<i>Hgf</i>	CATCAAATGCCAGCCTTGGA	TCTTTACCGCGATAGCTCGAA
<i>Hif1a</i>	TCGACACAGCCTCGATATGAA	TTCCGGCTCATAACCCATCA
<i>Hnnp1b</i>	GATGCCAACCATCTGAGCAAA	CCAAATCCTATGCCCTCCATTCC
<i>Hpse</i>	GCCTCGAGGGAAGACAGTTAAA	TGCCATGTAAGAGAGTCGATCAC

<i>Id1</i>	ACCCTGAACGGCGAGATCA	GATCGTCGGCTGGAACACA
<i>Ifna1</i>	TCCACCAGCAGCTCAATGAC	TCTTCCTGGGTCAGGGGAAA
<i>Ifng</i>	GGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GCCAGTTCCTCCAGATATCCA
<i>Igf1</i>	GAGCTGGTGGATGCTCTTCA	CTCCGAATGCTGGAGCCATA
<i>Igf1r</i>	ATGGAGCCTGAGAACATGGA	CCTTGTGTCCTGAGTGTCTT
<i>Il1b</i>	TGGCAACTGTTCTGAACTCA	GGGTCCGTCAACTTCAAAGAAC
<i>Il6</i>	CCAGAAACCGCTATGAAGTTCC	GTTGTCACCAGCATCAGTCC
<i>Il8</i>	GGCTACTGTTGGCCCAATTAC	GCTTCATTGCCGGTGGAAA
<i>Itgav</i>	AAAGGCAGATGGCAAGGGAA	GGCTCCCTTCTGCTTGAGTTTA
<i>Itgb3</i>	CCCACCACAGGCAATCAAAA	GCGTCAGCACGTGTTTGTA
<i>Jag1</i>	TCCCAAGCATGGGTCTTGTA	GATGCACTTGTCGCAGTACA
<i>Lect1</i>	CCTGCCGATTTTCTGGCTTA	AGAGGGAGCACTGTTTCTCA
<i>Lep</i>	AGACCATTGTCACCAGGATCA	ATGAAGTCCAAGCCAGTGAC
<i>Mdk</i>	TTGCCCTCTTGGTGGTCAC	CCAGGTCCACTCCGAACAC
<i>Mmp14</i>	CAAGGCTGATTTGGCAACCA	GCCTTGATCTCAGTCCCAAAC
<i>Mmp2</i>	CGAGGACTATGACCGGGATA	GGGCACCTTCTGAATTTCCA
<i>Mmp9</i>	TCCCCAAAGACCTGAAAACC	GGGTGTAACCATAGCGGTAC
<i>Neat1</i>	GGGAAGCTGATTGCCAAGAA	ATGGTTTCAGAGCCCACAAC
<i>P54nrb</i>	TGGTACTCCAGCTCCTCCA	CAGCTTGGCCAAAACGTTCA
<i>Nos3</i>	GGGATTCTGGCAAGACAGACTA	GCAGCCAAACACCAAAGTCA
<i>Notch4</i>	ACCTGCTTGCAACCTTCCA	GGTGCACTCATTGACCTCCA
<i>Nrp1</i>	CCTGTATCCTGGGAACTGGTA	GCCCAACATTCCAGAGCAA
<i>Nrp2</i>	GTGGATCAGCAGCGCTAAC	GCCATCACTCTGCAGTTTCAA
<i>PAI1 (serpinE1)</i>	CAGACAATGGAAGGGCAACA	GAGGTCCACTTCAGTCTCCA
<i>Pdgfa</i>	TGTAACACCAGCAGCGTCAA	GGCTTCTCCTGACATACTCCA
<i>Pecam1</i>	GCACAGTGATGCTGAACAAC	GTCACTTGGGCTTGGATAC
<i>Pf4</i>	CCAGCCTGGAGGTGATCAA	GGCAAATTTTCTCCCATTTCTCA
<i>Pgf</i>	CCAATCGGGATCCACATTTCTA	GCCTTTGTCGTCTCCAGAATA
<i>Plau (upa)</i>	TAGCCTAGGCCTGGGGAAA	AGGCCAATCTGCACATAGCA
<i>Plg</i>	TGGAATTGCCACAGTTTCC	CCGATAGTCTTGCCATTCCC
<i>Prok2</i>	GGCTTGGCGTGTTAAGGAC	GGGTCGCATTTCAAGTTCCTAC
<i>Prox1</i>	GCCCTCAACATGCACTACAAC	CGTGATCTGCGCAACTTCC
<i>Pst/Sfpq</i>	TGAAAAGCTGGCCCAGAAGAA	TGTGCCATGCTGAGCAAAAC
<i>Pspc1</i>	TCCCCGTGGAGCAATAAACA	ATACCCATCATTGGAGGAGGAC
<i>Ptgs1</i>	TATCACCTGCGGCTCTTCAA	GTTCCACGGAAGGTGGGTA
<i>S1pr1</i>	CGGTGTAGACCCAGAGTCC	GAGAGGCCTCCGAGAAACA
<i>SerpinF1</i>	AGAACCTCAAGAGTGCTTCCA	TTCTCCAGAGGGGCAACAAA
<i>Sphk1</i>	GGCAGCTTCTGTGAACCTA	CAGCAGGTTTCATGGGTGACA
<i>Tek</i>	GTTGGATGGCAATCGAATCAC	CCAGAGCAATACACCATAGGAC
<i>Tgfa</i>	CCCTGGCTGTCCTCATTATCA	CAGTGTGTCGGAGCTGAC
<i>Tgfb1</i>	GCTGCGCTTGCAAGATTAA	GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA
<i>Tgfb2</i>	GCCATATCTATGGAGTTCAGACA	AGCGGAAGCTTCGGGATTTA

<i>Tgfb1</i>	AATTGCTCGACGCTGTTCTA	ACCGATGGATCAGAAGGTACA
<i>Thbs1</i>	CCCCAGAAGACATTCTCAGGAA	CGTTCACCACGTTGTTGTCA
<i>Thbs2</i>	GACTGCACGTCATGGTGAAC	CCCAATGAGCTCCAAAAGGAAC
<i>Tie1</i>	CCTTTGCTCAGATCGCACTA	CTCAAACAGCGACATGTTTAC
<i>Timp1</i>	TCCCCAGAAATCAACGAGACC	CATTTCACAGCCTTGAATCC
<i>Timp2</i>	GAAGAGCCTGAACCACAGGTA	TCATCCGGGAGGAGATGTA
<i>Timp3</i>	CCCTTTGGCACTCTGGTCTA	ACGTGGGGCATCTTACTGAA
<i>Tnf</i>	CAAATGGCCTCCCTCTCATCA	TGGGCTACAGGCTTGTAC
<i>Tymp</i>	GGCACACTGGATAAGCTGGAA	CAGCAGCCGACTTCCTCAA
<i>Vash1</i>	GGCTGCCAAGTTGGGGTGTGTT	AAACCAGGGCGTGGCTCCTGTA
<i>Vegfa</i>	CCAGCACATAGGAGAGATGAG	CTGGCTTTGTTCTGTCTTTCTT
<i>Vegfb</i>	GAGATGTCCCTGGAAGAACACA	TGGCTTCACAGCACTCTCC
<i>Vegfc</i>	AGACGTTCTCTGCCAGCAA	AGGCATCGGCACATGTAGTTA
<i>Vegfd (figf)</i>	TCCATTGACAGCCAGAGAA	GTGTTATCCACAGCATGTCA
<i>Vegfr2 (Kdr)</i>	ATTTACCTGGCACTCTCCA	TCCCAGGAAAGGGTTTCACA
<i>Vegfr3 (Flt4)</i>	CTCGCTCGGGACATCTACAAA	GGGCCATCCATTTCAGAGGAA
18S	CAACTAAGAACGGCCATGCA	AGCCTGCGGCTTAATTTGAC

Supplementary File 6. List of genes and primer couples used in the Fluidigm Deltagene PCR array.

Hantelys et al, EV Table 7

Effect of SiVASH1	Normoxia						Hypoxia (8h)					
RQ=2 ^{-ΔΔCT}	Total RNA		Polysomal RNA		Polysomal/total RNA		Total RNA		Polysomal RNA		Polysomal/total RNA	
Gene name	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Akt1</i>	-2.24	0.06	-2.43	0.05	-1.08	0.10	1.28	0.78	2.18	0.49	1.70	0.38
<i>Ang</i>	-6.26	0.02	-3.53	0.08	1.77	0.47	9.59	0.21	3.04	1.00	-3.15	0.10
<i>Angpt1</i>	-3.25	0.02	-4.13	0.03	-1.27	0.10	1.47	0.13	12.22	2.92	8.31	1.98
<i>Angptl4</i>	-3.11	0.10	-9.37	0.00	-3.02	0.01	ND		19.48	6.64	ND	
<i>Anpep</i>	-1.53	0.16	-1.39	0.13	1.10	0.20	ND		36.00	5.05	ND	
<i>Apelin</i>	-1.05	0.07	-13.20	0.01	-12.53	0.01	ND		-2.20	0.09	ND	
<i>Aplnnr</i>	ND		ND		ND		ND		6957.98	2051	ND	
<i>Atp2a2</i>	-3.11	0.04	-4.04	0.05	-1.30	0.15	1.53	0.15	5.96	0.15	3.90	0.10
<i>Bai1</i>	ND		1.21	0.18	ND		ND		ND		ND	
<i>Ccl2 (Mcp-1)</i>	ND		1.40	1.35	ND		ND		555.72	169	ND	
<i>Ccl21a</i>	3.37	0.70	ND		ND		-3.52	0.09	2746.64	696	9661.44	2449
<i>Col18a1</i>	-2.24	0.20	-4.59	0.05	-2.05	0.11	1.46	1.58	2.11	0.21	1.45	0.15
<i>Col4a3</i>	-6.13	0.02	-3.61	0.05	1.70	0.29	2.00	0.23	-11.14	0.02	-22.32	0.01
<i>Ctgf</i>	-3.70	0.02	-9.85	0.01	-2.66	0.05	1.41	0.72	11.04	0.04	7.83	0.03
<i>Cxcl1</i>	-2.32	0.09	-3.74	0.11	-1.61	0.25	1.78	1.03	-3.33	0.06	-5.95	0.04
<i>Cxcl10 (Inp10)</i>	1.43	0.11	-11.41	0.03	-16.31	0.02	ND		-5.30	0.07	ND	
<i>Cyr 61</i>	-4.68	0.04	-5.17	0.03	-1.11	0.14	-1.60	0.09	-1.27	0.29	1.26	0.46
<i>Edn1</i>	-3.70	0.14	-1.46	0.05	2.54	0.19	2.28	0.14	2.69	0.31	1.18	0.14
<i>Efna1</i>	-2.50	0.01	-3.55	0.06	-1.42	0.14	2.30	0.02	1.61	0.16	-1.43	0.07
<i>Efnb2</i>	-3.03	0.03	-4.28	0.01	-1.41	0.03	3.93	0.55	1.15	0.20	-3.42	0.05
<i>Egf</i>	1.40	0.31	-1.91	0.17	-2.68	0.12	ND		18.41	4.45	ND	
<i>Eng</i>	-1.99	0.24	-2.69	0.01	-1.36	0.01	ND		72.16	20.60	ND	
<i>Ephb4</i>	-2.91	0.05	-3.86	0.00	-1.33	0.00	3.83	0.44	-1.04	0.22	-4.00	0.06
<i>ErbB2(Her2)</i>	-2.39	0.03	-3.33	0.05	-1.39	0.11	1.33	0.18	-1.87	0.11	-2.49	0.08
<i>F3</i>	-6.50	0.01	-3.11	0.07	2.09	0.44	-1.15	0.00	1.06	0.14	1.22	0.16
<i>Fgf1</i>	-1.07	0.13	-2.12	0.10	-1.99	0.11	ND		31.27	4.41	ND	
<i>Fgfr3</i>	-4.55	0.05	-8.60	0.01	-1.89	0.05	1.18	0.11	-1.16	0.11	-1.37	0.09
<i>Fibrillarin</i>	-1.56	0.03	-2.50	0.06	-1.60	0.10	1.94	0.40	1.02	0.16	-1.90	0.08
<i>Flt1</i>	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Fn1</i>	-2.11	0.08	-5.21	0.05	-2.46	0.10	-2.76	0.05	1.45	0.25	4.02	0.68
<i>Hif1a</i>	-2.53	0.06	-1.84	0.06	1.38	0.16	-1.72	0.00	2.81	0.66	4.82	1.13
<i>Hif2a</i>	-1.45	0.19	-3.19	0.02	-2.21	0.03	ND		1400.66	438	ND	
<i>Hnrnpm</i>	-2.64	0.01	-2.60	0.07	1.01	0.17	-1.30	0.18	3.00	0.52	3.91	0.67
<i>Hpsc</i>	2.46	0.45	-5.42	0.05	2.20	0.02	-1.44	0.57	-1.55	0.02	-1.08	0.03
<i>Id1</i>	-5.87	0.02	ND		ND		ND		221.90	5.84	ND	
<i>Ifna1</i>	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Igf1</i>	-4.55	0.01	-1.68	0.24	2.71	1.08	13.59	9.03	18.80	3.93	1.38	0.29
<i>Igf1r</i>	-3.01	0.04	-4.41	0.01	-1.47	0.04	1.20	0.35	-2.62	0.08	-3.14	0.06
<i>Il1b</i>	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Itgav</i>	-6.43	0.01	-7.54	0.02	-1.17	0.13	ND		1.07	0.33	ND	
<i>Itgb3</i>	-3.61	0.02	-1.84	0.06	1.96	0.20	2.49	0.12	1.50	0.01	-1.66	0.00
<i>Jag1</i>	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Kdr</i>	-3.57	0.07	-4.82	0.04	-1.35	0.15	3.40	0.19	51.08	12.66	15.02	3.72

Hantelys et al, EV Table 7

<i>Lect1</i>	ND		ND		ND		ND		200.25	40.79	ND	
<i>Mdk</i>	ND		-1.83	0.18	ND		ND		25.55	0.64	ND	
<i>Mhas1</i>	ND		7.20	1.57	ND		ND		ND		ND	
<i>Mmp14</i>	-3.87	0.03	-2.79	0.01	1.38	0.02	1.50	0.31	-1.89	0.18	-2.84	0.12
<i>Mmp2</i>	ND		-1.99	0.10	ND		ND		773.55	134	ND	
<i>Mmp9</i>	ND		ND		ND		ND		171.72	4.87	ND	
<i>Neat-1</i>	1.46	0.17	-1.96	0.07	-2.86	0.05	-2.42	0.03	14.07	0.86	34.05	2.09
<i>Nos3</i>	4.68	0.08	1.03	0.38	-4.54	0.08	ND		159.83	56.00	ND	
<i>Notch4</i>	ND	ND	ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Nrp1</i>	-4.65	0.00	-3.85	0.02	1.21	0.09	2.25	0.21	2.67	0.67	1.19	0.30
<i>Nrp2</i>	-4.10	0.00	-5.25	0.04	-1.28	0.14	1.18	0.04	-3.97	0.02	-4.68	0.02
<i>P54nrb</i>	-1.90	0.01	-2.62	0.01	-1.38	0.01	-1.14	0.21	-1.38	0.20	-1.21	0.23
<i>Pdgfa</i>	-2.52	0.00	-2.80	0.04	-1.11	0.10	-1.33	0.40	2.19	0.26	2.91	0.35
<i>Pecam1</i>	1.11	0.29	-2.28	0.01	-2.53	0.01	ND		623.36	211	ND	
<i>Pf4</i>	1.65	0.34	-2.28	0.05	-3.75	0.03	ND		129.72	29.44	ND	
<i>Pgf</i>	1.15	0.48	-1.48	0.05	-1.70	0.04	ND		3.26	0.88	ND	
<i>Plou(Upa)</i>	-1.72	0.24	-2.63	0.03	-1.53	0.05	ND		9.92	2.54	ND	
<i>Plg</i>	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Prok2</i>	ND		-1.59	0.53	ND		-1.03	0.05	3.29	2.39	3.38	2.45
<i>Prox1</i>	-3.53	0.02	-1.58	0.15	2.24	0.52	-1.20	0.01	6.05	1.11	7.26	1.33
<i>Psf/Sfpq</i>	-4.33	0.00	-2.34	0.05	1.85	0.20	1.16	0.24	2.86	0.28	2.46	0.24
<i>Pspc1</i>	-1.62	0.02	-3.68	0.05	-2.27	0.08	1.52	0.14	4.80	0.81	3.17	0.54
<i>Rnasep</i>	1.00	0.01	-1.66	0.09	-1.66	0.12	-7.08	0.01	3.00	0.24	21.24	1.70
<i>Rpl11</i>	1.00	0.01	-3.23	0.05	-3.23	0.10	-1.43	0.03	-1.87	0.10	-1.31	0.14
<i>S1pr1</i>	ND	ND	-3.77	0.10	ND		ND		534.30	66.46	ND	
<i>Serpine1(Pai-1)</i>	ND	ND	-6.27	0.02	ND		ND		-8.86	0.03	ND	
<i>Serpinf1</i>	1.00	0.04	-2.32	0.15	-2.32	0.15	ND		171.48	6.11	ND	
<i>Sphk1</i>	2.11	0.94	-1.81	0.09	-3.85	0.04	ND		1.31	0.35	ND	
<i>Tek</i>	21.49	0.02	-1.79	0.17	12.03	3.59	6.90	6.50	175.01	24.06	25.35	3.48
<i>Tgfa</i>	ND		-5.44	0.03	ND		ND		2.10	0.53	ND	
<i>Tgfb1</i>	-1.49	0.13	-3.38	0.02	-2.27	0.03	-1.93	0.03	6.14	1.59	11.88	3.07
<i>Tgfb2</i>	16.43	0.02	-3.64	0.03	4.51	0.55	3.94	0.33	3.91	0.74	-1.01	0.19
<i>Tgfb3</i>	-3.55	0.09	-3.91	0.05	-2.21	0.17	1.49	0.60	1.85	0.38	1.24	0.25
<i>Thbs1</i>	38.08	0.03	-5.09	0.06	7.48	2.32	5.84	0.78	13.85	1.67	2.37	0.29
<i>Thbs2</i>	-3.67	0.00	-5.07	0.02	-1.38	0.08	1.75	0.20	-2.11	0.12	-3.70	0.07
<i>Tie1</i>	ND		ND		ND		ND		3110.72	464	ND	
<i>Timp1</i>	-2.67	0.03	-2.16	0.13	1.24	0.34	2.54	0.04	-1.46	0.16	-3.70	0.06
<i>Timp2</i>	-5.41	0.00	-2.84	0.02	1.91	0.10	8.50	0.54	3.06	0.81	-2.78	0.10
<i>Timp3</i>	-1.83	0.10	-3.10	0.09	-1.70	0.17	ND		258.64	32.90	ND	
<i>Vash1</i>	ND		-2.15	0.07	ND		ND		208.04	27.53	ND	
<i>Vegfa</i>	-5.17	0.00	-3.66	0.04	1.41	0.19	-4.39	0.08	2.30	0.67	10.07	2.93
<i>Vegfb</i>	-1.94	0.02	-1.38	0.11	1.40	0.21	-1.82	0.01	3.09	0.52	5.63	0.95
<i>Vegfd (Figf)</i>	-4.08	0.03	-1.40	0.10	2.90	0.39	ND		18.01	2.83	ND	
<i>Vegfr3</i>	ND		-6.15	0.02	ND		ND		157.75	29.23	ND	

Supplementary File 7. VASH1 depletion has both activating and inhibiting effects on mRNA recruitment into polysomes.

HL-1 cardiomyocytes were treated with siVASH1 or by siControl and submitted to 8 hours of hypoxia or maintained in normoxia (see also Fig. 8). RNA was purified from polysome fractions and from cell lysate before loading. cDNA and PCR array were performed as in Figure 1. Relative quantification (RQ) of gene expression during hypoxia was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization to 18S rRNA and to SiControl. mRNA levels (polysomal RNA/total RNA) are shown. When the RQ value is inferior to 1, the fold change is expressed as $-1/RQ$. “ND” means that RNA was not detected.

A/

taaACTAGACGCGCTCTCCGTGAACTAGCGTAGCTGACCGATATCGGTCAGCTACGCT
AGTTCACGGAGAGCGCGACTAGTGGATCCatg

B/

siControl (5' -> 3')	siVASH1 (5' -> 3')
ACCAAAUGUACAGCUGAUU	GACACUAGGACCCUUAUAAU
ACCAAAUGUACAAAAGACU	CGAAGUUCUGGAUAAAGAG
ACCAAAUGUACAAAAGGAU	CCCUCCUGGACUACAUGUU
ACCAAAUGUACAACACACU	CAUGUUAGUGUGUCCCUGU

Supplementary File 8. Hairpin and siRNA sequences.

A Sequence of the hairpin inserted in the bicistronic lentivector between LucR and Luc+ genes. The LucR stop codon and the Luc+ start codon are indicated. The complementary sequences are indicated in red and in blue, respectively.

B Sequences of the four siRNAs present in the siControl and siVASH1 smartpools.

Chapitre II : Implication
du long ARN non-codant Neat1
et du paraspeckle
dans la traduction IRES-dépendante
dans les cardiomyocytes hypoxiques

Lors du précédent chapitre, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression des gènes des facteurs (lymph)angiogéniques dans les cardiomyocytes et nous avons pu mettre en évidence que leur régulation est majoritairement transcriptionnelle. De plus nous avons montré que les IRES des facteurs (lymph)angiogéniques sont induits lors de l'hypoxie précoce dans les cardiomyocytes. Enfin nous avons identifié un ITAF de l'IRES du FGF1, VASH-1, contrôlant son activité en hypoxie. Cependant aucun régulateur de l'activité IRES globale en hypoxie dans les cardiomyocytes n'a à ce jour été identifié. Cette question fait l'objet de cette deuxième étude qui est le cœur de ma thèse : existerait-il un ITAF agissant à la manière d'un régulon ?

Pour répondre à cette question nous sommes partis de travaux de l'équipe qui ont mené à l'identification de p54^{nrb} et hnRNPM en tant qu'ITAF de l'IRES du FGF1 dans les myoblastes en différenciation¹⁷⁴. Ces deux protéines sont également des composants d'un corps nucléaire, le paraspeckle, induit en hypoxie et structuré par le long ARN non-codant *Neat1*. Nous avons donc voulu élucider le rôle de *Neat1* dans la traduction IRES-dépendante dans les cardiomyocytes hypoxiques. Pour cela l'expression de *Neat1* en hypoxie a été étudiée par hybridation *in situ* et nous avons constaté que *Neat1*, plus particulièrement son isoforme *Neat1_2* est induit en hypoxie en corrélation avec l'induction de l'activité de l'IRES FGF1. Après déplétion de *Neat1*, nous avons observé une forte diminution de l'activité de l'IRES du FGF1 visualisée par rapporteur bicistronique : nous en avons conclu que *Neat1* est impliqué dans la régulation de la traduction IRES-dépendante de FGF1.

Par la suite nous avons voulu savoir si d'autres composants du paraspeckles sont impliqués dans la régulation de la traduction coiffe-indépendante de notre modèle, l'IRES du FGF1. Nous avons confirmé par extinction des candidats que p54^{nrb} est bien un ITAF de FGF1 en hypoxie, et nous avons aussi mis en évidence pour la première fois le rôle d'ITAF de PSPC1, une des trois protéines de la famille des DBHS avec p54^{nrb} et SFPQ. Cette dernière en revanche ne régule pas l'activité de l'IRES de FGF1. Pour aller plus loin, nous avons cherché à élucidé la composition de l'IRESome en étudiant l'interactome de p54^{nrb} par spectrométrie de masse. Par immunoprécipitation de p54^{nrb} étiqueté HA dans les fractions cellulaires du noyau et du cytoplasme, nous avons identifié trois protéines interagissant avec p54^{nrb} dans le noyau en hypoxie : Nucléoline, Rps2 et hnRNPM. Nous avons alors étudié l'impact de l'extinction de ces protéines sur l'activité de l'IRES du FGF1 et avons constaté que la déplétion de nucléoline et Rps2 entraîne une baisse significative de l'activité de l'IRES du FGF1. Les protéines nucléoline et Rps2 ont ainsi été identifiées en tant que nouveaux composants de l'IRESome.

Enfin, dans le but d'évaluer le potentiel régulateur des trois composants du paraspeckle Neat1, p54^{nrb} et PSPC1, nous avons étudié l'effet de l'extinction de ces trois candidats sur l'activité d'un ensemble d'IRES présents dans les ARNm des facteurs angiogéniques, lymphangiogéniques des familles FGF et VEGF, des facteurs cardioprotecteurs IGF1R et c-myc, ainsi que de l'IRES viral EMCV. Nous avons identifiés plusieurs groupes de régulation par p54^{nrb} et/ou PSPC1 parmi les IRES étudiés, en normoxie ou hypoxie, indiquant que ces deux ITAFs ne régulent pas l'ensemble des IRES. En revanche Neat1 régule fortement l'ensemble des IRES cellulaires étudiés, indiquant que cet ARN non-codant constitue l'ITAF-clé des cardiomyocytes.

La nature des ITAF identifiés : trois composants du paraspeckle ainsi que deux protéines de l'interactome de p54, suggèrent un rôle nouveau du paraspeckle dans le contrôle de la traduction. Notre hypothèse est que le paraspeckle est une plateforme de recrutement de l'IRESome avant son export vers le cytoplasme. Ce travail désigne Neat1 comme une cible thérapeutique de grand intérêt lors de l'ischémie cardiaque.

The long non-coding RNA Neat1 is a key IRES trans-acting factor in mouse hypoxic cardiomyocytes.

Anne-Claire Godet¹, Florian David¹, Emilie Roussel¹, Franksy Hantelys¹, Joffrey Alves¹, Françoise Pujol¹, Isabelle Ader², Edouard Bertrand³, Carine Froment⁴, Anthony K. Henras⁵, Patrice Vitali⁵, Eric Lacazette¹, Florence Tatin¹, Barbara Garmy-Susini¹, and Anne-Catherine Prats^{1§}

¹UMR 1048-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France.

²UMR 1031-STROMALAB, Inserm, CNRS ERL5311, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), National Veterinary School of Toulouse (ENVT), Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France.

³UMR5535 CNRS-IGMM, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁴UMR 5099-LBME, CBI, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France.

⁵UMR5089 CNRS-IPBS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France

§Corresponding author.

Contact information : Anne-Catherine Prats, Institut des Maladies Métaboliques et

Cardiovasculaires, 1, Avenue Jean Poulhes, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France (e-mail:

Anne-Catherine.Prats@inserm.fr)

Running title: Translational control by Neat1 in hypoxia

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 HL-1 cardiomyocytes. Several previously reported ITAFs are components of a stressed-induced nuclear body, the paraspeckle. Using knockdown and proteomics approaches, we show a link between paraspeckle and IRES-dependent translation. We identify five ITAFs in hypoxic cardiomyocytes: three major paraspeckle components p54^{nrb}, PSPC1 and the lncRNA *Neat1*, as well as two proteins of the p54^{nrb} nuclear interactome, nucleolin and RpS2. PSPC1, RpS2 and *Neat1* are novel ITAFs. *Neat1* is the key of this mechanism. This lncRNA, induced by stress and essential for paraspeckle formation, is an activator of all cellular IRESs tested. *Neat1* appears as a crucial translational regulator of genes involved in tissue revascularization and cell survival.

Keywords

IRES, translation, ITAFs, non-coding RNA, stress, hypoxia, cardiac ischemia

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 cell to save energy. This process results from inactivation of the canonical cap-dependent mechanism of translation initiation (Godet et al., 2019; 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 occurring 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 for (lymph)angiogenic growth factors are induced at the translational level in hypoxic cardiomyocytes (Hantelys et al., 2019). 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 (Godet 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 before acting as a translational regulator. Previous data have also shown that a nuclear event is important for cellular IRES activity, leading to the hypothesis of IRESome formation in nucleus (Ainaoui et al., 2015; Stoneley et al., 2000).

Interestingly, several ITAFs belong to 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 protein paraspeckle protein C1 (PSPC1). DBHS proteins are known to interact with each other and to 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), which 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 of 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 c-myc IRES (Shen et al., 2017).

In this study we were interested in finding new ITAFs responsible for the activation of (lymph)angiogenic factor mRNA IRESs in HL-1 cardiomyocytes, during early hypoxia. We have previously shown that 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 are correlated with the activation of the FGF1 IRES during hypoxia. Furthermore the knockdown of p54^{nrb}, PSPC1 or *Neat1* generates a decrease in FGF1 IRES activity and in endogenous FGF1 expression. By analyzing the p54^{nrb} interactome, we identified two additional ITAFs able to control the FGF1 IRES activity: nucleolin and the ribosomal protein Rps2. Analysis of IRESs in the knockdown experiments showed that p54^{nrb} and PSPC1 are activator of several but not all other IRESs of (lymph)angiogenic and cardioprotective factor mRNAs whereas *Neat1* appears as a strong activator of all the cellular IRESs tested.

RESULTS

FGF1 IRES activation during hypoxia correlates with paraspeckle formation and with NEAT1 induction.

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 (Créancier et al., 2000; Prats et al., 2018) (Fig. 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.

The ratios LucF/LucR were measured in HL-1 cells subjected to hypoxia during 4 h, 8 h or 24 h, revealing a significant activation of the FGF1 IRES after 4 h of hypoxia, as previously shown (Hantelys et al., 2019) (Fig. 1B, Table 5). In parallel, paraspeckle formation was studied by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) targeting the non-coding RNA *Neat 1*, considered as the main marker of paraspeckles.

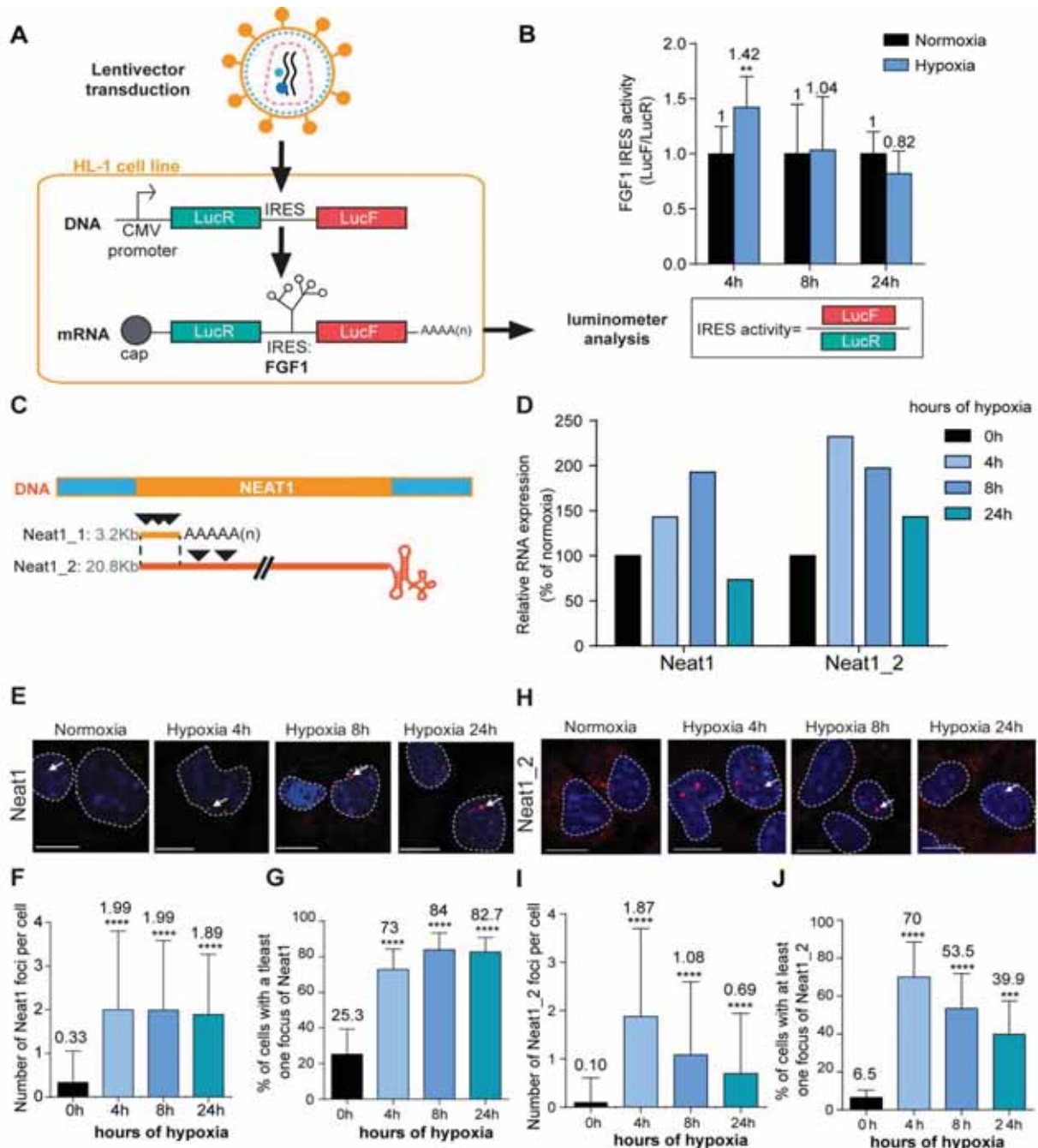


Figure 1. FGF1 IRES activation during hypoxia correlates with *Neat1* induction and paraspeckle formation.

(A) Schema depicting the Lucky Luke bicistronic construct and HL1 cell transduced by a lentivector carrying the transgene. The LucF/LucR ratio indicates the IRES activity.

(B) Activity of the human FGF1 IRES in HL1 cardiomyocytes at 4 h, 8 h or 24 h of hypoxia normalized to normoxia.

(C) 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*.

(D) HL1 cells were subjected to normoxia (0 h) or to hypoxia during 4 h, 8 h and 24 h and *Neat1* *Neat1_2* expression was analyzed by droplet digital PCR. RNA expression is normalized to normoxia time point.

(E and H) *Neat1* (E) or *Neat1_2* (H) FISH labelling in HL1 cardiomyocytes in normoxia or at 4 h, 8 h and 24 h of hypoxia 1% O₂. DAPI staining is represented in blue and *Neat1* or *Neat1_2* cy3 labelling in red. Nuclei are delimited by dotted lines. Scale bar=10µm.

(F and I) Quantification of *Neat1* (F) or *Neat1_2* (I) foci per cell by automated counting (ImageJ).

(G and J) Percentage of cell harboring at least one focus of *Neat1* (G) or *Neat1_2* (J); Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation, with Mann-Whitney (n=12) (B) or one way ANOVA (F-G, n=269-453) and (I-J, n=342-499); **p<0.01, ***<0.001, ****p<0.0001.

The fluorescent probes targeted either the common part of the two *Neat1* isoforms, either only the large isoform *Neat1_2* (Fig. 1C). The number of foci increased at 4 h with 70-80 % of cells containing at least one focus, while only 20% of the cells contained foci in normoxia (Fig. 1D, Fig. S1). This was observed with both *Neat1* and *Neat1_2* probes (Fig. 1E-1J). The values observed at 4 h did not change after 8 h and 24 h of hypoxia with the *Neat1* probe (Fig. 1E-G). In contrast, the number of containing *Neat1_2* decreased: the number of foci per cell reached 1 and 0.5, while only 50% and 40% of the cells contained at least one focus at 8 h and 24 h, respectively (Fig. 1H-J).

Neat1 and *Neat1_2* expression in cells were measured by reverse transcription and droplet digital PCR (RT ddPCR), showing an increase of *Neat1* and *Neat1_2* at 4 h with a peak of expression of *Neat1* at 8 h of hypoxia, while the peak of expression of *Neat1_2* was observed at 4 h of hypoxia (Fig. 1D).

These data revealed that FGF1 IRES activation correlates with the increase in paraspeckle formation and in *Neat1* expression after 4 h of hypoxia in HL-1 cardiomyocytes. This correlation fits better with *Neat1_2* than with the total *Neat1*.

LncRNA Neat1 knockdown 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 gapmer locked nucleic acids (LNA), 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 gapmer LNA targeting *Neat1* and with a control gapmer LNA. The knockdown efficiency was measured by FISH and ddPCR and showed a decrease in the number of paraspeckle, which shifted from 5 to 2 foci per cell (Fig. 2A and 2B, Fig. S2). In these experiments the number of paraspeckles was high in normoxia (almost 5 foci per cell), suggesting that cells were already stressed by the gapmer LNA treatment, before being submitted to hypoxia.

To evaluate the IRES activity, the ratio LucF/LucR was measured in normoxia or after 4 h of hypoxia, revealing that the IRES activity decreased by 2 upon *Neat1* depletion (Fig. 2C, Table 9). This effect was also observed on endogenous FGF1 protein expression, measured by capillary Simple Western, which decreased by 3 (Fig. 2D).

These data suggested that *Neat1* is required for FGF1 expression, and acts as an ITAF of the FGF1 IRES.

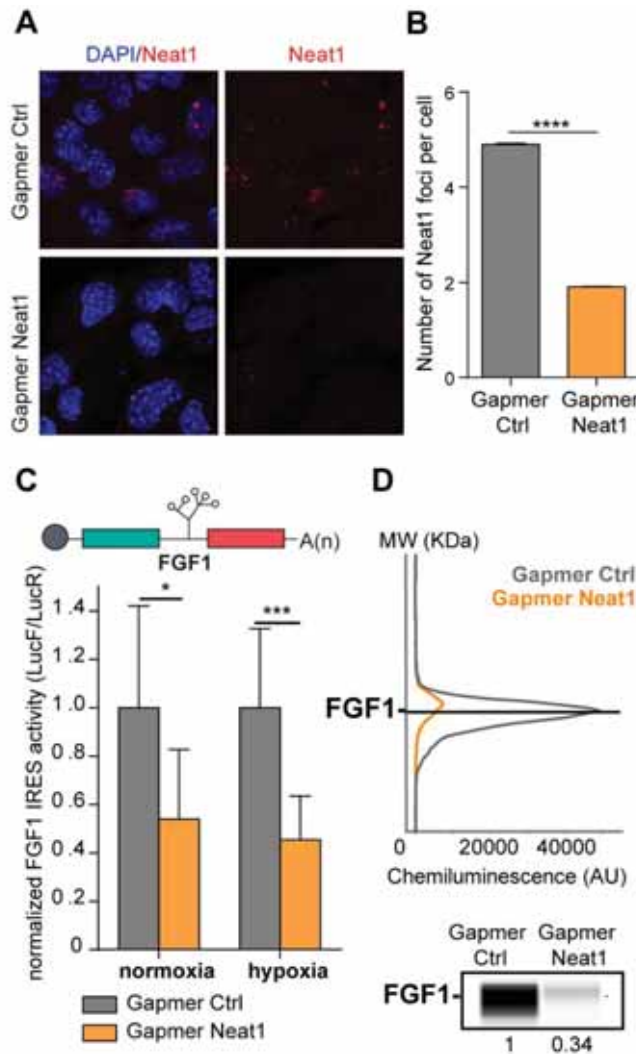


Figure 2. LncRNA *NEAT1* knockdown drastically affects the *FGF1* IRES activity and endogenous *FGF1* expression.

(A) FISH imaging of *Neat1* knockdown by a pool of LNA gapmers targeting both isoforms.

(B) *Neat1* foci counting per cell for the control LNA gapmer and *Neat1* LNA gapmer pool, using unpaired two-tailed student t-test with n=249 for control and 187 for *Neat1* gapmer LNA.

(C) *FGF1* IRES activity with Lucky Luke reporter in HL-1 with knockdown of *Neat1* during normoxia or hypoxia 1%O₂. Mann-Whitney test was performed with n=9. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

(D) Detection of endogenous mouse *FGF1* by capillary Simple Western. The curve corresponds to 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 gapmer LNA control. Total proteins are detected by a dedicated channel in capillary Simple Western.

Paraspeckle proteins p54^{nrb} and PSCP1, but not SFPQ, are ITAFs of the *FGF1* IRES.

The correlation between paraspeckle formation and *FGF1* IRES activation incited us to study the role of other paraspeckle components in the control of IRES activity. Three major paraspeckle proteins were chosen, p54^{nrb}, SFPQ and PSCP1 (Fig. 3A). Indeed, p54^{nrb} and SFPQ has 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.

HL-1 cells transduced by the Lucky Luke bicistronic construct were transfected with siRNA smartpools targeting each of the three proteins. The knockdown efficiency was checked by capillary Simple Western or classical Western (Fig. S3). Although the knockdown efficiency was below 50%, we observed a decrease in IRES activity with p54^{nrb} and PSCP1 knockdown, both in normoxia and in hypoxia (Fig. 3C-D, Table 6, 7 and 8), while the knockdown of SFPQ did not affect the IRES

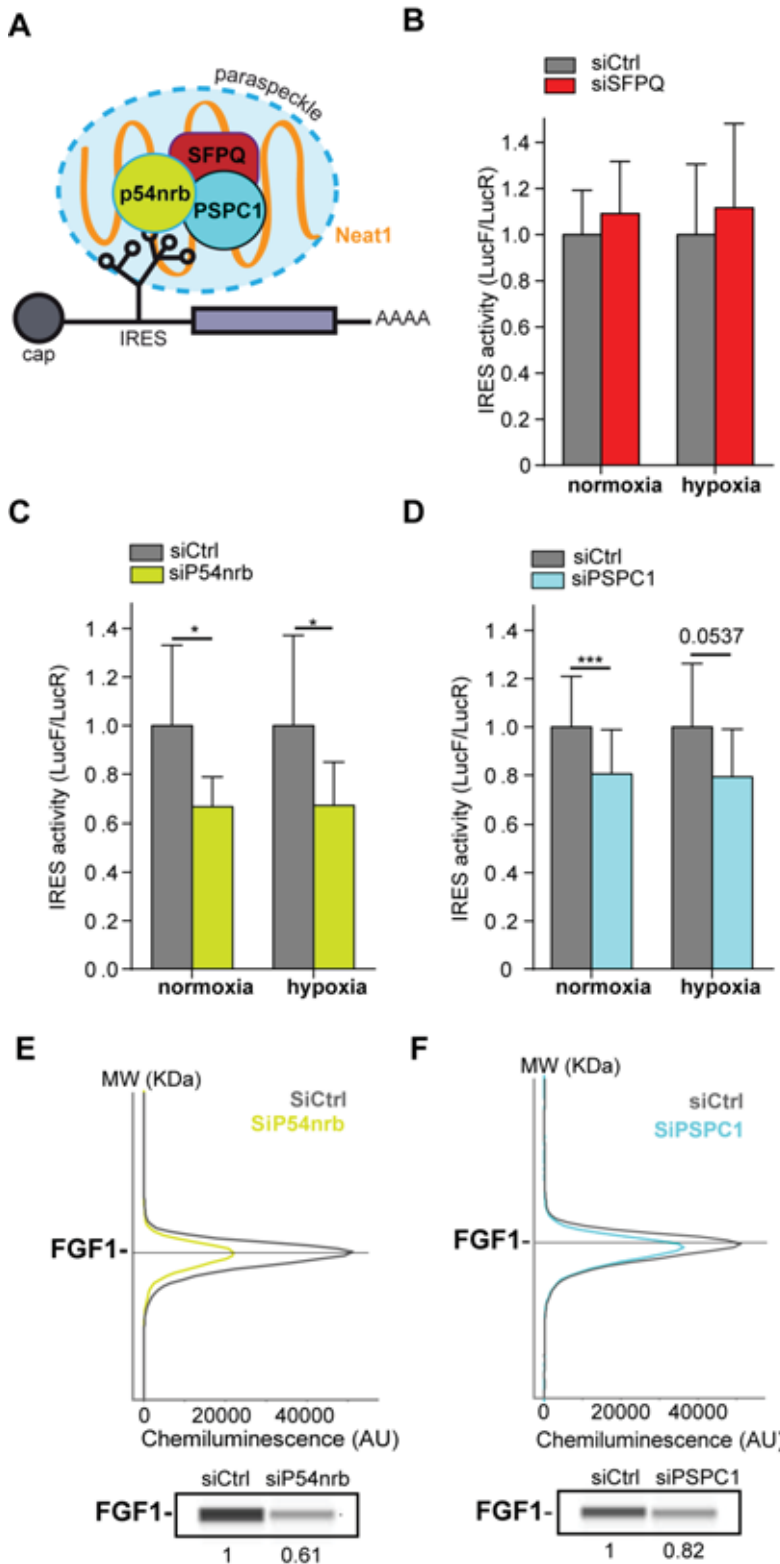


Figure 3. Paraspeckle proteins p54^{nrp} and PSCP1, but not SFPQ, are ITAFs of the FGF1 IRES.

(A) Schema of Paraspeckle and DBHS proteins bound to an IRES-containing mRNA.

(B-D) FGF1 IRES activity upon knockdown of SFPQ (B), p54^{nrp} (C) or PSCP1 (D) in HL-1 cell transduced with Lucky Luke bicistronic reporter during normoxia or hypoxia. Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation, and Mann-Whitney test with n=9; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

(E and F) Capillary Simple Western detection of endogenous FGF1 protein with p54^{nrp} (E) or PSCP1 (F) knockdown.

activity (Fig. 3B). p54^{nrp} and PSCP1 knockdown also inhibited the expression of endogenous FGF1 protein (Fig. 3E-F).

These data confirmed the ITAF role of p54^{nrp} in HL-1 cardiomyocyte, and indicated that PSCP1 is also an ITAF of the FGF1 IRES. The ability of three paraspeckle components, Neat1, p54nrp and

PSPC1 to regulate the FGF1 IRES activity led us to the hypothesis that the paraspeckle might be involved in the control of IRES-dependent translation.

p54^{nrb} interactome in normoxic and in hypoxic cardiomyocytes.

The moderate effect of p54^{nrb} or PSPC1 depletion on FGF1 IRES activity suggested that other proteins are involved. In addition, 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. For this purpose, cells were transduced by a lentivector expressing an HA-tagged p54^{nrb} (Fig. 4A). After cell fractionation (Fig. 4B), protein complexes from normoxic and hypoxic cells were immunoprecipitated with anti-HA antibody. A control was performed using total extract of non-transduced cells in normoxia. The proteins present in the immunoprecipitation eluates were then identified by mass spectrometry and statistical analysis of protein enrichment was performed. The five groups, cytoplasmic and nuclear complexes from cells subjected to normoxia or hypoxia, plus the non-transduced cell control, were pairwise compared (Fig. 4D and Fig. S4). Globally, The HA-tag capture revealed an enrichment in hnRNP in nucleus and in ribosomal proteins in cytoplasm (Fig S4A-B). In nucleus p54^{nrb} also interacted with itself (endogenous mouse Nono), PSPC1 and SFPQ, as well as with other paraspeckle components and ITAFs such as hnRNPA1, hnRNPC, hnRNPI and hnRNPK (Fig. S3A-D). As regards cytoplasmic proteins, we identified Rps25, a ribosomal protein previously described as an ITAF for many IRESs Fig. S3E-F) (Godet et al., 2019). Only few proteins were enriched when comparing hypoxic versus normoxic extracts. In hypoxic nucleus the enriched proteins are hnRNPM, nucleolin (both previously described as ITAFs) (Hertz et al., 2013; Shi et al., 2016, 2017) and the ribosomal protein Rps2/uS5 (Fig. 4D), while the helicase Ddx17, and the enolase Eno3 and the heat shock protein Hspa2 are enriched in hypoxic cytoplasm (Fig 4E).

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.

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

(Ainaoui et al., 2015; Chen et al., 2012; Godet et al., 2019; Morfoisse et al., 2016; Peddigari et al., 2013; Takagi et al., 2005).

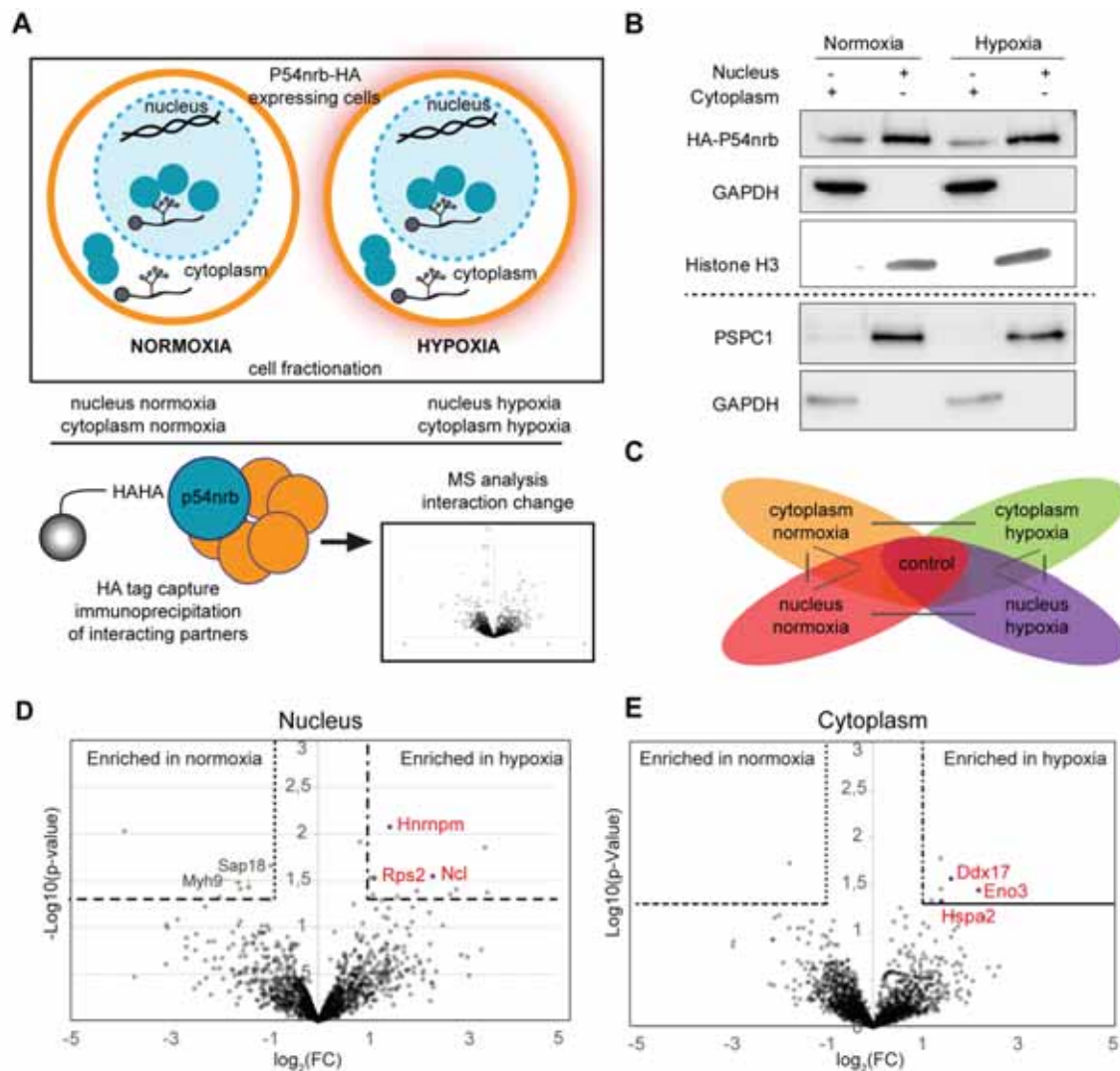


Figure 4. *p54^{nrb}* interactome in normoxic and in hypoxic cardiomyocytes.

(A) Schema of the experiment : *p54^{nrb}*-HA transduced HL1 cells were subjected to normoxia or hypoxia, then nucleus and cytoplasm fractionation was performed and extracts were immunoprecipitated using anti-HA or anti-IgG control antibody. Co-eluted proteins were identified by mass spectrometry.

(B) Western blot of fractionation experiment of HL-1 cell 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) Statistical analysis was performed by comparing each fraction versus control (total cell lysate of non-transduced cells in normoxia) or fraction versus fraction. (Supplementary material)

(D and E) Volcano plot showing proteins enriched in the nucleus in hypoxia versus normoxia (D) or enriched in the cytoplasm in hypoxia vs normoxia. An unpaired bilateral student t-test with equal variance was used. Significance thresholds are represented by dotted line.

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 (Fig. 5). The knockdown was effective, but only 50-60%, for the three mRNAs (Fig. 5A-D). This moderate

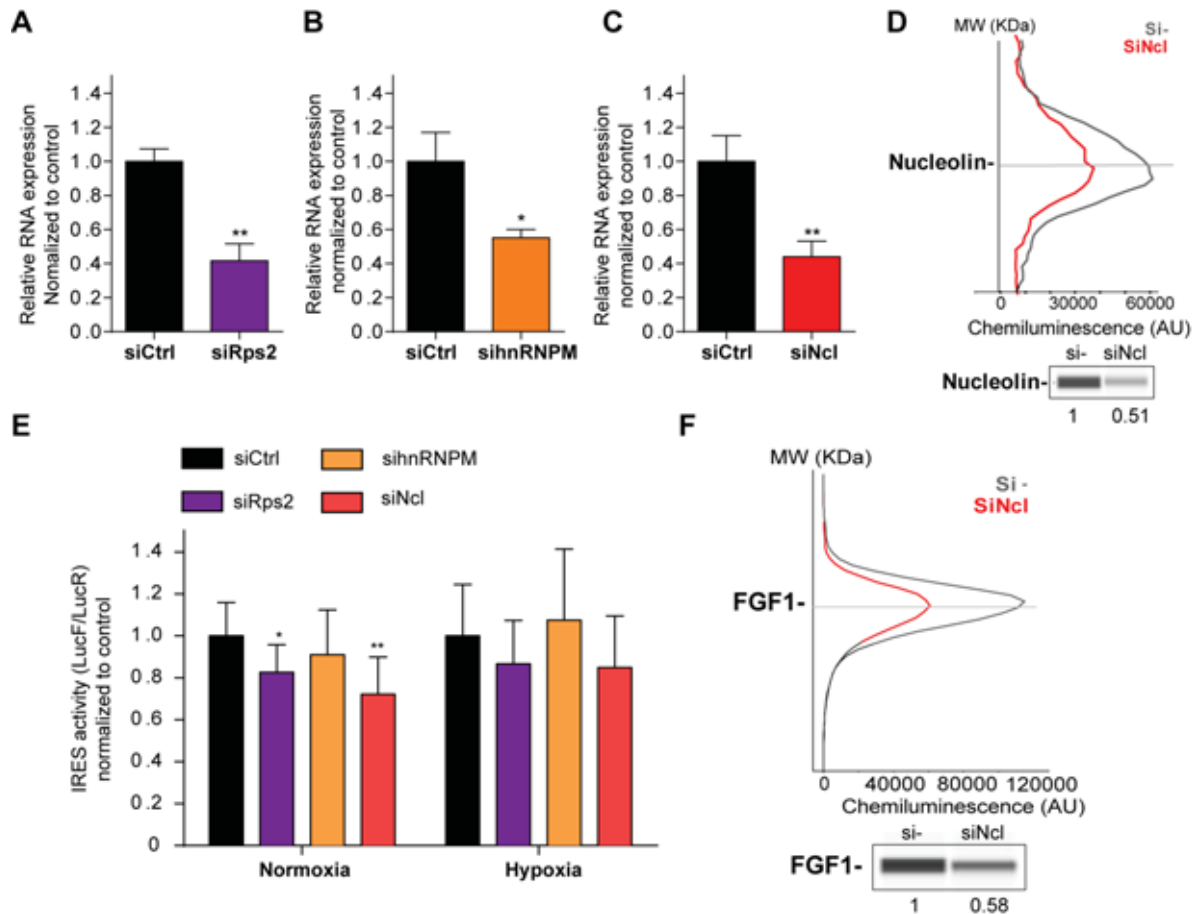


Figure 5. p54^{nrb}-interacting proteins, nucleolin and rps2, control the FGF1 IRES activity.

(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, 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 of for E Mann-Whitney test with n=9; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

(D) Capillary Simple Western of nucleolin following nucleolin knockdown.

(E) FGF1 IRES activity with knockdown by siRNA interference of candidate ITAF nucleolin in HL1 in normoxia or hypoxia 1%O₂.

(F) Capillary Simple Western of endogenous FGF1 following nucleolin knockdown. Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation.

knockdown 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 (Fig. 5E, table 10). Nucleolin depletion inhibits endogenous FGF1 protein expression (Fig. 5F). These data suggest that nucleolin and Rps2 are new ITAFs of the FGF1 IRES. Rps2 has never been described as an ITAF before the present study.

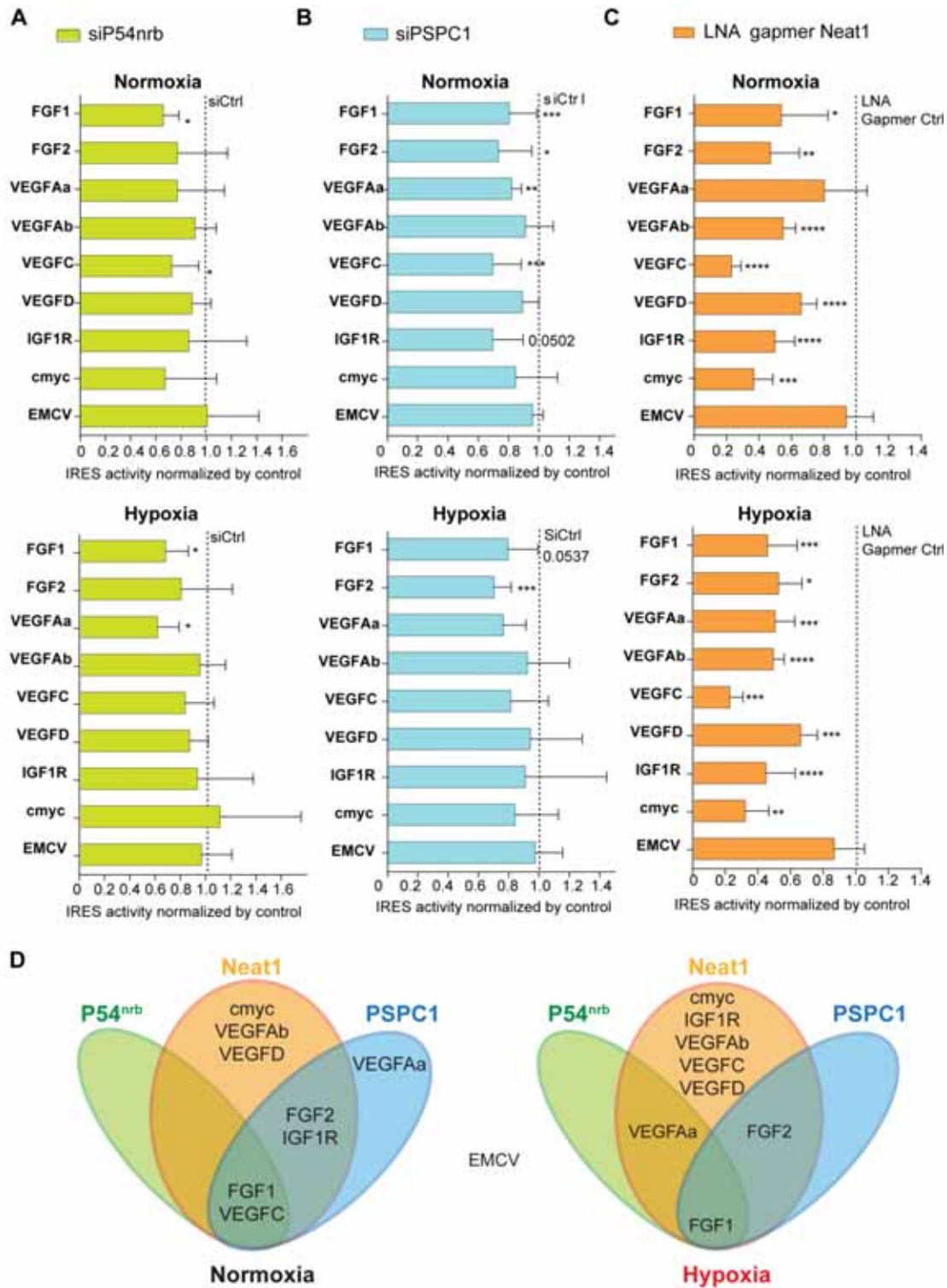


Figure 6. *Neat1* is the key activator of (lymph)angiogenic and cardioprotective factor mRNA IRESs.

(A-C) HL-1 subjected to normoxia or 1% O₂ hypoxia were transduced by Lucky Luke bicistronic lentivectors with FGF1, FGF2, VEGFAa, VEGFab, VEGFC, VEGFD, IGF1R, c-myc or EMCV IRES, then the knockdown of p54^{nrb}(A) PCPC1 (B) and *Neat1* (C) was performed as in Fig. 2 and Fig. 3. 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 test with n=9 or n=12 for FGF1 IRES; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

(D) Schema depicting groups of IRESs regulated by *Neat1*, PSPC1 or p54^{nrb} in normoxia or hypoxia.

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

We have shown above that three paraspeckle components, *Neat1*, p54^{nrb} and PSPC1, control the FGF1 IRES activity in HL-1 cardiomyocytes. To determine if this role of paraspeckle in translational control can be generalized to other IRESs, we used Lucky Luke lentivectors containing a set of other IRESs between the two luciferase genes (Fig. 6). 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 affects several IRESs but not all (Fig. 6A-B, Table 7 and 8), whereas *Neat1* depletion clearly affects all cellular IRESs but not the viral EMCV IRES (Fig. 6C, Table 9).

These data allowed us to regroup the IRESs in different “regulons” in normoxia and in hypoxia (Fig. 6D). 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 c-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.

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.

DISCUSSION

These data demonstrate a link between the paraspeckle and the control of IRES-dependent translation during hypoxia in mouse cardiomyocytes. We have identified a paraspeckle-related IRESome involving at least five ITAFs. Among them, three major paraspeckle components p54^{nrb}, PSPC1 and *Neat1*, as well as two proteins present in the p54^{nrb} nuclear interactome, nucleolin and Rps2. PSPC1, Rps2 and *Neat1* are novel ITAFs. The key actor of this nuclear-initiated mechanism controlling IRES-dependent translation is the lncRNA *Neat1*, appearing as an activator of all cellular IRESs tested, but not of the viral EMCV IRES.

It may be noted that the inhibition of IRES activities resulting from ITAF depletion are quite moderate for the different proteins (20-40%) while stronger for the lncRNA *Neat1* (40-70%). This cannot be explained only by differences in knockdown efficiency. Our hypothesis 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 completely abolish the IRES activity. Also, to understand why a 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 on the hypoxic or normoxic condition. The only constant component of the IRESome formed in paraspeckle would be *Neat1*, the central player of the process. We do not know yet whether the main actor is *Neat1_1* and/or *Neat1_2*, however the peaks of *Neat1_2* expression and of its presence in paraspeckles, in correlation with the peak of IRES activation after 4 h of hypoxia, argue in favor of *Neat1_2* (Fig. 1).

We searched for an ITAF of hypoxia able to regulate a set of IRESs and we have found the lncRNA *Neat1*. However our data show that *Neat1* also regulates IRES activities both in normoxia and in 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 the IRES is 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, 2001).

Our data contrast with the study of Shen *et al* who showed that *Neat1* depletion allows to redistribute p54^{nrb} and SFPQ/PSF onto the c-myc mRNA, in correlation with an increase in c-Myc protein (Shen et al., 2017). Several reasons may explain this lack of concordance. Firstly, we used different cell lines, HL-1 cardiomyocytes for us, HeLa and MCF7 tumor cells for them. The regulation of IRES-dependent translation varies upon cell lines. Secondly, they worked with human cell lines while HL-1 cells are of mouse origin. In human, c-myc expression is different from mouse as the c-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 c-myc IRES activity but only the binding of p54^{nrb} and SFPQ to the c-myc endogenous mRNA. Moreover an increase of c-myc protein expression does not necessarily correspond to an increase in IRES activity as the c-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 the finding of a ribosomal protein, Rps2, in the nuclear p54^{nrb} interactome. The presence of nucleolin in this complex, and the ITAF role of both proteins 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 to form specialized ribosomes.

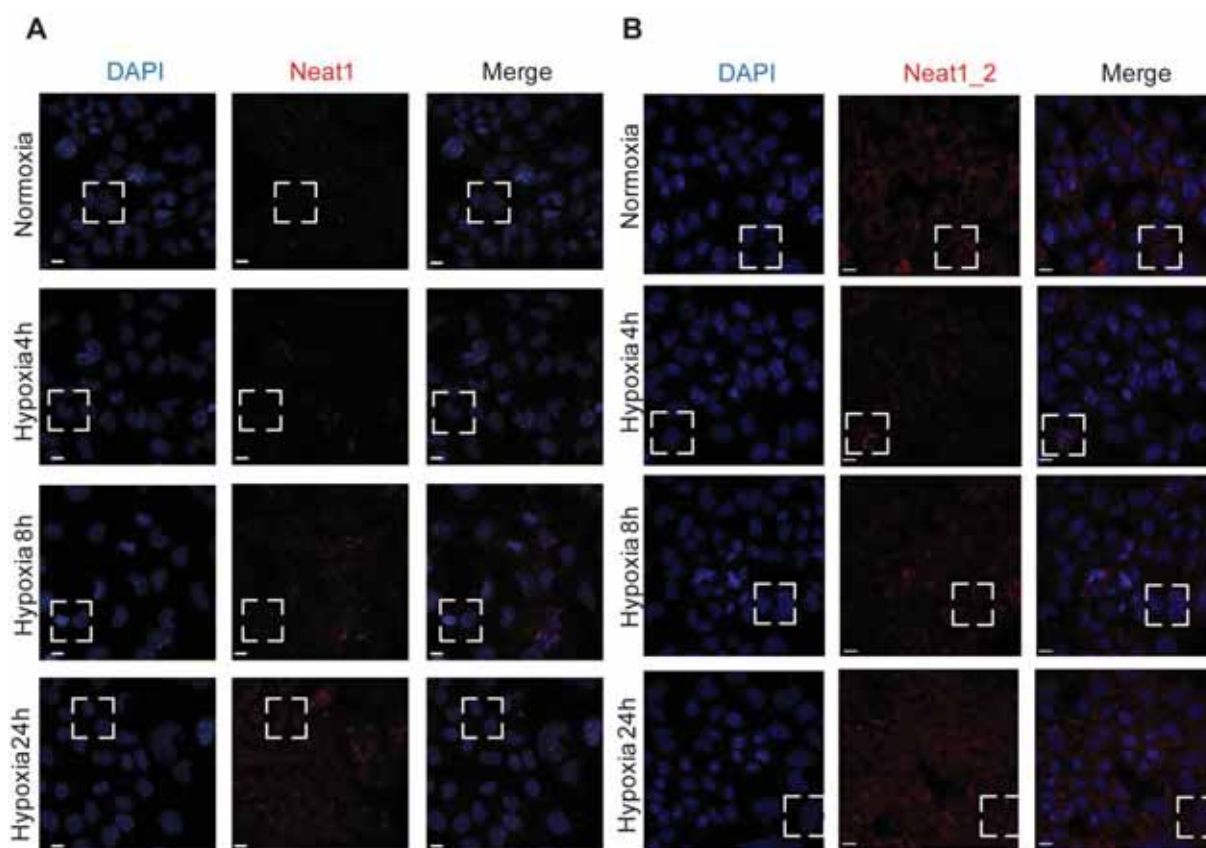
Neat1 is not the first lncRNA to exhibit an ITAF function. The lncRNA TP53-regulated modulator of p27 (TRMP) has been recently described as an ITAF of the p27^{kip} IRES (Yang et al., 2018). However these two ncRNAs are unlikely to act by the same mechanism. TRMP inhibits the p27^{kip} IRES activity by competing with the IRES for pyrimidine tract binding protein (PTB) binding and prevents IRES activation mediated by PTB. We have not yet deciphered the mechanism of action of Neat1. However we propose two models to explain its role in IRES-dependent translation. A first hypothesis is 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. A second hypothesis is that Neat1 would belong to the IRESome complex exported to the cytoplasm and might directly act on translation initiation. Supporting this possibility, the triple helix in the 3'UTR of Neat1_2 has been reported for its role on translation activation, and Neat1 has been identified in HL-1 cell polysomes (Wilusz et al., 2012)). These two models are not mutually exclusive.

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 him an potential therapeutic target of great interest.

ACKNOWLEDGMENTS

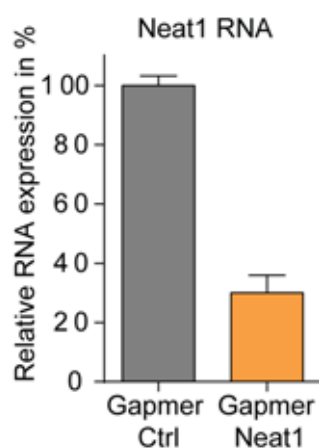
Our thanks go to J.J. Maoret and F. Martins from the Inserm UMR1048 GeT-TQ plateau of the GeT platform Genotoul (Toulouse), and A. Lucas from the We-Met Functional Biochemistry Facility (Toulouse). We also thank W. Claycomb for providing HL-1 cells.

SUPPLEMENTARY DATA



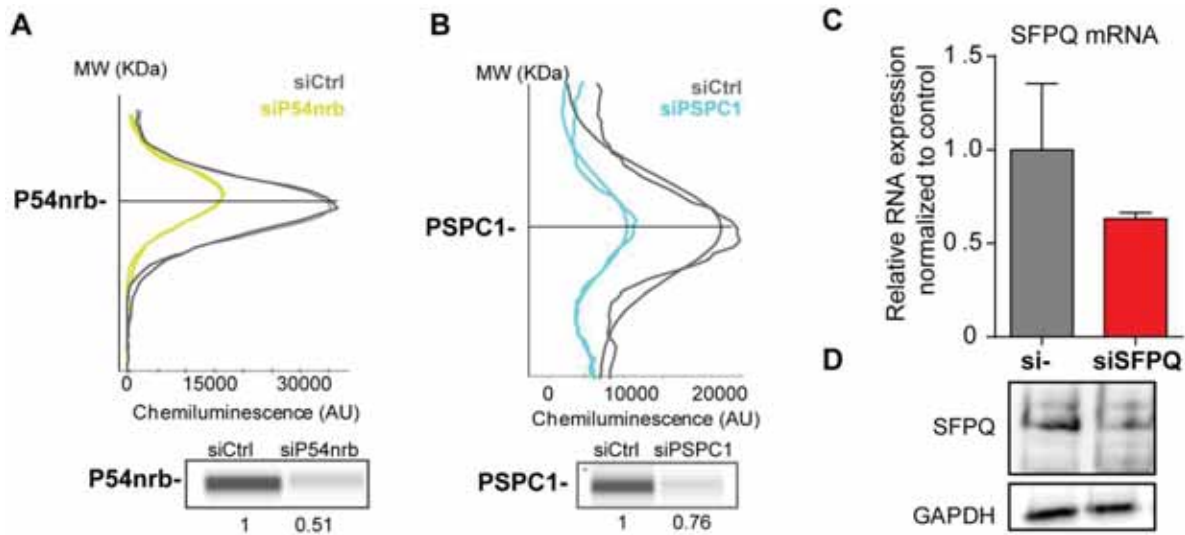
Supplementary data 1.

(A-B) FISH experiment with representative images of Neat1 (both isoforms) (A) or Neat1_2 isoform (B) in normoxia and hypoxia at 4 h, 8 h, 24 h in HL-1 cardiomyocytes. DAPI, Neat1 cy3 or Neat1_2 cy3 labelling and merge. The open square represents magnified zone of figure 1E and H. Scale bar: 10 μ m.



Supplementary data 2.

Neat1 knockdown was performed in HL-1 cells using pooled LNA gapmers. Neat1 RNA expression was measured by droplet digital PCR and normalized to gapmer control (Ctrl) at 100% expression.



Supplementary data 3.

(A-B) Capillary Simple Western detection (as described in figure 2) of p54^{nrb} (A) and P5PC1 (B) proteins following p54^{nrb} and P5PC1 knockdown using siRNAs.

(C-D) SFPQ knockdown was performed in HL-1 cells using siRNA against SFPQ. SFPQ RNA expression was measured by RT-qPCR and normalized to control siRNA (C). One representative experiment is shown with n=2 biological replicates. SFPQ protein expression was visualized by Western Blot (D). Histograms correspond to means $\pm$ standard deviation.



(A-F) Volcano plots of HA-P54^{nrb}-bound proteins identified by mass spectrometry in different conditions. Proteins enriched in nucleus were compared to proteins enriched in cytoplasm in normoxia (A) or in hypoxia (B). Proteins enriched in cytoplasm in normoxia (C) or in hypoxia (D) were compared to control total proteins. Protein enriched in nucleus in normoxia (E) or in hypoxia (F) were compared to control total protein. Volcano plots represent enriched proteins in the different conditions indicated. An unpaired bilateral student t-test with equal variance was performed. Significance threshold are represented by fold change and p-values, the threshold of significant enrichment being set for fold change (FC) > 2 and < 0.5. Significance in p-value is considered when < 0.05.

TABLES

Table 1. List of gapmer LNA used in NEAT1 knockdown assays

Gapmer Name and reference	Sequence
NEAT1 A (LG00218175)	A*C*G*T*C*C*A*T*G*A*A*G*C*A*T*T
NEAT1 B (LG00218176)	A*T*C*A*G*C*C*T*T*T*A*G*A*T*T*T
NEAT1 C (LG00218177)	A*G*A*A*G*A*T*G*C*A*G*C*A*G*T*C
NEAT1 D (LG00218178)	G*G*C*A*A*A*G*C*A*C*T*C*A*T*G*A
NEGATIVE CONTROL A (LG00000002)	A*A*C*A*C*G*T*C*T*A*T*A*C*G*C

Table 2. List of siRNA SMARTpool (Dharmacon) used for IRES activity studies

siRNA SMARTpool name	Target sequences
p54nrb mouse	CUAUUUGACCUGAAGAAUUU UUUUCAUUCAUAAGGAUAA GAAUCAUACUCCAAGGAAG CUAUGGACCAGUUAGAUGA
PSPC1 mouse	GGGUUAAGAUUGUAUAAAC UGUUA AUGUAUGUAGACUA GUGGCAUUAUUAUUAAGUC UCACUAUUCAUUAUUCUG
SFPQ mouse	UGAUGAUUCGCCAACGUGA UGGUGGUGGAACAAUGAAC CCAACGAGAAGAAAGUUAC UCAGGAGGCCAGAAAUUUC
Nucleolin mouse	CCAUGGAGAUCAGAUUAGU CUCUGUUCGUGCAAGAAUA CCAGUGAGUUCAAUUAGUA CUAUCAAGGAUGUUUGGUU
Rps2 mouse	GGAUCAUCUUGUGAAAACC GUCUUGGUGUUAAGUGCUC CCGGUAUAGAUGACUGCUA UUGGGGACUACAAUGGUCA
hnRNPM mouse	CCAGUAUCCUAAAUAUCC GCAAUAUCUAUGUUUAAUG GAUUGAUGUUCGAAUUGAU GCCUUCAUUACAAAUUAC

Table 3. List of FISH probes

FISH probe name	Probe sequence
NEAT1-A	[Cyanine3]GGCTGTGAGCCCACCCAGGGTCCACACTCACGTCCCG
NEAT1-B	[Cyanine3]CCCAAGCTTGATCCATAACTCAGGTTTCACCTTGGAAGGC
NEAT1-C	[Cyanine3]TTTTACAAAGTGTTATCTAGTAAGATGACCCAGGGGCC
NEAT1_2-A	[Cyanine3]GCACCTAAGGCATGGACATGACCTCGGTTAATGCTTTCAC

NEAT1_2-B	[Cyanine3]GGAATAATACAGACTTTCTGACGTTGGATCTGGCAATG

Table 4. List of qPCR primers and cloning primers

Primer name	Sequence
qPCR/ddPCR primers	
FGF1 F	TGGACACCGAAGGGCTTTTA
FGF1 R	GCATGCTTCTTGGAGGTGTAA
NEAT1_2 F	CGGCGGTAACTGTCTTCTGT
NEAT1_2 R	GGACGAGGGGCATAGCATAC
NEAT1 F	CGACTGCTGCATCTTCTAAACA
NEAT1 R	TTTACAACCCAACAGCTTTCCC
PSF/SFPQ F	TGAAAAGCTGGCCCAGAAGAA
PSF/SFPQ R	TGTGCCATGCTGAGCAAAAC
Rps2 F	GGTTCAAGGCTTTCGTCGC
Rps2 R	ATGGAACAGTGTGGGGCTTG
Nucleolin F	TTGGTGGAGCCGAAGTCAC
Nucleolin R	GGTTTTGCCAGCCTTTGCGA
hnRNPM F	GATGCCAACGATCTGAGCAAA
hnRNPM R	CCAAATCCTATGCCTTCCATTCC
Cloning primers	
HA-p54nrb F	GTCGACATGagcTACCCATACGATGTTcCTGACTATGCG GGCggcgccTATCCCTATGACGTCCCGGATTACGCAGGAA TGCAGAGTAATAAACTTTTAACTTGGAGAAGC
HA-p54nrb R	GGATCCACTAGTTTAGTATCGGCGAC

Table 5. FGF1 IRES kinetic in hypoxia

FGF1		Ratio LucF/LucR						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
4h	Normoxia	1	604 174	507 891	700 457	604 174	96283	77 310	91 175	63 445	77 310	13865	
		2	452 118	345 763	472 356	423 412	68003,3704	52 728	58 279	56 285	55 764	2811,935454	
		3	495 500	529 252	547 526	524 093	26393,94266	59 485	53 665	53 223	55 458	3494,767708	
		4	6957128	8160444	8944535	8 020 702	1001045,676	1154339	1436444	1532732	1 374 505	196653,6178	
	Hypoxia	1	996 143	899 215	1 093 070	996 143	96927,5	248 088	192 876	303 300	248 088	55212	
		2	714 978	915 991	757 182	796 050	105993,4764	138 626	171 997	152 394	154 339	16770,30647	
		3	754 720	974 680	917 680	882 360	114154,4007	110 552	157 006	149 316	138 958	24898,98898	
		4	10450445	10725351	12210832	11 128 876	947029,5226	1891657	1744526	2255783	1 963 989	263191,627	
8h	Normoxia	1	12 580	13 628	11 532	12 580	1048	3 721	5 041	2 401	3 721	1320	
		2	700 579	710 733	712 400	707 904	6398,159188	72 622	72 505	73 578	72 902	588,6359939	
		3	912 286	860 603	855 579	876 156	31390,17074	121 992	112 068	132 044	122 035	9988,068348	
		4	8896288	8402478	7130206	8 142 991	911186,9538	1772344	1668645	1416015	1 619 001	183278,3656	
	Hypoxia	1	35 746	46 304	25 188	35 746	10558	10 760	12 896	8 624	10 760	2136	
		2	631 364	634 140	633 140	632 881	1405,960644	70 529	72 640	33 059	58 743	22267,73743	
		3	826 664	827 015	822 262	825 314	2648,641602	118 486	109 078	112 198	113 254	4792,073455	
		4	10592865	10001462	10350135	10 314 821	297278,8316	2143188	2354330	2311918	2 269 812	111691,1924	
24h	Normoxia	1	1 010 280	1 134 589	885 971	1 010 280	124309	231 071	198 199	263 943	231 071	32872	
		2	1 021 135	1 036 550	1 020 270	1025985	9159,77483	208 454	220 996	210 670	213 373	6693,761972	
		3	956 252	896 252	789 825	880 776	84285,87531	226 971	199 587	262 787	229 782	31693,60953	
		4	8896288	8402478	7130206	8 142 991	911186,9538	1772344	1668645	1416015	1 619 001	183278,3656	
	Hypoxia	1	662 414	716 741	608 087	662 414	54327	138 279	153 534	123 025	138 279	15254,5	
		2	519 324	514 720	769 988	601 344	146068,1288	100 770	113 450	99 785	104 668	7621,076586	
		3	455 239	386 245	351 256	397 580	52910,09111	105 268	70 597	90 603	88 823	17403,92916	
		4	14326454	13708075	16512683	14 849 071	1473534,066	1733141	1936317	2026315	1 898 591	150183,8436	

FGF1		Ratio LucF/LucR							Exp num								Significance
		A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean		SD	Mann-Whitney p-value						
4h	Normoxia	1	0.128	0.1795	0.0906	0.1327	0.04463597	1	1	0.24690202	0.0017	**					
		2	0.1166	0.1686	0.1192	0.1348	0.02930051	1									
		3	0.1201	0.1014	0.0972	0.10623333	0.01219112	1									
		4	0.1659	0.176	0.1714	0.1711	0.00505668	1									
	Hypoxia	1	0.249	0.2145	0.2775	0.247	0.03154758	1.86134137	1.42104619	0.28052951							
		2	0.1939	0.1878	0.2013	0.19433333	0.00676042	1.44164194									
		3	0.1465	0.1611	0.1627	0.15676667	0.00892711	1.47568246									
		4	0.181	0.1627	0.1847	0.17613333	0.01177978	1.02941749									
8h	Normoxia	1	0.2958	0.3699	0.2082	0.2913	0.08094387	1	1	0.44874634	0.6192	ns					
		2	0.1037	0.102	0.1033	0.103	0.00088882	1									
		3	0.1337	0.1302	0.1543	0.1394	0.0130219	1									
		4	0.1992	0.1986	0.1986	0.1988	0.00034641	1									
	Hypoxia	1	0.301	0.2785	0.3424	0.3073	0.0324125	1.05492619	1.03440273	0.48267877							
		2	0.1117	0.1145	0.0522	0.0928	0.03518849	0.90097087									
		3	0.1433	0.1319	0.1365	0.13723333	0.00573527	0.9844572									
		4	0.2023	0.2354	0.2234	0.22036667	0.01675719	1.10848424									
24h	Normoxia	1	0.2287	0.1747	0.2979	0.23376667	0.06175608	1	1	0.20029197	0.1239	ns					
		2	0.2041	0.2132	0.2065	0.20793333	0.00471628	1									
		3	0.2374	0.2227	0.3327	0.26426667	0.05971904	1									
		4	0.1992	0.1986	0.1986	0.1988	0.00034641	1									
	Hypoxia	1	0.2088	0.2142	0.2023	0.20843333	0.00595847	0.89162983	0.82017463	0.20416592							
		2	0.194	0.2204	0.1296	0.18133333	0.04670646	0.87207438									
		3	0.2312	0.1828	0.2579	0.22396667	0.03806893	0.84750252									
		4	0.121	0.1413	0.1227	0.12833333	0.01126159	0.64553991									

Table 6. SFPQ knockdown

FGF1		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	siCtrl	1	2673188	3784317	3075954	3177819	459300	455288	826990	612860	631712	152331	
		2	4321498	6005077	5319145	5215240	691234	908764	1480053	1477175	1288664	268633	
		3	1955203	1917089	2081085	1984459	70074	338768	304406	369720	337631	26676	
	siSFPQ	1	4277464	4832185	4054960	4388203	326820	1062037	1257385	1057070	1125497	93281	
		2	4686601	6609368	6721005	6005658	933827	1029120	1623127	1821880	1491375	336785	
		3	2985174	2493406	2992549	2823709	233579	468485	388556	538616	465219	61305	
Hypoxia	siCtrl	1	4241597	3454129	3728290	3808005	326387	761014	716463	654339	710605	43747	
		2	6004439	5725646	6186192	5972092	189403	1768671	1788136	1744898	1767235	17681	
		3	2151385	2008858	1959317	2039853	81417	322854	298111	329513	316826	13510	
	siSFPQ	1	4901651	4468562	5339205	4903139	355440	1219052	1149188	1346529	1238256	81701	
		2	7044581	6792348	6677279	6838069	153396	2304701	1968534	2252785	2175340	147762	
		3	3350779	3020378	2829277	3066811	215419	481217	394264	435170	436883	35519	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
Normoxia	siCtrl	1	0.170	0.219	0.199	0.194	0.020	1.000	1.000	0.193	0.3993	ns
		2	0.210	0.246	0.278	0.245	0.034	1.000	1.000			
		3	0.173	0.159	0.178	0.170	0.010	1.000				
	siSFPQ	1	0.248	0.260	0.261	0.256	0.006	1.319	1.091	0.226	0.7137	ns
		2	0.220	0.246	0.271	0.245	0.026	1.002				
		3	0.157	0.156	0.180	0.164	0.014	0.967				
Hypoxia	siCtrl	1	0.179	0.207	0.176	0.193	0.020	1.000	1.000	0.306	0.7137	ns
		2	0.295	0.312	0.282	0.296	0.015	1.000				
		3	0.150	0.148	0.168	0.156	0.011	1.000				
	siSFPQ	1	0.249	0.257	0.252	0.253	0.003	1.306	1.116	0.366		
		2	0.327	0.290	0.337	0.318	0.025	1.074				
		3	0.144	0.131	0.154	0.143	0.012	0.917				

Table 7. P54nrb knockdown

FGF1		Exp num	Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD		
normoxia	siCtrl	1	15614583	13834477	14212422	14553828	937877	4112521	3337660	3785300	3745160	388987		
		2	6211969	5719040	5980393	5970467	246615	1921913	1714365	1979669	1871982	139522		
		3	1590009	1381692	1381001	1450901	120472	251834	194834	238849	228506	29875		
		4	79768	104037	89183	90996	9990	10219	19335	13189	14248	3796		
	siP54nrb	1	22178973	20147753	24411755	22246160	2132795	3686041	3111936	4004601	3600859	452388		
		2	2829392	2480111	3381753	2897086	454617	477464	426225	582440	495376	79633		
		3	1431898	2111776	1687224	1743633	343431	188751	304274	257561	250196	58112		
		4	102804	151024	134259	129362	24480	8357	20008	15857	14741	5905		
Hypoxia	siCtrl	1	12867685	12005389	13333771	12735615	673967	4412100	4267292	4713037	4464143	227384		
		2	6348250	5853231	5412593	5871358	468092	2064972	1756583	1711633	1844396	192342		
		3	1121156	1093631	1022224	1079004	51062	287035	264567	162669	238090	66276		
		4	138993	155606	162284	152294	9792	14170	24385	20632	19729	4219		
	siP54nrb	1	20105090	25274081	24284875	23221349	2743708	3842071	5123829	5006211	4657370	708515		
		2	6618266	5251099	5113389	5660918	831942	1054684	761848	686201	834244	194617		
		3	1197812	1245065	1131357	1191411	57123	198596	323032	239965	253864	63372		
		4	227563	130725	169940	176076	39772	24628	15987	22092	20902	3626		

FGF1		Exp num	Ratio LucF/LucR									
			A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	Significance
normoxia	siCtrl	1	0.263	0.241	0.266	0.257	0.014	1.000	1.000	0.330	0.0138	*
		2	0.309	0.300	0.331	0.313	0.016	1.000				
		3	0.158	0.141	0.173	0.157	0.016	1.000				
		4	0.128	0.186	0.148	0.154	0.027	1.000				
	siP54nrb	1	0.166	0.154	0.164	0.162	0.006	0.629	0.665	0.123		
		2	0.169	0.172	0.172	0.171	0.002	0.545				
		3	0.132	0.144	0.153	0.143	0.010	0.907				
		4	0.081	0.132	0.118	0.111	0.010	0.719				
Hypoxia	siCtrl	1	0.343	0.355	0.353	0.351	0.007	1.000	1.000	0.371	0.0466	*
		2	0.325	0.300	0.316	0.314	0.013	1.000				
		3	0.256	0.242	0.159	0.219	0.052	1.000				
		4	0.102	0.157	0.127	0.129	0.021	1.000				
	siP54nrb	1	0.191	0.203	0.206	0.200	0.008	0.570	0.671	0.178		
		2	0.159	0.145	0.134	0.146	0.013	0.466				
		3	0.166	0.259	0.212	0.212	0.047	0.970				
		4	0.108	0.122	0.130	0.120	0.005	0.934				

FGF2		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	338160	297348	356513	330674	24727	40284	42583	47910	43592	3194	
		2	190962	193130	172918	185670	11097	37869	28018	26650	30845	6120	
		3	192661	139882	163766	165437	26429	49933	47191	45737	47620	2131	
	siP54nrb	1	428321	376736	381434	395497	28523	22548	41972	25361	29960	10497	
		2	350806	326400	298994	325400	25920	46979	41071	44185	44078	2955	
		3	204274	159073	175330	179559	22896	51209	33872	48282	44454	9281	
Hypoxia	siCtrl	1	647702	452787	497364	532618	83387	61659	61503	65386	62849	1795	
		2	126638	99956	87564	104719	19968	18408	11584	13110	14367	3581	
		3	105830	128727	123293	119283	11964	28238	45322	36300	36620	8546	
	siP54nrb	1	461605	534207	496440	497417	29648	38628	53472	50079	47393	6350	
		2	177421	155411	147051	159961	15688	17991	16396	15643	16677	1199	
		3	189859	106099	172669	156209	44239	39168	29026	44814	37669	8000	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.119	0.143	0.134	0.132	0.012	1.000			0.1983	ns
		2	0.198	0.145	0.154	0.166	0.028	1.000	1.000	0.393		
		3	0.259	0.337	0.279	0.292	0.041	1.000				
	siP54nrb	1	0.053	0.111	0.066	0.077	0.031	0.581			0.778	0.396
		2	0.134	0.126	0.148	0.136	0.011	0.819	0.778	0.396		
		3	0.251	0.213	0.275	0.246	0.031	0.844				
hypoxia	siCtrl	1	0.095	0.136	0.131	0.121	0.022	1.000			1.000	0.490
		2	0.145	0.116	0.150	0.137	0.018	1.000	1.000	0.490		
		3	0.267	0.352	0.294	0.304	0.043	1.000				
	siP54nrb	1	0.084	0.100	0.101	0.095	0.010	0.785			0.793	0.404
		2	0.101	0.105	0.106	0.104	0.003	0.762	0.793	0.404		
		3	0.206	0.274	0.260	0.246	0.035	0.810				

VEGFAa		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	478052	536681	460040	491591	40074	6091	8319	6881	7097	1130	
		2	686015	662255	669803	672691	9913	3870	4191	5255	4439	592	
		3	234523	254948	311971	267147	40139	2790	3237	4956	3661	1143	
	siP54nrb	1	151211	192635	218217	187355	33814	1630	1993	1954	1859	199	
		2	806710	705533	883525	798589	89273	1701	3698	3235	2878	1045	
		3	364632	394869	414659	391387	25194	4480	5186	5791	5152	656	
Hypoxia	siCtrl	1	603187	551004	622577	592256	37017	8658	8380	8676	8571	166	
		2	1393047	1550540	1357285	1433624	83951	11436	15150	15655	14080	1881	
		3	241300	357533	405013	334615	84228	7744	9020	9048	8604	745	
	siP54nrb	1	289694	172233	213909	225279	59550	1883	1497	1775	1718	199	
		2	759932	1804316	2188354	1584201	603565	4715	21908	24607	23258	1350	
		3	364632	394869	414659	391387	25194	4480	5186	5791	5152	656	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.013	0.016	0.015	0.014	0.001	1.000			0.1394	ns
		2	0.006	0.006	0.008	0.007	0.001	1.000	1.000	0.343		
		3	0.012	0.013	0.016	0.013	0.002	1.000				
	siP54nrb	1	0.011	0.010	0.009	0.010	0.001	0.696			0.778	0.374
		2	0.002	0.005	0.004	0.004	0.002	0.556	0.778	0.374		
		3	0.012	0.013	0.014	0.013	0.001	0.973				
hypoxia	siCtrl	1	0.014	0.015	0.014	0.014	0.001	1.000			1.000	0.467
		2	0.008	0.010	0.012	0.010	0.002	1.000	1.000	0.467		
		3	0.032	0.025	0.022	0.027	0.005	1.000				
	siP54nrb	1	0.006	0.009	0.008	0.008	0.001	0.540			0.606	0.171
		2	0.006	0.012	0.011	0.010	0.003	1.003	0.606	0.171		
		3	0.012	0.013	0.014	0.013	0.001	0.494				

VEGFab		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	2212227	2025224	2444311	2227254	171421	257293	244474	310896	270888	28770	
		2	1683303	2038361	1994936	1905533	193678	197466	248062	267940	237823	36336	
		3	353069	379878	485489	406145	70009	45733	42142	54059	47311	6113	
	siP54nrb	1	2207682	2357474	2524435	2363197	158454	204259	208483	241137	217960	20183	
		2	2664413	2662585	2817225	2714741	1293	315825	385479	389540	363614	49253	
		3	480449	481870	421856	461392	34246	46543	57011	44830	49461	6594	
Hypoxia	siCtrl	1	3468976	4647906	6219613	5433760	1173373	309378	604844	915426	760135	219614	
		2	1184270	1246274	1144477	1191674	51300	105816	111858	124528	114067	9550	
		3	350981	476613	454337	427310	67035	90388	93717	79327	87811	7533	
	siP54nrb	1	1663099	4715961	5314781	5015371	299410	241012	644542	785788	715165	70623	
		2	1942998	1487664	4176614	1715331	321970	178076	130815	539089	154446	33418	
		3	386024	404162	360362	383516	22007	54030	60713	64724	59822	5402	

		Ratio LucF/LucR										Significance	
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value		
normoxia	siCtrl	1	0.116	0.121	0.127	0.121	0.005	1.000	1.000	0.067	0.2136	ns	
		2	0.117	0.122	0.134	0.124	0.009	1.000	1.000	0.067			
		3	0.130	0.111	0.111	0.117	0.011	1.000	1.000	0.067			
	siP54nrb	1	0.093	0.088	0.096	0.092	0.004	0.759	0.918	0.168	0.9797	ns	
		2	0.119	0.145	0.138	0.134	0.019	1.076	0.918	0.168			
		3	0.097	0.118	0.106	0.107	0.011	0.914	0.918	0.168			
	siCtrl	1	0.089	0.130	0.147	0.139	0.030	1.000	1.000	0.407	0.9797	ns	
		2	0.089	0.090	0.109	0.096	0.011	1.000	1.000	0.407			
		3	0.258	0.197	0.175	0.210	0.043	1.000	1.000	0.407			
hypoxia	siCtrl	1	0.145	0.137	0.148	0.142	0.008	1.026	0.941	0.202	0.9797	ns	
		2	0.092	0.088	0.129	0.090	0.003	0.936	0.941	0.202			
		3	0.140	0.150	0.180	0.157	0.021	0.747	0.941	0.202			
	siP54nrb	1	0.145	0.137	0.148	0.142	0.008	1.026	0.941	0.202	0.9797	ns	
		2	0.092	0.088	0.129	0.090	0.003	0.936	0.941	0.202			
		3	0.140	0.150	0.180	0.157	0.021	0.747	0.941	0.202			
	Hypoxia	1	0.145	0.137	0.148	0.142	0.008	1.026	0.941	0.202	0.9797	ns	
		2	0.092	0.088	0.129	0.090	0.003	0.936	0.941	0.202			
		3	0.140	0.150	0.180	0.157	0.021	0.747	0.941	0.202			

VEGFC		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	1652281	1747731	1495968	1631994	103778	73436	99773	102461	91890	13095	
		2	1750605	1126430	1746470	1541168	441358	165177	104638	156405	142073	42808	
		3	448409	423742	553919	475357	69146	38149	39741	55704	44531	9709	
	siP54nrb	1	2650823	1576011	1731777	1986204	580823	94097	69410	57191	73566	18801	
		2	2245024	2448145	2157646	2283605	149043	145454	171896	155238	157529	13369	
		3	258334	310510	290358	286401	26312	20846	18792	20565	20068	1113	
Hypoxia	siCtrl	1	3052125	3781966	3407369	3413820	297991	103804	161246	146015	137022	24297	
		2	2172556	2224870	2838755	2198713	36992	132193	132703	163425	132448	361	
		3	548838	425660	473070	482523	62131	48174	42953	55521	48883	6314	
	siP54nrb	1	3260370	3638044	3628119	3508844	175744	108546	150891	163872	141103	23623	
		2	3765712	3336395	4380633	3827580	524861	186120	185420	226711	199417	23640	
		3	538893	609759	580373	576342	35604	39084	46202	42424	42570	3561	

		Ratio LucF/lucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.044	0.057	0.068	0.057	0.012	1.000	1.000	0.241	0.0333	*
		2	0.094	0.093	0.090	0.092	0.001	1.000	1.000	0.241		
		3	0.085	0.094	0.101	0.093	0.008	1.000	1.000	0.241		
	siP54nrb	1	0.035	0.044	0.033	0.038	0.006	0.662	0.732	0.214	0.423	ns
		2	0.065	0.070	0.072	0.069	0.004	0.748	0.732	0.214		
		3	0.081	0.061	0.071	0.071	0.010	0.759	0.732	0.214		
hypoxia	siCtrl	1	0.034	0.043	0.043	0.040	0.005	1.000	1.000	0.427	0.423	ns
		2	0.061	0.060	0.058	0.059	0.001	1.000	1.000	0.427		
		3	0.088	0.101	0.117	0.102	0.015	1.000	1.000	0.427		
	siP54nrb	1	0.033	0.041	0.045	0.040	0.006	1.004	0.825	0.227	0.423	ns
		2	0.049	0.056	0.052	0.052	0.003	0.880	0.825	0.227		
		3	0.073	0.076	0.073	0.074	0.002	0.723	0.825	0.227		

VEGFD		Renilla luciferase							Firefly luciferase				
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	365990	427317	365164	386157	29106	20158	31306	30864	27443	5154	
		2	275585	220937	243324	246615	27472	20951	24166	16467	20528	3867	
		3	217847	327906	285000	276918	55473	13957	27377	23716	21683	6937	
	sip54nrb	1	493065	461440	496916	483807	19466	31715	25746	32021	29828	3538	
		2	567823	549217	372141	496394	108008	33285	37862	23280	31476	7457	
		3	592115	670999	704955	656023	57892	44366	59232	60346	54648	8922	
Hypoxia	siCtrl	1	440436	602979	487986	510467	68236	48804	59199	48550	52184	4961	
		2	430900	671630	616169	572899	126063	36827	54089	43938	44951	8675	
		3	249034	353678	287905	296872	52895	29619	31439	27641	29566	1899	
	sip54nrb	1	758794	743577	1011622	837998	122928	60275	76085	101933	79431	17171	
		2	830670	773593	571751	725338	136037	56451	58640	37000	50697	11912	
		3	390927	304315	223146	306129	83905	26926	26335	18850	24037	4502	

		Ratio LucF/LucR										Significance		
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation					Mean	SD
normoxia	siCtrl	1	0.055	0.073	0.085	0.071	0.015	1.000				0.3272	ns	
		2	0.076	0.109	0.068	0.084	0.022	1.000	1.000	0.201				
		3	0.064	0.083	0.083	0.077	0.011	1.000						
	siP54nrb	1	0.064	0.056	0.064	0.062	0.005	0.867						
		2	0.059	0.069	0.063	0.063	0.005	0.751	0.895	0.148				
		3	0.075	0.088	0.086	0.083	0.007	1.078						
hypoxia	siCtrl	1	0.111	0.098	0.099	0.103	0.007	1.000				0.0934	ns	
		2	0.085	0.081	0.071	0.079	0.007	1.000	1.000	0.157				
		3	0.119	0.089	0.096	0.101	0.016	1.000						
	siP54nrb	1	0.079	0.102	0.101	0.094	0.013	0.916						
		2	0.068	0.076	0.065	0.069	0.006	0.878	0.860	0.145				
		3	0.069	0.087	0.084	0.080	0.010	0.790						

IGF1R		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	568295	624464	574870	589210	25073	88840	130924	115377	111714	17375	
		2	255284	263849	293168	270767	19867	103285	90152	119297	104245	14596	
		3	254097	202990	248049	235045	27925	76689	80603	85770	81021	4555	
	siP54nrb	1	763746	750413	563812	757079	111782	76734	105925	19969	91329	20641	
		2	319438	405317	373312	366022	43401	96134	121000	114481	110538	12893	
		3	252281	328205	261075	280521	41530	104078	132182	105496	113919	15832	
Hypoxia	siCtrl	1	1674693	1508464	1456958	1546705	92912	193429	238652	242544	224875	22292	
		2	210319	236396	346932	264549	72527	98731	90687	136145	108521	24259	
		3	294943	209447	245953	250114	42899	156272	138708	126516	140499	14959	
	siP54nrb	1	1821099	1509328	1813745	1714724	145268	199152	219058	287110	235107	37659	
		2	302340	322463	359354	328052	28915	131203	131468	133843	132171	1454	
		3	340401	361295	421935	374544	42351	188827	171762	198048	186212	13336	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.156	0.210	0.201	0.189	0.029	1.000	1.000	0.313	0.5346	ns
		2	0.405	0.342	0.407	0.384	0.037	1.000	1.000			
		3	0.302	0.397	0.346	0.348	0.048	1.000				
	siP54nrb	1	0.100	0.141	0.035	0.121	0.029	0.640				
		2	0.301	0.299	0.307	0.302	0.004	0.786	0.869	0.459		
		3	0.413	0.403	0.404	0.406	0.005	1.167				
hypoxia	siCtrl	1	0.116	0.158	0.166	0.147	0.027	1.000	1.000	0.508	0.6502	ns
		2	0.469	0.384	0.392	0.415	0.047	1.000	1.000			
		3	0.530	0.662	0.514	0.569	0.081	1.000				
	siP54nrb	1	0.109	0.145	0.158	0.138	0.025	0.938				
		2	0.434	0.408	0.372	0.405	0.031	0.975	0.922	0.439		
		3	0.555	0.475	0.469	0.500	0.048	0.879				

EMCV		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	6365162	8322840	7640560	7442854	993701	6103347	9113681	8490981	7902670	1589060	
		2	3307064	2859152	2994865	3053694	229678	4239469	4033743	4582152	4285121	277040	
		3	2337917	3146033	2611255	2698402	335617	1603385	2929991	2033089	2188822	552666	
	siP54nrb	1	7970781	10596055	7928241	8831692	1528131	11475614	14992302	9480997	11982971	2790462	
		2	1258884	1484865	1279441	1341063	124959	1393602	2201468	2095182	1896751	438968	
		3	2108239	1965979	1451461	1841893	345525	1398909	965448	698436	1020931	353517	
Hypoxia	siCtrl	1	7931570	7957225	6740129	7542975	695403	12387597	12394766	9494868	11425744	1672191	
		2	3204089	2728506	2221130	2717908	491566	5358325	4472124	3540859	4457103	908826	
		3	4682318	7943966	6605200	6410495	1338661	6266686	7709654	6349910	6775417	661478	
	siP54nrb	1	9797962	9225136	9956752	9659950	384839	17275460	16007194	16719339	16667331	635730	
		2	2133610	2023162	2087983	2081585	55501	2636753	2775357	2968316	2793475	166523	
		3	4646883	9684636	7328583	7220034	2058086	5094831	8216051	7029763	6780215	1286393	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.959	1.095	1.111	1.055	0.084	1.000	1.000	0.259	0.7775	ns
		2	1.282	1.411	1.530	1.408	0.124	1.000	1.000	0.259		
		3	0.686	0.931	0.779	0.799	0.124	1.000	1.000	0.259		
	siP54nrb	1	1.440	1.415	1.196	1.350	0.134	1.280	1.013	0.412		
		2	1.107	1.483	1.638	1.409	0.273	1.001	1.013	0.412		
		3	0.664	0.491	0.481	0.545	0.103	0.683	1.013	0.412		
hypoxia	siCtrl	1	1.562	1.558	1.409	1.509	0.087	1.000	1.000	0.194	0.8427	ns
		2	1.672	1.639	1.594	1.635	0.039	1.000	1.000	0.194		
		3	1.338	0.971	0.961	1.090	0.215	1.000	1.000	0.194		
	siP54nrb	1	1.763	1.735	1.679	1.726	0.043	1.143	0.953	0.240		
		2	1.236	1.372	1.422	1.343	0.096	0.821	0.953	0.240		
		3	1.096	0.848	0.959	0.968	0.124	0.888	0.953	0.240		

cmcy		Renilla luciferase							Firefly luciferase						
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD			
normoxia	siCtrl	1	2337917	2493989	2024414	2285440	195261	240239	402619	259913	300923	72357			
		2	936981	912821	923416	924406	12111	353453	426897	451667	410672	51078			
		3	996324	852009	1203390	1017241	176622	202668	208450	280358	230492	43282			
	siP54nrb	1	2233970	2621631	1839095	2231565	391274	73105	120223	122124	105151	27769			
		2	1221473	1402859	1186112	1270148	116283	364957	379515	379515	374662	8405			
		3	1449138	1489153	1240142	1392811	133721	303849	264306	264306	277487	22830			
Hypoxia	siCtrl	1	4682318	4074549	3763596	4173488	381536	522595	516285	499798	512893	9611			
		2	802990	789755	806209	799651	8720	392506	481930	399124	424520	49828			
		3	1079348	1019947	1437006	1178767	225605	243035	311946	408904	321295	83329			
	siP54nrb	1	4646883	6584091	5894884	6239487	844550	470519	991993	947313	969653	22340			
		2	774836	734712	594396	701314	94743	334975	410691	410691	385452	43715			
		3	1368840	729774	968602	1022406	322912	386054	283090	283090	317411	59446			

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.103	0.161	0.128	0.131	0.029	1.000			0.3347	ns
		2	0.377	0.468	0.489	0.445	0.059	1.000	1.000	0.536		
		3	0.203	0.245	0.233	0.227	0.021	1.000				
	siP54nrb	1	0.033	0.046	0.066	0.048	0.017	0.369			0.7775	ns
		2	0.299	0.271	0.320	0.296	0.025	0.667	0.679	0.410		
		3	0.210	0.177	0.213	0.200	0.020	0.881				
hypoxia	siCtrl	1	0.112	0.127	0.133	0.124	0.011	1.000			0.7775	ns
		2	0.489	0.610	0.495	0.531	0.068	1.000	1.000	0.593		
		3	0.225	0.306	0.285	0.272	0.042	1.000				
	siP54nrb	1	0.101	0.151	0.161	0.156	0.007	1.258			0.7775	ns
		2	0.432	0.559	0.691	0.561	0.129	1.055	1.099	0.640		
		3	0.282	0.388	0.292	0.321	0.058	1.180				

		Ratio LucF/LucR							Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD						
normoxia	siCtrl	1	0.210	0.246	0.278	0.245	0.034	1.000	1.000	1.000	0.209	0.0432	*
		2	0.173	0.159	0.178	0.170	0.010	1.000					
		3	0.158	0.141	0.173	0.157	0.016	1.000					
		4	0.213	0.234	0.221	0.223	0.011	1.000					
	siPSPC1	1	0.240	0.177	0.189	0.202	0.034	0.825	0.805	0.183			
		2	0.119	0.134	0.120	0.124	0.009	0.731					
		3	0.143	0.137	0.129	0.136	0.007	0.866					
		4	0.186	0.163	0.183	0.177	0.013	0.796					
Hypoxia	siCtrl	1	0.295	0.312	0.282	0.296	0.015	1.000	1.000	1.000	0.262	0.0537	ns
		2	0.150	0.148	0.168	0.156	0.011	1.000					
		3	0.256	0.242	0.159	0.219	0.052	1.000					
		4	0.220	0.206	0.206	0.211	0.008	1.000					
	siPSPC1	1	0.189	0.227	0.208	0.208	0.019	0.702	0.792	0.198			
		2	0.113	0.131	0.126	0.124	0.009	0.795					
		3	0.242	0.198	0.122	0.187	0.061	0.856					
		4	0.204	0.178	0.157	0.179	0.023	0.852					

FGF2		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	629345	620635	639942	629974	9669	125772	127427	104526	119242	12771	
		2	536863	551760	514298	534307	18861	107176	122524	107326	112342	8818	
		3	192661	139882	163766	165437	26429	49933	47191	45737	47620	2131	
	siPSPC1	1	737879	856918	801706	798834	59571	96448	119580	107428	107819	11571	
		2	696996	667848	735212	700019	33783	99149	88683	101143	96325	6693	
		3	198025	148189	184532	176915	25777	41765	38916	42210	40964	1788	
Hypoxia	siCtrl	1	680776	726150	752265	719730	36174	176583	188387	180124	181698	6057	
		2	772499	915914	922373	870262	84727	181399	209640	191629	194223	14298	
		3	105830	128727	123293	119283	11964	28238	45322	36300	36620	8546	
	siPSPC1	1	933123	981337	910931	941797	35995	191281	174390	151232	172301	20106	
		2	998304	1047005	972539	1005949	37817	152691	157337	160958	156996	4144	
		3	154734	154943	132869	147515	12685	36101	27403	28769	30758	4678	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.200	0.205	0.163	0.189	0.023	1.000			0.0474	*
		2	0.200	0.222	0.209	0.210	0.011	1.000	1.000	0.229		
		3	0.259	0.337	0.279	0.292	0.041	1.000				
	siPSPC1	1	0.131	0.140	0.134	0.135	0.004	0.711			0.0003	****
		2	0.142	0.133	0.138	0.138	0.005	0.655	0.732	0.220		
		3	0.211	0.263	0.229	0.234	0.026	0.802				
Hypoxia	siCtrl	1	0.259	0.259	0.239	0.253	0.012	1.000			0.0003	****
		2	0.235	0.229	0.208	0.224	0.014	1.000	1.000	0.163		
		3	0.267	0.352	0.294	0.304	0.043	1.000				
	siPSPC1	1	0.205	0.178	0.166	0.183	0.020	0.724			0.0003	****
		2	0.153	0.150	0.166	0.156	0.008	0.698	0.702	0.112		
		3	0.233	0.177	0.217	0.209	0.029	0.686				

VEGFAa		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	1004059	961239	1082186	1015828	61326	9676	9919	10680	10091	524	
		2	858315	1006460	1131780	998852	136891	10177	10903	9795	10292	563	
		3	234523	254948	311971	267147	40139	2790	3237	4956	3661	1143	
	siPSPC1	1	1074839	1201565	1237390	1171265	85406	11143	10556	10470	10723	366	
		2	1388730	1330000	1266025	1328252	61371	1289172	2652301	1266025	1735833	793769	
		3	362066	475749	428052	421956	57086	3371	4835	4230	4145	736	
Hypoxia	siCtrl	1	1733484	1540310	1514623	1596139	119636	21593	19968	21705	21089	972	
		2	1201671	1239986	1269291	1236983	33910	21334	25229	24602	23722	2091	
		3	241300	357533	405013	334615	84228	7744	9020	9048	8604	745	
	siPSPC1	1	1554638	1354818	866881	1258779	353794	17426	16509	15533	16489	947	
		2	1354727	1241900	1583299	1393308	173939	1356270	2145236	1583299	1694935	406157	
		3	388321	411510	398435	399422	11626	6566	6841	7877	7095	691	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	1.000			0.0063	**
		2	0.012	0.011	0.009	0.010	0.002	1.000	1.000	0.190		
		3	0.012	0.013	0.016	0.013	0.002	1.000				
	siPSPC1	1	0.010	0.009	0.008	0.009	0.001	0.926				
		2	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000	0.840	0.820	0.064		
		3	0.009	0.010	0.010	0.010	0.000	0.725				
Hypoxia	siCtrl	1	0.012	0.013	0.014	0.013	0.001	1.000			0.0884	ns
		2	0.018	0.020	0.019	0.019	0.001	1.000	1.000	0.323		
		3	0.032	0.025	0.022	0.027	0.005	1.000				
	siPSPC1	1	0.011	0.012	0.018	0.014	0.004	1.039				
		2	0.014	0.013	0.013	0.013	0.001	0.702	0.763	0.148		
		3	0.017	0.017	0.020	0.018	0.002	0.669				

VEGFab		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	3953413	4461082	4955118	4456538	500868	636888	673362	711456	673902	37287	
		2	3617674	4224329	4116125	3986042	323572	597951	643573	666618	636047	34946	
		3	353069	379878	485489	406145	70009	45733	42142	54059	47311	6113	
	siPSPC1	1	4899771	5347093	5652256	5299707	378474	761340	852226	883493	832353	63455	
		2	4923495	5294098	5487600	5235064	286648	680323	735719	713411	709817	27872	
		3	523779	465105	462089	483658	34779	49257	48436	44309	47334	2652	
Hypoxia	siCtrl	1	5227968	5137726	5358864	5241519	111190	1455967	1495875	1461388	1471077	21646	
		2	5214317	6525712	4929908	5556646	851199	748890	981243	649085	793073	170430	
		3	350981	476613	454337	427310	67035	90388	93717	79327	87811	7533	
	siPSPC1	1	5942477	6418246	6420607	6260443	275370	1481303	1800613	1778707	1686874	178367	
		2	6960135	6471371	5894089	6441865	533635	954043	1033952	1003397	997131	40322	
		3	440546	506296	499188	482010	36084	63614	90548	73343	75835	13639	

			Ratio LucF/LucR										Significance
			Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.161	0.151	0.144	0.152	0.009		1.000			0.2307	ns
		2	0.165	0.152	0.162	0.160	0.007		1.000	1.000	0.147		
		3	0.130	0.111	0.111	0.117	0.011		1.000				
	siPSPC1	1	0.155	0.159	0.156	0.157	0.002		1.034				
		2	0.138	0.139	0.130	0.136	0.005		0.849	0.911	0.183		
		3	0.094	0.104	0.096	0.098	0.005		0.836				
Hypoxia	siCtrl	1	0.278	0.291	0.273	0.281	0.009		1.000			0.6219	ns
		2	0.144	0.150	0.132	0.142	0.009		1.000	1.000	0.305		
		3	0.258	0.197	0.175	0.210	0.043		1.000				
	siPSPC1	1	0.249	0.281	0.277	0.269	0.017		0.958				
		2	0.137	0.160	0.170	0.156	0.017		1.097	0.920	0.277		
		3	0.144	0.179	0.147	0.157	0.019		0.748				

VEGFC		Exp num	Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			A	B	C	Mean	SD		A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	1940200	1317594	1986534	1748109	373556		217056	137257	253247	202520	59346	
		2	1363206	1249203	1380695	1331034	71406		145917	137316	162033	148422	12547	
		3	448409	423742	553919	475357	69146		38149	39741	55704	44531	9709	
	siPSPC1	1	2261492	2607191	2547477	2472053	184779		177855	262603	260378	233612	48300	
		2	1196580	1600569	1525023	1440724	214783		46171	85950	112355	81492	33316	
		3	552621	653237	669654	625170	63364		38782	47634	49944	45453	5891	
Hypoxia	siCtrl	1	2035704	2389202	2247759	2224222	177921		281808	313489	279125	291474	19113	
		2	2763308	2109765	2969299	2614124	448766		128982	145698	226906	167195	52382	
		3	548838	425660	473070	482523	62131		48174	42953	55521	48883	6314	
	siPSPC1	1	2904891	2858639	3277081	3013537	229404		328023	275547	293970	299180	26623	
		2	2975986	3429955	2396973	2934305	517751		131369	154116	146182	143889	11546	
		3	578088	560997	568108	569064	8586		50885	54865	50354	52035	2465	

		Exp num	Ratio LucF/LucR						Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	Significance
			A	B	C	Mean	SD						
normoxia	siCtrl	1	0.112	0.104	0.127	0.115	0.012	1.000				0.0009	****
		2	0.107	0.110	0.117	0.111	0.005	1.000		1.000	0.118		
		3	0.085	0.094	0.101	0.093	0.008	1.000					
	siPSPC1	1	0.079	0.101	0.102	0.094	0.013	0.820					
		2	0.039	0.054	0.074	0.055	0.018	0.496		0.695	0.188		
		3	0.070	0.073	0.075	0.073	0.002	0.779					
Hypoxia	siCtrl	1	0.138	0.131	0.124	0.131	0.007	1.000				0.1983	ns
		2	0.047	0.069	0.076	0.064	0.015	1.000		1.000	0.316		
		3	0.088	0.101	0.117	0.102	0.015	1.000					
	siPSPC1	1	0.113	0.096	0.090	0.100	0.012	0.759					
		2	0.044	0.045	0.061	0.050	0.010	0.781		0.811	0.247		
		3	0.088	0.098	0.089	0.091	0.005	0.897					

VEGFD		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	291674	287198	316877	298583	16000	19740	20522	20438	20233	429	
		2	567674	597668	541654	568999	28030	47796	48288	42436	46173	3246	
		3	546912	627624	776791	650442	116626	44748	51817	55327	50630	5388	
	siPSPC1	1	352072	348952	328203	343076	12974	21662	18983	21014	20553	1398	
		2	552042	744632	688626	661767	99064	45207	53560	48649	49139	4198	
		3	781192	890044	980155	883797	99628	55585	54126	70395	60035	9001	
Hypoxia	siCtrl	1	375774	397904	423655	399111	23963	40627	41173	42446	41415	934	
		2	525002	615275	500416	546898	60479	86899	103834	88966	93233	9239	
		3	878701	905268	897875	893948	13712	78430	97032	83797	86420	9574	
	siPSPC1	1	428950	204448	344054	325817	113357	35543	28304	39439	34429	5650	
		2	561038	601141	684557	615578	63012	90108	100950	111935	100998	10913	
		3	1131210	1211175	1365269	1235884	118970	76199	94973	100224	90465	12631	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.068	0.071	0.064	0.068	0.003	1.000	1.000	0.095	0.09	ns
		2	0.084	0.081	0.078	0.081	0.003	1.000	1.000	0.095		
		3	0.082	0.083	0.071	0.079	0.006	1.000	0.884	0.108		
	siPSPC1	1	0.062	0.054	0.064	0.060	0.005	0.922	0.891	0.108	0.4283	ns
		2	0.082	0.072	0.071	0.075	0.006	0.865	0.891	0.108		
		3	0.071	0.061	0.072	0.068	0.006	1.000	1.000	0.290		
Hypoxia	siCtrl	1	0.108	0.103	0.100	0.104	0.004	1.000	1.000	0.290	0.4283	ns
		2	0.166	0.169	0.178	0.171	0.006	1.000	1.000	0.290		
		3	0.089	0.107	0.093	0.097	0.009	1.000	1.000	0.340		
	siPSPC1	1	0.083	0.138	0.115	0.112	0.028	1.077	0.940	0.340	0.4283	ns
		2	0.161	0.168	0.164	0.164	0.004	0.961	0.940	0.340		
		3	0.067	0.078	0.073	0.073	0.006	0.756	0.940	0.340		

IGF1R		Exp num	Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD		
normoxia	siCtrl	1	722018	972960	906771	867250	130055	159594	232929	214092	202205	38085		
		2	860625	880028	795415	845356	44325	202188	218830	189480	203499	14719		
		3	255284	263849	293168	270767	19867	103285	90152	119297	104245	14596		
	siPSPC1	1	1060761	1289052	1353833	1234548	153951	155151	213263	201468	189961	30718		
		2	985309	1048775	905864	979983	71604	167280	199053	135802	167379	31625		
		3	427098	484160	423908	445055	33903	121673	123232	117490	120798	2969		
Hypoxia	siCtrl	1	1058689	1125486	1292036	1158737	120175	304929	348329	355248	336169	27275		
		2	1158913	1300106	1178171	1212396	76567	212389	306379	271984	263584	47555		
		3	210319	236396	346932	264549	72527	98731	90687	136145	108521	24259		
	siPSPC1	1	1597529	1714796	1755494	1689273	82017	258925	386756	318222	321301	63971		
		2	1594579	1752745	1758274	1701866	92954	276042	309622	288385	291350	16985		
		3	114079	278087	178890	190352	82603	71140	96693	81616	83150	12845		

		Exp num	Ratio LucF/LucR						Mann-Whitney p-value			Significance
			A	B	C	Mean	SD					
normoxia	siCtrl	1	0.221	0.239	0.236	0.232	0.010					ns
		2	0.235	0.249	0.238	0.241	0.007					
		3	0.405	0.342	0.407	0.384	0.037					
	siPSPC1	1	0.146	0.165	0.149	0.154	0.010					
		2	0.170	0.190	0.150	0.170	0.020					
		3	0.285	0.255	0.277	0.272	0.016					
Hypoxia	siCtrl	1	0.288	0.309	0.275	0.291	0.017					ns
		2	0.183	0.236	0.231	0.217	0.029					
		3	0.469	0.384	0.392	0.415	0.047					
	siPSPC1	1	0.162	0.226	0.181	0.190	0.033					
		2	0.173	0.177	0.164	0.171	0.007					
		3	0.624	0.348	0.456	0.476	0.139					

EMCV		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	147772	179110	161146	162676	15725	107301	144501	143440	131747	21177	
		2	193872	193384	139866	175707	31040	159216	163871	110780	144622	29400	
		3	4196611	4747196	4813952	4585920	338799	3995099	4448880	4971984	4471988	488853	
	siPSPC1	1	154112	256024	273750	227962	64567	128725	193675	239512	187304	55667	
		2	280515	360485	320666	320555	39985	233797	293037	235866	254233	33621	
		3	3779698	5201252	5024431	4668460	774751	3165164	4909784	4212893	4095947	717023	
Hypoxia	siCtrl	1	177395	182885	198846	186375	11143	223538	216316	233362	224405	8556	
		2	289545	319434	335655	314878	23390	319218	329348	326687	325084	5251	
		3	8950028	9989663	7196947	8712213	1411465	7490989	18294662	14542755	13442802	5485186	
	siPSPC1	1	255210	255153	241881	250748	7679	313768	293517	256449	287912	29068	
		2	515069	443759	489733	482854	36150	531615	444622	522848	499695	47896	
		3	9321714	9048404	9141799	9170639	138918	13646640	13487616	14622631	13918959	614555	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.726	0.807	0.890	0.808	0.082	1.000	1.000	0.109	0.5346	ns
		2	0.821	0.847	0.792	0.820	0.028	1.000	1.000			
		3	0.952	0.937	1.033	0.974	0.051	1.000				
	siPSPC1	1	0.835	0.756	0.875	0.822	0.060	1.018				
		2	0.833	0.813	0.736	0.794	0.052	0.968	0.957	0.070		
		3	0.837	0.944	0.838	0.873	0.061	0.897				
Hypoxia	siCtrl	1	1.260	1.183	1.174	1.205	0.048	1.000			0.909	ns
		2	1.102	1.031	0.973	1.036	0.065	1.000	1.000	0.313		
		3	0.837	1.831	2.021	1.563	0.636	1.000				
	siPSPC1	1	1.229	1.150	1.060	1.147	0.085	0.951				
		2	1.032	1.002	1.068	1.034	0.033	0.998	0.972	0.179		
		3	1.464	1.491	1.600	1.518	0.072	0.971				

cmyc		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
normoxia	siCtrl	1	1376489	1656411	1634471	1555790	155667	241155	349763	295138	295352	54305	
		2	1216742	1371688	1207546	1265325	92227	325307	384619	326642	345523	33865	
		3	936981	912821	923416	924406	12111	353453	426897	451667	410672	51078	
	siPSPC1	1	1959245	1729456	1762524	1817075	124228	332133	310274	335337	325915	13640	
		2	1430337	1754454	1669279	1618023	168027	322390	411266	351022	361559	45365	
		3	1297955	1402948	1494146	1398350	98176	494757	486234	539230	506740	28458	
Hypoxia	siCtrl	1	2303679	2473031	2051451	2276054	212143	531197	646002	466514	547904	90903	
		2	1405500	1480296	1467212	1451002	39946	575691	601917	534370	570659	34053	
		3	802990	789755	806209	799651	8720	392506	481930	399124	424520	49828	
	siPSPC1	1	2136726	973440	2184793	1764986	685921	411768	329971	419752	387164	49691	
		2	1802730	2187577	2061130	2017146	196157	587572	539105	606345	577674	34696	
		3	711911	903770	638287	751323	137060	355455	327717	305612	329595	24974	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
normoxia	siCtrl	1	0.175	0.211	0.181	0.189	0.019	1.000			0.3799	ns
		2	0.267	0.280	0.271	0.273	0.007	1.000	1.000	0.388		
		3	0.377	0.468	0.489	0.445	0.059	1.000				
	siPSPC1	1	0.170	0.179	0.190	0.180	0.010	0.951			0.293	ns
		2	0.225	0.234	0.210	0.223	0.012	0.819	0.845	0.277		
		3	0.381	0.347	0.361	0.363	0.017	0.816				
Hypoxia	siCtrl	1	0.231	0.261	0.227	0.240	0.019	1.000			0.293	ns
		2	0.410	0.407	0.364	0.393	0.025	1.000	1.000	0.340		
		3	0.489	0.610	0.495	0.531	0.068	1.000				
	siPSPC1	1	0.193	0.339	0.192	0.241	0.085	1.006			0.293	ns
		2	0.326	0.246	0.294	0.289	0.040	0.734	0.839	0.285		
		3	0.499	0.363	0.479	0.447	0.074	0.841				

Table 9. *Neat1* knockdown

FGF1		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	130797	98622	82852	104090	24436	33722	24899	23844	27488	5424	
		2	1324654	1485789	1482312	1430918	92044	173699	206379	211312	197130	20442	
		3	1268988	1552184	1543766	1454979	161128	148045	155089	183753	162296	18913	
	Gapmer LNA Neat1	1	180118	147737	159475	162443	16393	29972	23539	23588	25700	3700	
		2	6341693	6755014	5578620	6225109	596800	363734	390867	323563	359388	33862	
		3	5087778	4266498	4841003	4731760	421397	284280	320062	273287	292543	24458	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	116671	64686	90595	90651	25993	27125	15740	17859	20242	6055	
		2	1825907	1398828	1559373	1594702	215720	167819	152079	198757	172885	23748	
		3	1884235	2561907	1797474	2081205	418554	277071	360733	324190	320664	41942	
	Gapmer LNA Neat1	1	148434	175604	250437	191492	52825	17478	20704	23061	20414	2803	
		2	8688776	8791901	8157013	8545897	340707	405878	412598	345985	388154	36673	
		3	7787636	6838627	8432833	7686365	801913	492167	545342	511643	516384	26903	

		Ratio LucF/LucR										
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization				
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.258	0.252	0.288	0.266	0.019	1.000	1.000	0.421	0.0469	*
		2	0.131	0.139	0.143	0.138	0.006	1.000				
		3	0.117	0.100	0.119	0.112	0.010	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.166	0.159	0.148	0.158	0.009	0.593	0.539	0.288		
		2	0.057	0.058	0.058	0.058	0.000	0.420				
		3	0.056	0.075	0.056	0.062	0.011	0.558				
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.232	0.243	0.197	0.224	0.024	1.000	1.000	0.327	0.0006	***
		2	0.092	0.109	0.127	0.109	0.018	1.000				
		3	0.147	0.141	0.180	0.156	0.021	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.118	0.118	0.092	0.109	0.015	0.487	0.454	0.181		
		2	0.047	0.047	0.042	0.045	0.003	0.415				
		3	0.063	0.080	0.061	0.068	0.010	0.435				

FGF2		Exp num	Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			A	B	C	Mean	SD		A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	56290	26712	40631	41211	14798		17104	7094	9014	11071	5313	
		2	32727	23049	30834	28870	5129		6980	6533	7575	7030	523	
		3	43246	33170	73107	49841	20769		4905	4152	5865	4974	858	
	Gapmer LNA Neat1	1	113254	699484	191238	334659	318345		10903	54564	17640	27702	23505	
		2	42957	48949	36294	42733	6330		5758	6556	5688	6001	482	
		3	67023	86168	116483	89891	24939		4890	4386	6964	5413	1366	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	183592	223789	222880	210087	22949		32155	35425	42292	36624	5174	
		2	35379	12778	30119	26092	11827		6056	2279	5383	4573	2014	
		3	77903	83791	97087	86261	9828		8422	7184	1087	5564	3926	
	Gapmer LNA Neat1	1	546229	603279	160000	436503	241151		49241	45909	12000	35717	20606	
		2	40391	57630	46616	48212	8730		3766	5063	4136	4322	668	
		3	196606	161857	181246	179903	17413		10066	7553	7996	8538	1341	

		Ratio LucF/LucR										Mann-Whitney p-value	Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD			
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.304	0.266	0.222	0.264	0.041	1.000	1.000	0.391		0.0071	**
		2	0.213	0.283	0.246	0.247	0.035	1.000					
		3	0.113	0.125	0.080	0.106	0.023	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.096	0.078	0.092	0.089	0.010	0.337	0.472	0.178		0.0142	*
		2	0.134	0.134	0.157	0.142	0.013	0.572					
		3	0.073	0.051	0.060	0.061	0.011	0.576					
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.175	0.158	0.190	0.174	0.016	1.000	1.000	0.428		0.0142	*
		2	0.171	0.178	0.179	0.176	0.004	1.000					
		3	0.108	0.086	0.011	0.097	0.016	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.090	0.076	0.075	0.080	0.008	0.461	0.520	0.143			
		2	0.093	0.088	0.089	0.090	0.003	0.511					
		3	0.051	0.047	0.044	0.047	0.004	0.488					

VEGFAa		Exp num	Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			A	B	C	Mean	SD		A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	228280	264370	254890	249180	18710		392	426	428	415	21	
		2	345732	223452	336037	340884	67973		1188	-78	995	1091	682	
		3	59329	46352	58549	54743	7278		443	414	509	455	49	
	Gapmer LNA Neat1	1	850495	892309	696255	813020	103260		1961	2433	1916	2103	286	
		2	888941	1182727	977300	1016323	150730		2060	3309	2433	2601	641	
		3	137134	125505	129468	130702	5912		708	570	519	599	98	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	454068	420879	488434	454460	33779		3371	3252	3749	3457	259	
		2	311252	476952	336648	374951	89244		4018	4420	4405	4281	228	
		3	125829	106517	117675	116674	9695		796	769	896	820	67	
	Gapmer LNA Neat1	1	1755725	1786388	1571152	1704422	116429		6368	5851	4420	5546	1009	
		2	1518298	885182	1006695	1136725	335990		7792	5082	5605	6160	1438	
		3	239161	234022	237766	236983	2657		1243	1011	919	1058	167	

		Exp num	Ratio LucF/LucR									Mann-Whitney p-value	Significance
			A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD			
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	1.000	1.000	0.858		> 0.9999	Ns
		2	0.003	0.000	0.003	0.003	0.002	1.000					
		3	0.007	0.009	0.009	0.008	0.001	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.002	0.003	0.003	0.003	0.000	1.554	0.805	0.264		0.0001	***
		2	0.002	0.003	0.002	0.003	0.000	0.793					
		3	0.005	0.005	0.004	0.005	0.001	0.547					
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.007	0.008	0.008	0.008	0.000	1.000	1.000	0.283		0.0001	***
		2	0.013	0.009	0.013	0.012	0.002	1.000					
		3	0.006	0.007	0.008	0.007	0.001	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.004	0.003	0.003	0.003	0.000	0.426	0.499	0.121		0.0001	***
		2	0.005	0.006	0.006	0.005	0.000	0.466					
		3	0.005	0.004	0.004	0.004	0.001	0.632					

VEGFab			Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	592130	588445	584899	588491	3616	89024	83789	81707	84840	3770		
		2	1154940	754768	976328	962012	200470	160743	101525	127989	130085	29665		
		3	1393867	283626	301647	659714	635860	251094	80519	74070	135228	100395		
	Gapmer LNA Neat1	1	2164817	2214347	2242314	2207159	39245	192780	214978	207359	205039	11279		
		2	3195306	3809065	3545090	3516487	307878	246312	305725	315591	289209	37476		
		3	4299224	3987335	4317327	4201296	185516	508352	405949	464525	459608	51378		
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	1001414	800377	1089184	963658	148059	121784	102844	139794	121474	18477		
		2	1667877	1751303	1499475	1639552	128281	276036	273662	246016	265238	16689		
		3	2113072	1572673	1587910	1757885	307695	365933	451063	420135	412377	43092		
	Gapmer LNA Neat1	1	3813545	4028730	4229566	4023947	208052	311678	333270	311099	318682	12637		
		2	6718828	7159760	8651154	7509914	1012633	555220	578402	631064	588229	38865		
		3	5436854	5530708	6676394	5881319	690153	520942	573694	689309	594648	86117		

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.1503	0.1424	0.1397	0.1441	0.005538	1.000			< 0.0001	****
		2	0.1392	0.1345	0.1311	0.1349	0.004059	1.000	1.000	0.322		
		3	0.1801	0.2839	0.2456	0.2365	0.05246	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.0891	0.0971	0.0925	0.0929	0.004031	0.644			0.551 0.076	
		2	0.0771	0.0803	0.089	0.0821	0.006182	0.609				
		3	0.1182	0.1018	0.1076	0.1092	0.008335	0.462				
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.1216	0.1285	0.1283	0.1262	0.003932	1.000			1.000 0.337	< 0.0001
		2	0.1655	0.1563	0.1641	0.1619	0.004972	1.000	1.000	0.337		
		3	0.1732	0.2868	0.2646	0.2415	0.060226	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.0817	0.0827	0.0736	0.0793	0.005032	0.629			0.489 0.066	****
		2	0.0826	0.0808	0.0729	0.0788	0.005145	0.487				
		3	0.0958	0.1037	0.1032	0.1009	0.004435	0.418				

VEGFC		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	268948	215669	235986	240201	26889	20507	17652	22646	20268	2506	
		2	415401	314699	323438	351180	55789	77553	62353	68839	69581	7627	
		3	351021	1255659	996065	867582	465804	97373	242267	222849	187496	78651	
	Gapmer LNA Neat1	1	744706	826236	741497	770813	48025	22755	23693	20765	22404	1495	
		2	1187605	1719953	1807553	1571704	335510	49411	71173	66705	62430	11494	
		3	1306031	1317445	1313896	1312458	5841	67750	61091	71268	66703	5169	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	451023	464658	465074	460251	7995	23155	22050	24515	23240	1235	
		2	535899	538350	512109	528786	14494	94316	93879	102964	97053	5124	
		3	542368	596298	481042	539903	57668	149790	126538	153082	143137	14469	
	Gapmer LNA Neat1	1	1414694	1558330	1365966	1446330	100008	30827	31648	24899	29125	3682	
		2	2542154	2180157	2613132	2445148	232217	111051	121182	118657	116964	5274	
		3	2405631	2088828	2353655	2282704	169902	107081	93526	94431	98346	7579	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.0762	0.0818	0.096	0.0847	0.01016	1.000	1.000	0.411	< 0.0001	****
		2	0.1867	0.1981	0.2128	0.1992	0.013104	1.000	1.000			
		3	0.2774	0.1929	0.2237	0.2314	0.042743	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.0306	0.0287	0.028	0.0291	0.001323	0.343	0.233	0.057	0.0003	***
		2	0.0416	0.0414	0.0369	0.04	0.002652	0.201				
		3	0.0519	0.0464	0.0542	0.0508	0.004038	0.220				
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.0513	0.0475	0.0527	0.0505	0.002728	1.000	1.000	0.592	0.0003	***
		2	0.176	0.1744	0.2011	0.1838	0.014958	1.000	1.000			
		3	0.2762	0.2122	0.3182	0.2689	0.053388	1.000	1.000			
	Gapmer LNA Neat1	1	0.0218	0.0203	0.0182	0.0201	0.00179	0.398	0.222	0.080		
		2	0.0437	0.0556	0.0454	0.0482	0.006431	0.262				
		3	0.0445	0.0448	0.0401	0.0431	0.002614	0.160				

VEGFD		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	186598	174458	194967	185341	10312	14000	12899	15863	14254	1498	
		2	236094	257184	307585	266954	36733	18079	16903	20655	18545	1919	
		3	238009	272627	201183	237273	35728	24834	23845	23129	23936	856	
	Gapmer LNA Neat1	1	850116	863359	900946	871473	26369	53614	54124	46571	51436	4221	
		2	1699249	1517611	1361981	1526280	168801	83001	65774	61480	70085	11390	
		3	1227420	1258580	1355633	1280544	66869	67516	75980	85947	76481	9226	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	320104	331836	371059	341000	26685	21527	20031	23687	21748	1838	
		2	370828	422876	450235	414646	40338	30107	32468	37560	33378	3809	
		3	550918	435861	281152	422644	135368	53330	39855	31894	41693	10836	
	Gapmer LNA Neat1	1	1582942	1749642	1606739	1646441	90163	80420	99481	84808	88237	9982	
		2	2540713	2734360	3042934	2772669	253292	125626	136340	114288	125418	11027	
		3	2337486	1957657	1984333	2093158	212014	135295	129351	121929	128858	6697	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.075	0.0739	0.0814	0.0768	0.004009	1.000	1.000	0.202	< 0.0001	****
		2	0.0766	0.0657	0.0672	0.0698	0.005896	1.000	1.000			
		3	0.1043	0.0875	0.115	0.1023	0.013868	1.000	0.770	0.096		
	Gapmer LNA <i>Neat1</i>	1	0.0631	0.0627	0.0517	0.0591	0.006461	0.656	0.661		0.0003	***
		2	0.0488	0.0433	0.0451	0.0458	0.002807	0.583				
		3	0.055	0.0604	0.0634	0.0596	0.004251	1.000	1.000	0.210		
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.0672	0.0604	0.0638	0.0638	0.003442	1.000	1.000	0.210	0.0003	***
		2	0.0812	0.0768	0.0834	0.0805	0.003338	1.000	1.000			
		3	0.0968	0.0914	0.1134	0.1006	0.011471	1.000	0.657	0.101		
	Gapmer LNA <i>Neat1</i>	1	0.0508	0.0569	0.0528	0.0535	0.003087	0.838	0.657		0.0003	***
		2	0.0494	0.0499	0.0376	0.0456	0.006986	0.567				
		3	0.0579	0.0661	0.0614	0.0618	0.004108	0.615				

IGF1R		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	243181	214165	256708	238018	21736	64800	50375	74714	63296	12239	
		2	289104	236279	320432	281938	42532	57102	48588	64902	56864	8160	
		3	468014	341725	354953	388231	69410	89849	69873	68938	76220	11812	
	Gapmer LNA Neat1	1	641540	541068	476621	553076	83113	90421	84962	64587	79990	13616	
		2	934259	1001588	982343	972730	34678	76744	86636	86743	83375	5742	
		3	909959	1202096	1057982	1056679	146073	87047	120227	113487	106920	17538	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	150223	167451	189584	169086	19731	48001	55519	72037	58519	12295	
		2	567189	531510	569829	556176	21402	112568	108808	121830	114402	6702	
		3	213578	283108	594185	363623	202676	58103	88067	132981	93050	37687	
	Gapmer LNA Neat1	1	422741	384291	361023	389351	31169	74275	73243	63546	70355	5919	
		2	1828828	1843042	1902069	1857980	38838	121169	137047	132974	130397	8247	
		3	1403043	1439067	800965	1214358	358462	148105	154836	97166	133369	31533	

		Ratio LucF/LucR										Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.266	0.235	0.291	0.264	0.028	1.000	1.000	0.161	< 0.0001	****
		2	0.198	0.206	0.203	0.202	0.004	1.000	1.000			
		3	0.192	0.204	0.194	0.197	0.007	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.141	0.157	0.136	0.144	0.011	0.547	0.499	0.123	< 0.0001	****
		2	0.082	0.086	0.088	0.086	0.003	0.424				
		3	0.096	0.100	0.107	0.101	0.006	0.513				
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.320	0.332	0.380	0.344	0.032	1.000	1.000	0.241	< 0.0001	****
		2	0.198	0.205	0.214	0.206	0.008	1.000				
		3	0.272	0.311	0.224	0.269	0.044	1.000				
	Gapmer LNA Neat1	1	0.176	0.191	0.176	0.181	0.009	0.526	0.443	0.179	< 0.0001	****
		2	0.066	0.074	0.070	0.070	0.004	0.341				
		3	0.106	0.108	0.121	0.111	0.009	0.414				

EMCV		Exp num	Renilla luciferase						Firefly luciferase					
			A	B	C	Mean	SD		A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	231360	200119	195599	209026	19473		184926	161799	151222	165982	17237	
		2	1236254	1034251	1190294	1153600	105883		802079	639691	733674	725148	81529	
		3	1605131	1009872	1248146	1287716	299596		978404	644626	759438	794156	169576	
	Gapmer LNA Neat1	1	262296	274310	227852	254819	24115		212785	205023	182198	200002	15900	
		2	4541077	4722169	3821501	4361582	476408		2388347	2531111	2288426	2402628	121971	
		3	3736975	4412734	4672802	4274170	483056		2141250	2525467	2756413	2474377	310748	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	139570	102655	101666	114630	21604		134824	88039	89602	104155	26571	
		2	1557383	1688310	1647310	1631001	66969		1176925	1138768	1159710	1158467	19109	
		3	1469437	1513608	1782542	1588529	169465		1497706	1194433	1533246	1408462	186204	
	Gapmer LNA Neat1	1	159440	130826	155274	148513	15459		154391	116021	107166	125859	25103	
		2	9243748	9423188	9243336	9303424	103719		4831155	5317539	5263458	5137384	266577	
		3	4821342	4654942	3747799	4408028	577796		3512787	3241094	3165797	3306559	182523	

		Exp num	Ratio LucF/LucR						Normalization	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	Significance
			A	B	C	Mean	SD						
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.799	0.809	0.773	0.794	0.018	1.000	1.000	0.127		0.1348	ns
		2	0.649	0.619	0.616	0.628	0.018	1.000					
		3	0.610	0.638	0.608	0.619	0.017	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.811	0.747	0.800	0.786	0.034	0.990	0.940	0.167			
		2	0.526	0.536	0.599	0.554	0.039	0.882					
		3	0.573	0.572	0.590	0.578	0.010	0.935					
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.966	0.858	0.881	0.902	0.057	1.000	1.000	0.138		0.1348	ns
		2	0.756	0.675	0.704	0.711	0.041	1.000					
		3	1.019	0.789	0.860	0.890	0.118	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.968	0.887	0.690	0.848	0.143	0.941	0.862	0.186			
		2	0.523	0.564	0.569	0.552	0.026	0.776					
		3	0.729	0.696	0.845	0.757	0.078	0.850					

cmyc		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	409115.667	409858.667	477078.667	432017.667	39026	56600	57218	70155	61324.4444	7654	
		2	537995.333	865640	785543.667	729726.333	170805	129074	188805	190860	169579.778	35094	
		3	817358.417	884814.75	692293.083	798155.417	97687	386170	358606	369298	371358	13897	
	Gapmer LNA Neat1	1	815950.667	1782212.67	1451628	1349930.44	491093	107182	141253	114757	121064	17889	
		2	4228764.33	3975787.67	3648284.33	3950945.44	291036	312037	298030	266821	292296	23147	
		3	3337134.42	3277986.42	3093559.08	3236226.64	127044	467337	469577	434836	457250	19444	
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	848388.333	733310.667	820763	800820.667	60075	87044	81354	91270	86555.8889	4976	
		2	1022245	1179393.67	1261896	1154511.56	121748	256743	327423	339370	307845.444	44658	
		3	1261477.5	931395.5	910791.833	1034554.94	196791	676240	500283	605173	593899	88519	
	Gapmer LNA Neat1	1	3163184.67	3416411.67	2949987.67	3176528	233498	214005	209213	176425	199881.111	20454	
		2	6882853	6708709.33	6411856.67	6667806.33	238147	562750	553645	461767	526054.111	55860	
		3	4854553.83	4079910.83	4678820.17	4537761.61	406129	834137	638674	715474	729428	98476	

		Ratio LucF/LucR										Mann-Whitney p-value	Significance
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalization	Mean	SD			
Normoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.1383	0.1396	0.1471	0.1417	0.004705	1.000	1.000	1.000	0.534	0.0009	***
		2	0.2399	0.2181	0.243	0.2337	0.013556	1.000	1.000				
		3	0.4725	0.4053	0.5334	0.4704	0.064101	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.1314	0.0793	0.0791	0.0966	0.03014	0.682	0.369	0.118		0.0036	**
		2	0.0738	0.075	0.0731	0.074	0.000925	0.317					
		3	0.14	0.1433	0.1406	0.1413	0.001723	0.300					
Hypoxia	Gapmer LNA Ctrl	1	0.1026	0.1109	0.1112	0.1082	0.004893	1.000	1.000	0.664		0.0036	**
		2	0.2512	0.2776	0.2689	0.2659	0.01349	1.000	1.000				
		3	0.5361	0.5371	0.6644	0.5792	0.073814	1.000					
	Gapmer LNA Neat1	1	0.0677	0.0612	0.0598	0.0629	0.00418	0.581	0.317	0.144		0.0036	**
		2	0.0818	0.0825	0.072	0.0788	0.005859	0.296					
		3	0.1718	0.1565	0.1529	0.1604	0.010035	0.277					

Table 10. Knockdown of MS candidates

FGF1		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	siCtrl	1	70175	101667	79068	83637	16236	32496	38405	28998	33300	4755	
		2	480646	282659	449570	404292	106477	150414.583	102400.583	132897.917	128571.028	24297.6856	
		3	352222	388895	368737	369951	18367	126831	120091	104519	117147	11444	
Normoxia		1	86346	72676	72110	77044	8061	29502	25309	23922	26245	2905	
	siRps2	2	372877	248168	482623	367889	117307	106876.917	75175.5833	122715.583	101589.361	24207.0565	
		3	315917	304772	236089	285593	43232	77833	76598	53539	69323	13684	
Hypoxia		1	108205	109413	118115	111911	5406	50653	46424	44762	47280	3037	
	siCtrl	2	1200321.13	675913.125	1069716.79	981983.681	272990.406	301970.917	212601.75	252865.917	255812.861	44757.4055	
		3	619170	654180	613280	628877	22110	191284	180584	172469	181446	9437	
Hypoxia		1	116363	104800	128883	116682	12045	46670	35470	40340	40826	5616	
	siRps2	2	919414.625	544829.792	1039654.46	834632.958	258077.141	226374.25	182160.583	212224.917	206919.917	22579.1795	
		3	531687	477308	541537	516844	34592	145562	107598	114449	122537	20233	

		Ratio LucF/LucR									
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Significance
Normoxia	1	0.46307601	0.37775121	0.36674288	0.40252337	0.0527282	1.000	1.000	1.000	0.159	0.0244
	2	0.31294268	0.36227588	0.29561109	0.32360989	0.03458888	1.000	1.000	1.000	0.159	
	3	0.36008992	0.30879981	0.28345172	0.31744715	0.03904403	1.000	1.000	1.000	0.159	
Hypoxia	1	0.3416753	0.34824991	0.33174882	0.34055801	0.00830709	0.846	0.846	0.846	0.131	0.0244
	2	0.28662797	0.30292199	0.25426793	0.28127263	0.02476518	0.869	0.869	0.869	0.131	
	3	0.24637236	0.25132931	0.2267749	0.24149219	0.01298429	0.761	0.761	0.761	0.131	
Hypoxia	1	0.4681233	0.42429711	0.37897318	0.42379786	0.04457715	1.000	1.000	1.000	0.245	0.2547
	2	0.25157511	0.31454005	0.23638585	0.26750034	0.04143947	1.000	1.000	1.000	0.245	
	3	0.30893655	0.27604721	0.28122452	0.28873609	0.01768459	1.000	1.000	1.000	0.245	
Hypoxia	1	0.40106926	0.33845174	0.31299501	0.35083867	0.04532489	0.828	0.828	0.828	0.207	ns
	2	0.24621563	0.33434402	0.20413024	0.2615633	0.06644976	0.978	0.978	0.978	0.207	
	3	0.27377428	0.22542705	0.21134192	0.23684775	0.0327456	0.820	0.820	0.820	0.207	

FGF1		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	siCtrl	1	70175	101667	79068	83637	16236	32496	38405	28998	33300	4755	
		2	480646	282659	449570	404292	106477	150414.583	102400.583	132897.917	128571.028	24297.6856	
		3	352222	388895	368737	369951	18367	126831	120091	104519	117147	11444	
	sihnRNPM	1	73070	86184	94096	84450	10620	31149	31919	39363	34144	4536	
		2	463775.458	444702.125	669255.458	525911.014	124505.704	160032.917	111057.583	169284.917	146791.806	31290.5873	
		3	435784	383796	326717	382099	54553	116837	91766	91569	100057	14532	
Hypoxia	siCtrl	1	108205	109413	118115	111911	5406	50653	46424	44762	47280	3037	
		2	1200321.13	675913.125	1069716.79	981983.681	272990.406	301970.917	212601.75	252865.917	255812.861	44757.4055	
		3	619170	654180	613280	628877	22110	191284	180584	172469	181446	9437	
	sihnRNPM	1	149997	102166	111967	121377	25266	65583	48006	55825	56471	8806	
		2	736219.125	989554.458	989554.458	905109.347	146263.223	329601.25	237066.917	313103.583	293257.25	49356.4426	
		3	727443	691434	691434	703437	20790	197670	177901	152871	176147	22451	

		Ratio LucF/LucR										
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	Significance
Normoxia	siCtrl	1	0.46307601	0.37775121	0.36674288	0.40252337	0.0527282	1.000			0.2547	ns
		2	0.31294268	0.36227588	0.29561109	0.32360989	0.03458888	1.000	1.000	0.159		
		3	0.36008992	0.30879981	0.28345172	0.31744715	0.03904403	1.000				
	sihnRNPM	1	0.42629377	0.37035442	0.41832908	0.40499242	0.03026058	1.006	0.910	0.214		
		2	0.34506551	0.24973477	0.25294514	0.28258181	0.05413628	0.873				
		3	0.2681077	0.23910067	0.28027021	0.26249286	0.02111513	0.827				
Hypoxia	siCtrl	1	0.4681233	0.42429711	0.37897318	0.42379786	0.04457715	1.000	1.000	0.245	0.7137	ns
		2	0.25157511	0.31454005	0.23638585	0.26750034	0.04143947	1.000				
		3	0.30893655	0.27604721	0.28122452	0.28873609	0.01768459	1.000				
	sihnRNPM	1	0.43722842	0.46988011	0.49858391	0.46856415	0.03069891	1.106	1.075	0.339		
		2	0.4476945	0.23956935	0.31640864	0.3345575	0.10524284	1.251				
		3	0.27173224	0.25729349	0.22109288	0.25003954	0.02608737	0.866				

FGF1		Renilla luciferase						Firefly luciferase					
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	A	B	C	Mean	SD	
Normoxia	siCtrl	1	70175	101667	79068	83637	16236	32496	38405	28998	33300	4755	
		2	480646	282659	449570	404292	106477	150414.583	102400.583	132897.917	128571.028	24297.6856	
		3	352222	388895	368737	369951	18367	126831	120091	104519	117147	11444	
	siNcl	1	140 655	93 009	113 335	115 666	23909	36314	36674	31297	34762	3006	
		2	689994.458	996580.458	930164.792	872246.569	161290.527	159799.25	180704.25	200234.917	180246.139	20221.7255	
		3	528 673	559 187	454 446	514102	53869	136788	112437	111030	120085	14483	
Hypoxia	siCtrl	1	108205	109413	118115	111911	5406	50653	46424	44762	47280	3037	
		2	1200321.13	675913.125	1069716.79	981983.681	272990.406	301970.917	212601.75	252865.917	255812.861	44757.4055	
		3	619170	654180	613280	628877	22110	191284	180584	172469	181446	9437	
	siNcl	1	148 450	157 125	158 518	154 698	5455	56578	58848	52861	56096	3023	
		2		1894315.79	2234800.46	2064558.13	240759.017		319677.917	412429.25	366053.583	65585.0968	
		3	825 673	826 588	771 221	807827	31706	212040	205754	208187	208660	3169	

		Ratio LucF/LucR										
		Exp num	A	B	C	Mean	SD	Normalisation	Mean	SD	Mann-Whitney p-value	Significance
Normoxia	siCtrl	1	0.46307601	0.37775121	0.36674288	0.40252337	0.0527282	1.000	1.000	0.159	0.0028	**
		2	0.31294268	0.36227588	0.29561109	0.32360989	0.03458888	1.000	1.000			
		3	0.36008992	0.30879981	0.28345172	0.31744715	0.03904403	1.000				
	siNcl	1	0.25817998	0.39430687	0.27614486	0.3095439	0.07395441	0.769	0.722	0.177	0.2716	ns
		2	0.23159498	0.1813243	0.21526822	0.20939583	0.02564467	0.647				
		3	0.25873928	0.20107203	0.2443192	0.23471017	0.03001046	0.739	1.000	0.245		
Hypoxia	siCtrl	1	0.4681233	0.42429711	0.37897318	0.42379786	0.04457715	1.000	1.000		0.849	0.246
		2	0.25157511	0.31454005	0.23638585	0.26750034	0.04143947	1.000	1.000			
		3	0.30893655	0.27604721	0.28122452	0.28873609	0.01768459	1.000				
	siNcl	1	0.38112243	0.37453169	0.33346768	0.3630406	0.02582204	0.857	0.857	0.246	0.895	
		2		0.1687564	0.18454858	0.17665249	0.01116676	0.660	0.660			
		3	0.25680835	0.24892012	0.26994497	0.25855781	0.01062104	0.895				

STAR Method

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).
- Plasmids generated in this study have been deposited to Dryad
- This study did not generate new unique reagents.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

CELL LINES

Female human embryonic kidney cells HEK-293FT and male human fibrosarcoma HT1080 cells 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). Female mouse atrial HL-1 cardiomyocytes (Sigma-Aldrich) were cultured in Claycomb medium containing 10% FBS, Penicillin/Streptomycin (100U/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 1 h to 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% CO₂. When subjected to hypoxia, cells were incubated at 37°C at 1% O₂.

MICROBE 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 pSCB plasmid.

METHOD DETAILS

CELL TRANSFECTION

siRNA treatment on transduced cells was performed 72 h after transduction (and after one cell passage) in 24 well plate for reporter activity assay or 12 well plate for gene expression experiment. 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 h after transfection and the cells were incubated 72 h for the time of transfection at 37°C with siRNA. For NEAT1 knockdown, HL-1 cells were transduced with a pool of 4 gapmers (Quiagen) at 40nM (10nM each) and incubated 48 h

after transfection, proceeded essentially as described above (gapmers and siRNA sequences are provided in Table 1 and 2).

CELL TRANSDUCTION

For lentivector transduction, HL-1 cardiomyocytes were plated into a T25 flask and transduced overnight in 1 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 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, 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, c-myc and EMCV IRESs were introduced between the first (LucR) and the second cistron (LucF) (Nanbru et al., 1997; Prats et al., 2013; Vagner et al., 1995). IRES sequence sizes are : 430 nt (FGF1), 480 nt (FGF2), 302 nt (VEGF_{AA}), 485 nt (VEGF_{AB}), 419 nt (VEGF_C), 507 nt (VEGF_D), 363 nt (c-myc), 640 nt (EMCV), 1050 nt (IGF1R) (Huez et al., 1998; Martineau et al., 2004; Morfoisse et al., 2014, 2016; Nanbru et al., 1997; Vagner et al., 1995). The two IRESs of the VEGFA have been used and are called VEGF_{AA} and VEGF_{AB}, 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. All vector sequences are available on Dryad (Ape format). Plasmid construction and amplification was performed in the bacteria strain TOP10 (ThermoFisher Scientific, Illkirch Graffenstaden, France). Human p54nrb previously cloned into pTRIP-DU3-CMV-MCS lentivector (Anaoui et al 2015) was PCR amplified to add flanking restriction site (BamHI, SalI) with two HA tag in N-terminal position separated by 3 aminoacids (YPYDVPDYAGGAYPYDVPDYA) (Table 4). Then the PCR product was cloned into pSCB plasmid using StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (Agilent technologies) and digested BamHI-SalI to be inserted into pTRIP-CMV lentivector.

LENTIVECTOR PRODUCTION

Lentivector particles were produced using the CaCl₂ method-based by tri-transfection with the plasmids pCMV-dR8.91 and pCMV-VSVG, CaCl₂ and Hepes Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), into HEK-293FT cells. Viral supernatants were harvested 48 h 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 *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). Quantification of bioluminescence was performed with a luminometer (Centro LB960, Berthold, Thoiry, France) from 8 to 12 biological replicates, and with 3 technical replicates for each sample in the analysis plate.

FISH

HL-1 cell were cultured in 12 well plates on fibronectin-gelatin coated 15mm coverglass 1.5 thickness (Menzel-Gläser). FISH probes were produced and purchased from Sigma-Aldrich, delivered HPLC purified at 0.05 μ mol. The 3/2 probes used per target (NEAT1 and NEAT1_2 isoform respectively) are between 38-40 mer long and are conjugated to one Cy3 through 5' amino acid modifications (see table 3 for sequence).

FISH was performed as previously described (<http://www.singerlab.org/protocols>). Briefly, cell 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/2X SSC buffer at room temperature. The hybridization reaction was performed overnight at 37°C with a Mix of 2XSSC, 0.5mg/mL yeast tRNA, 15% formamide, 10% dextran sulfate, and 10ng of mixed probes. Then the coverslip were rinsed two time 10min in 2X SSC and in 1XSSC 10min, 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 μ M and Zen software (Zeiss).

WESTERN BLOT

Cells were harvested on ice, washed with cold PBS, 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 Stain Free FastCast 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), Rabbit anti-p54nrb (Santacruz, sc67016), Rabbit Histone H3 (Cell Signaling, 4499), Mouse GAPDH (SantaCruz, SC32233).

CAPILLARY WESTERN

Diluted protein lysate was mixed with fluorescent master mix and heated at 95°C for 5 minutes. 3 μ L of protein mix (1mg/mL maximal concentration) containing Protein Normalization Reagent, blocking reagent, wash buffer, target primary antibody (rabbit anti-p54nrb, diluted 1:200 [Santacruz, sc67016], 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 of mouse “detection

module”, DM-001 or DM-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 (12-230kDa) (SM-SW004). Normalization reagent allow to detect 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 on Figures represent chemiluminescence value before normalization.

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 with 2X TB green Premix Ex Taq II (Takara, RR820B), 10 μ M forward and reverse primers, according to manufacturer instruction. qPCR reaction were performed on Vii7 (AppliedBiosystems) and the oligonucleotide primers used are detailed in Table 4.

DDPCR

ddPCR reaction for *Neat1* knockdown control were performed with Bio-Rad system. The ddPCR reaction mixture (22 μ l) contained 2x QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix (no dUTP) (Bio-Rad), 2 μ M of a mix of forward and reverse primers (Table 4), and 2/4/6 μ L 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 was already placed in cartridge holder. The droplet were generated by AutoDG System, between 15000-20000 droplet/well. The prepared droplet emulsions were further loaded in a ddPCR 96-Well Plates (Bio-rad) by aspirating 40 μ l from the DG32 cartridge by the AutoDG System. The plate was then heat sealed with pierceable foil using a PX1 PCR plate sealer 5s 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 5min followed by 90°C 5min. After PCR amplification the positive droplets were counted with 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 pH 7.3, digitonin (100 μ g/mL), EDTA 1mM, protease inhibitor cocktail) and incubated on ice. Then the lysate was centrifugated at 2000g 5min 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 pH 7.3, NP40 1%, EDTA 1 mM, protease inhibitor cocktail) during 30min at 4°C. After centrifugation at 7000g, 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 10 min at 4°C. Finally the lysate was centrifuged 10 min at 8200g and the supernatant was aliquoted (nuclear fraction). Cells with no transduction were used as a control and lysed in RIPA buffer.

IMMUNOPRECIPITATION

Immunoprecipitation experiments were conducted with 150 µg of total protein amounts from three or four biological replicates of cytosolic and nuclear fraction in normoxia or hypoxia, or from total cellular extract with a HA antibody (H9558/H3663, Sigma) or with irrelevant mouse IgG antibody (I5381 Sigma) using EZ view red protein G beads (Sigma). The beads-antibody-protein mix were incubated overnight at 4°C and bound 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 were submitted to an additional protein reduction in 24.5 mM dithiothreitol for 30 min at 56°C followed by an 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 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. 5 µl of each peptide extracts were loaded in two or three injection replicates onto 300 µm ID x 5mm PepMap C18 precolumn (ThermoFisher, Dionex) at 20 µl/min in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 minutes 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 350–1,800 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.

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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. ddPCR data was analyzed using the QuantaSoft 1.7.4 software (Bio-Rad). HPRT was used as reference gene and *Neat1* RNA expression was normalized by normoxia control and expressed in %.

DUAL LUCIFERASE SYSTEM

Data were analyzed on MicroWin 2000. Background noise were measured with non-transduced cells 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 a laplacien filter is applied.

CAPILLARY WESTERN

Data were analyzed on compass software provided by the manufacturer.

BIOINFORMATICS ANALYSIS FOR PROTEIN IDENTIFICATION AND LABEL FREE QUANTIFICATION

Acquired MS and MS/MS data as raw MS files were converted to the mzDB format (Bouyssie et al., 2015) using the pwiz-mzdb converter (version 0.9.10, <https://github.com/mzdb/pwiz-mzdb>) executed with its default parameters. Generated mzDB files were processed with the mzdb-access library (version 0.7, <https://github.com/mzdb/mzdb-access>) to generate peaklists. Peak lists were searched against UniProtKB/Swiss-Prot protein database with *mus musculus* taxonomy (16,979 sequences) in Mascot search engine (version 2.6.2, Matrix Science, London, UK). Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification and methionine oxidation as variable modification. Up to two missed trypsin/P cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.6 Da, 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 (<http://proline.profi-proteomics.fr/>). 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. Only the proteins identified with more than 4 MS/MS counting in at least one of the two compared conditions and quantified in a minimum of two biological replicates before missing value replacement were subjected to the statistical analysis. For each pairwise comparison, an unpaired two-tailed Student's t-test was performed. Proteins were considered significantly represented when their absolute log2-transformed fold change was superior or equal to 1 and their p-value under or equal to 0.05. 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.

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 $\pm$ standard deviation, *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, ****<0.0001.

DATA AND CODE AVAILABILITY

The data/codes supporting the current study have not been deposited yet in a public repository because but are available from the corresponding author on request.

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit anti-p54nrb diluted 1:200	Santacruz	sc67016
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
Rabbit Histone H3	Cell Signaling	4499
Mouse GAPDH	SantaCruz	SC32233
Mouse total IgG	Sigma	I5381
Mouse anti-HA	Sigma	H9558/H3663
Rabbit detection module	Protein Simple	DM-001
Mouse detection module	Protein Simple	DM-002
Secondary streptavidine-HRP	Protein Simple	043-459-2
Bacterial and Virus Strains		
Escherichia Coli Top10	InVitrogen	C404003
Escherichia Coli Strataclone	Agilent technologies	200185
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
TRI-Reagent	MRC Inc	TR118
Isopropanol	Sigma-Aldrich	33539
Ethanol	Sigma-Aldrich	32221
Digitonin	Sigma-Aldrich	D141
NP40 (IGEPAL 630)	Sigma-Aldrich	I8896
EDTA	Euromedex	EU0084-A
Proteinase inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich	P2714
RNAse inhibitor	AppliedBiosystem	N8080119
HA peptides	Sigma-Aldrich	I2149
Formamide	Invitrogen	15515026
Paraformaldehyde 16%	Electron Microscopy Science	
SSC saline-sodium citrate buffer	Euromedex	EU0300-C
RIPA	BioBasic	RB4476

Critical Commercial Assays		
Premix Ex Taq II	Takara	RR820B
EZ view red protein G beads	Sigma	E3403
DG32 cartridge	Bio-Rad	#1864108
QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix	Bio-Rad	1864034
High capacity cDNA Reverse transcription kit	Thermofisher	4368814
NucleoBond® Xtra Maxi kits	Macherey-Nagel	740414.10
EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit	BioBasic	BS413
StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	Agilent	240207
Dual-Luciferase® Reporter Assay system	Promega	E1980
Jess or Wes Separation Module	ProteinSimple	SM-SW004
Fluorescent 5x Master Mix 1	ProteinSimple	PS-FL01-8
Deposited Data		
p54nrb IP-MS	This paper	N/A
Foci count algorithm	This paper	N/A
Experimental Models: Cell Lines		
293FT	Invitrogen	R700-07
HT1080	ATCC	CCL-121
HL-1	(Claycomb et al., 1998) / Sigma-Aldrich	SCC065
Oligonucleotides		
NEAT1	This paper	See table 4
NEAT1_2	This paper	See table 4
HPRT	This paper	See table 4
RPL11	(Morgado-Palacin et al., 2015)	See table 4
SFPQ	This paper	See table 4
p54nrb	This paper	See table 4
PSPC1	This paper	See table 4
NUCLEOLIN	This paper	See table 4
RPS2	This paper	See table 4
HNRNPM	(Hantelys et al., 2019)	See table 4
Recombinant DNA		
pTRIP-CRHL+	Sequence available on Dryad, (2)	
pTRIP-CRF1AL+	Sequence available on Dryad, (17; 26)	
pTRIP-CRFL+	Sequence available on Dryad, (25)	
pTRIP-CRVAL+	Sequence available on Dryad, (16)	
pTRIP-CRVAL+	Sequence available on Dryad, (16)	

pTRIP-CRhVCL+	Sequence available on Dryad, (2)	
pTRIP-CRhVDL+	Sequence available on Dryad, (13)	
pTRIP-CRMP2L+	Sequence available on Dryad, (42)	
pTRIP-CREL+	Sequence available on Dryad, (25)	
pTRIP-CRIGL+	N/A	N/A
pCMV-dR8.91	Addgene	
pCMV-VSV-G	Addgene	
pTRIP-HA2-p54nrb	N/A	N/A
siRNA SMARTpool p54nrb	Dharmacon	E-048587-01-0005
siRNA SMARTpool SFPQ	Dharmacon	E-044760-00-0005
siRNA SMARTpool PSPC1	Dharmacon	E-049216-00-0005
siRNA SMARTpool Rps2	Dharmacon	E-049205-00-0005
siRNA SMARTpool Nucleolin	Dharmacon	E-059054-00-0005
siRNA SMARTpool hnRNPM	Dharmacon	E-044465-00-0005
siRNA non-targeting control	Dharmacon	D-001910-10-20
LNA Gapmer NEAT1 A	Qiagen	LG00218175
LNA Gapmer NEAT1 B	Qiagen	LG00218176
LNA Gapmer NEAT1 C	Qiagen	LG00218177
LNA Gapmer NEAT1 D	Qiagen	LG00218178
LNA Gapmer negative control	Qiagen	339515
Software and Algorithms		
Prism 6	Graphpad	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
Excel 2007	Microsoft office	
FIJI	FIJI	https://fiji.sc/
ImageJ	ImageJ/NIH	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
Zen black/Blue edition	Zeiss	https://www.zeiss.fr/microscopie/produits/microscope-software/zen-lite.html
QuantStudio	AppliedBiosystems	https://www.thermofisher.com/fr-fr/home/global/forms/life-science/quantstudio-3-5-software.html
QuantaSoft 1.7.4	Bio-Rad	https://www.bio-rad.com/fr-fr/sku/1864011-quantasoft-software-regulatory-edition?ID=1864011
Microwin 2000	Berthold	https://fr.freedownloadmanager.org/Windows-PC/MikroWin-2000.html
XCalibur software	Thermo Fisher Scientific	version 2.0 SR2
pwiz-mzdb converter	https://github.com/mzdb/pwiz-mzdb	version 0.9.10

mzdb-access library	https://github.com/mzdb/mzdb-access	version 0.7
Mascot search engine	Matrix Science	version 2.6.2
Proline software	http://proline.profiroteomics.fr/	version 1.6
Other		
LSM780 Zeiss confocal microscope	Zeiss	N/A
Jess capillary western	Protein Simple	N/A
LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer	Thermo Scientific	N/A
Ultimate 3000 RSLCnano LC system	Thermo Scientific Dionex	N/A

Bibliography

- Ainaoui, N., Hantelys, F., Renaud-Gabardos, E., Bunel, M., Lopez, F., Pujol, F., Planes, R., Bahraoui, E., Pichereaux, C., Burlet-Schiltz, O., et al. (2015). Promoter-Dependent Translation Controlled by p54nrb and hnRNPM during Myoblast Differentiation. *PLoS One* 10, e0136466.
- Chen, J., Guo, K., and Kastan, M.B. (2012). Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J. Biol. Chem.* 287, 16467–16476.
- Choudhry, H., Albukhari, A., Morotti, M., Haider, S., Moralli, D., Smythies, J., Schödel, J., Green, C.M., Camps, C., Buffa, F., et al. (2015). Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2 α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. *Oncogene* 34, 4482–4490.
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2979–2984.
- Clemson, C.M., Hutchinson, J.N., Sara, S.A., Ensminger, A.W., Fox, A.H., Chess, A., and Lawrence, J.B. (2009). An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol. Cell* 33, 717–726.
- Cobbold, L.C., Spriggs, K.A., Haines, S.J., Dobbyn, H.C., Hayes, C., de Moor, C.H., Lilley, K.S., Bushell, M., and Willis, A.E. (2008). Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Mol. Cell. Biol.* 28, 40–49.
- Créancier, L., Morello, D., Mercier, P., and Prats, A.C. (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.
- Créancier, L., Mercier, P., Prats, A.C., and 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.
- Fox, A.H., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Lyon, C.E., Andersen, J., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002). Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr. Biol.* 12, 13–25.
- Fox, A.H., Bond, C.S., and Lamond, A.I. (2005). P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 16, 5304–5315.
- Godet, A.-C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., and Prats, A.-C. (2019). IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

- Hertz, M.I., Landry, D.M., Willis, A.E., Luo, G., and Thompson, S.R. (2013). Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1016–1026.
- Hirose, T., Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., Yokoi, T., Nakagawa, S., Bénard, M., Fox, A.H., et al. (2014). NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol. Biol. Cell* 25, 169–183.
- Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 318–327.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9361–9374.
- Huez, I., Créancier, L., Audigier, S., Gensac, M.C., Prats, A.C., and 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.
- Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Sato, H., Yoneda, M., et al. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol. Cell* 53, 393–406.
- Kenneweg, F., Bang, C., Xiao, K., Boulanger, C.M., Loyer, X., Mazlan, S., Schroen, B., Hermans-Beijnsberger, S., Foinquinos, A., Hirt, M.N., et al. (2019). Long Noncoding RNA-Enriched Vesicles Secreted by Hypoxic Cardiomyocytes Drive Cardiac Fibrosis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 18, 363–374.
- Koh, M.Y., Lemos, R., Liu, X., and Powis, G. (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 71, 4015–4027.
- Lampe, S., Kunze, M., Scholz, A., Brauß, T.F., Winslow, S., Simm, S., Keller, M., Heidler, J., Wittig, I., Brüne, B., et al. (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.
- Lee, M., Sadowska, A., Bekere, I., Ho, D., Gully, B.S., Lu, Y., Iyer, K.S., Trewhella, J., Fox, A.H., and Bond, C.S. (2015). The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 43, 3826–3840.
- Martineau, Y., Le Bec, C., Monbrun, L., Allo, V., Chiu, I.-M., Danos, O., Moine, H., Prats, H., and 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.

- Morfoisse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Bouchet, A., Delisle, M.-B., Marzi, S., Helfer, A.-C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., et al. (2014). Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep.* 6, 155–167.
- Morfoisse, F., Tatin, F., Hantelys, F., Adoue, A., Helfer, A.-C., Cassant-Sourdy, S., Pujol, F., Gomez-Bouchet, A., Ligat, L., Lopez, F., et al. (2016). Nucleolin Promotes Heat Shock-Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 76, 4394–4405.
- Morgado-Palacin, L., Varette, G., Llanos, S., Gómez-López, G., Martinez, D., and Serrano, M. (2015). Partial Loss of Rpl11 in Adult Mice Recapitulates Diamond-Blackfan Anemia and Promotes Lymphomagenesis. *Cell Rep.* 13, 712–722.
- Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G., and Hirose, T. (2011). Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J. Cell Biol.* 193, 31–39.
- Nanbru, C., Lafon, I., Audigier, S., Gensac, M.C., Vagner, S., Huez, G., and Prats, A.C. (1997). Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* 272, 32061–32066.
- Nanbru, C., Prats, A.C., Droogmans, L., Defrance, P., Huez, G., and Kruys, V. (2001). Translation of the human c-myc P0 tricistronic mRNA involves two independent internal ribosome entry sites. *Oncogene* 20, 4270–4280.
- Passon, D.M., Lee, M., Rackham, O., Stanley, W.A., Sadowska, A., Filipovska, A., Fox, A.H., and Bond, C.S. (2012). Structure of the heterodimer of human NONO and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 4846–4850.
- Peddigari, S., Li, P.W.-L., Rabe, J.L., and Martin, S.L. (2013). hnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 41, 575–585.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.
- Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S.M., Bennett, C.F., Zhang, M.Q., and Spector, D.L. (2005). Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123, 249–263.
- Prats, A.C., Van den Berghe, L., Rayssac, A., Ainaoui, N., Morfoisse, F., Pujol, F., Legonidec, S., Bikfalvi, A., Prats, H., Pyronnet, S., et al. (2013). CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvasc. Res.* 89, 25–33.
- Prats, A.-C., Hantelys, F., Godet, A.-C., Tatin, F., Renaud-Gabardos, E., Pujol, F., Ader, I., Ligat, L., Henras, A., Lacazette, E., et al. (2018). Vasohibin1, a new IRES trans-acting factor for sequential induction of angiogenic factors in hypoxia. *BioRxiv*.

- Sharathchandra, A., Lal, R., Khan, D., and Das, S. (2012). Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol.* 9, 1429–1439.
- Shen, W., Liang, X.-H., Sun, H., De Hoyos, C.L., and Crooke, S.T. (2017). Depletion of NEAT1 lncRNA attenuates nucleolar stress by releasing sequestered P54nrb and PSF to facilitate c-Myc translation. *PLoS One* 12, e0173494.
- Shi, Y., Yang, Y., Hoang, B., Bardeleben, C., Holmes, B., Gera, J., and Lichtenstein, A. (2016). Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene* 35, 1015–1024.
- Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K.M., Genuth, N.R., Röst, H.L., Teruel, M.N., and Barna, M. (2017). Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* 67, 71–83.e7.
- Stoneley, M., Chappell, S.A., Jopling, C.L., Dickens, M., MacFarlane, M., and Willis, A.E. (2000). c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1162–1169.
- Sunwoo, H., Dinger, M.E., Wilusz, J.E., Amaral, P.P., Mattick, J.S., and Spector, D.L. (2009). MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* 19, 347–359.
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., and Kastan, M.B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123, 49–63.
- Tatin, F., Renaud-Gabardos, E., Godet, A.-C., Hantelys, F., Pujol, F., Morfoisse, F., Calise, D., Viars, F., Valet, P., Masri, B., et al. (2017). Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction. *JCI Insight* 2.
- Vagner, S., Gensac, M.C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., and Prats, A.C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 35–44.
- Wilusz, J.E., JnBaptiste, C.K., Lu, L.Y., Kuhn, C.-D., Joshua-Tor, L., and Sharp, P.A. (2012). A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev.* 26, 2392–2407.
- Yang, C., Li, Z., Li, Y., Xu, R., Wang, Y., Tian, Y., and 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.
- Yang, Y., Wang, C., Zhao, K., Zhang, G., Wang, D., and Mei, Y. (2018). TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. *Cell Death Dis.* 9, 886.

Chapitre III : Etude de l'expression du long ARN non-codant Neat1 et de la régulation de la traduction IRES-dépendante de FGF1 lors de l'hypoxie tumorale

Le chapitre précédent nous a permis de découvrir que Neat1 était un facteur clé de la régulation de la traduction dans les cardiomyocytes. Avec p54^{nrb} et PSPC1, deux autres composants du paraspeckle, il permet une traduction indépendante de la coiffe par le mécanisme utilisant les IRES. Les IRES des facteurs de croissance des fibroblastes FGF1 et FGF2, les facteurs de croissances de l'endothélium vasculaire VEGFAa, VEGFAb, VEGFC et VEGFD, et le cardioprotecteur IGF1R (Insuline-like growth factor receptor) ainsi que l'IRES du proto-oncogène c-myc sont tous induits lors de l'hypoxie précoce dans les cardiomyocytes et contrôlé fortement par le long ARN non-codant Neat1. L'IRES viral EMCV n'est pas impacté par la déplétion de ces trois facteurs.

La synthèse de facteurs de croissance angiogéniques et lymphangiogéniques lors du remodelage du cœur ischémique est bénéfique. Aussi Neat1 est une cible thérapeutique privilégiée pour amplifier cette réponse au stress passant par les IRES. Dans le cancer, à l'inverse, la tumeur a besoin d'utiliser et de façonner les vaisseaux sanguins et lymphatiques du micro-environnement pour se développer et disséminer de façon métastatique. Ce processus est favorisé par l'hypoxie ambiante qui active notamment la traduction IRES-dépendante¹⁴⁷. La question qui se pose alors est : Neat1 agit-il également en tant qu'ITAF des IRES des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques dans l'hypoxie tumorale ?

Pour répondre à cette question, dans ce troisième chapitre, nous avons investigué l'expression de Neat1 et de son isoforme Neat1_2 dans les cellules de carcinome mammaire murin métastatique et non-métastatique 4T1 et 67NR. Nous avons également étudié l'activité de notre modèle, l'IRES du FGF1, dans ces cellules en hypoxie chimique et physiologique. Enfin, nous avons mis au point un système d'interférence ARN à l'aide d'un micro ARN artificiel exprimé par lentivecteur pour éteindre le long ARN non-codant Neat1. Nous avons enfin mesuré l'impact de la déplétion de Neat1 avec cet outil sur la traduction IRES-dépendante de FGF1. Cette étude nous a permis de révéler que Neat1 contrôle la traduction IRES-dépendante dans les cellules de carcinome mammaire, suggérant que le mécanisme décrypté dans les cardiomyocytes s'étend aux cellules tumorales. Le rôle du paraspeckle en tant que plateforme d'assemblage de l'IRESome et le rôle-clé de Neat1 dans la régulation de la traduction pourraient donc constituer un mécanisme général de la réponse au stress.

Résultats

1. Neat1 est induit en hypoxie dans les cellules de carcinome mammaire

Nous avons tout d'abord mesuré l'expression de Neat1 en réponse à l'hypoxie dans deux lignées cellulaires cancéreuses, 67NR (carcinome mammaire non métastatique), et 4T1 (carcinome mammaire métastatique). Ces lignées murines présentent l'avantage d'être des modèles tumoraux syngéniques, c'est à dire qu'elles peuvent être injectées à des souris immunocompétentes pour analyser la progression tumorale dans la perspective de poursuivre l'étude *in vivo*. Choudry *et al.* ont démontré une induction de Neat1 après 24 h d'hypoxie dans des cellules de tumeur mammaire humaine MCF7³³⁰. Nous avons cherché à vérifier cette induction, ainsi qu'à étudier l'expression de Neat1 à des temps plus précoces, en hypoxie physiologique (chambre à hypoxie à 1% d'O₂) et en hypoxie chimique (100µM de chlorure de CoCl₂) comme contrôle. Des échantillons ont été collectés à différents temps d'hypoxie : 4 h, 8 h et 24 h. Les ARN ont été extraits des lignées 67NR et 4T1. Les ARN totaux ont été amplifiés et quantifiés par RT-qPCR (rétrotranscription associée à une PCR quantitative) pour l'étude de l'expression du lncARN Neat1. Neat1 présente deux isoformes : Neat1_1 qui est polyadénylé et Neat1_2 qui possède une triple hélice en 3'. Neat1_1 et Neat1_2 partagent une partie de leur séquence, Neat1_1 étant compris dans le 5' de Neat1_2. Deux couples d'amorces ont été dessinés : un premier couple spécifique de la région commune aux deux isoformes, et un deuxième couple spécifique du grand variant Neat1_2. Etant donné que la reverse-transcription est réalisée avec des oligonucléotides aléatoires, le premier couple permet de quantifier les deux isoformes alors que le second permet de quantifier Neat1_2. Pour étudier l'expression du petit variant Neat1_1, il est nécessaire d'effectuer une RT-PCR avec des oligod(T) -rétrotranscrivant les ARN polyadénylés en ADNc- avant la qPCR avec le premier couple d'amorce, ce qui permet de le différencier de Neat1_2.

L'expression de Neat1 et de son isoforme Neat1_2 a été étudiée dans les lignées 67NR et 4T1, à 4 h, 8 h et 24 h d'hypoxie en chambre ainsi qu'en hypoxie chimique. L'expression de l'ARN à chaque temps d'hypoxie a été normalisée par rapport à l'expression correspondante en normoxie. Dans les cellules 67NR, issues d'une tumeur mammaire non métastatique, on observe une induction de Neat1/Neat1_2 à 4 h d'hypoxie pour les deux traitements, de 1,2 à 13 fois (**Figure 1 A, B**). L'induction en hypoxie chimique est plus forte que l'induction à 1% d'O₂. À 8 h pour les deux traitements, on observe une absence d'induction de Neat1. Enfin à 24 h, Neat1 est faiblement induit avec les deux traitements, tandis que Neat1_2 est très fortement induit en hypoxie à 1% d'O₂ (160 fois plus qu'en normoxie). On constate par hybridation *in situ* que Neat1 est déjà fortement présent dans la lignée cellulaire en normoxie (**Figure 1 C**) et de façon hétérogène selon les cellules.

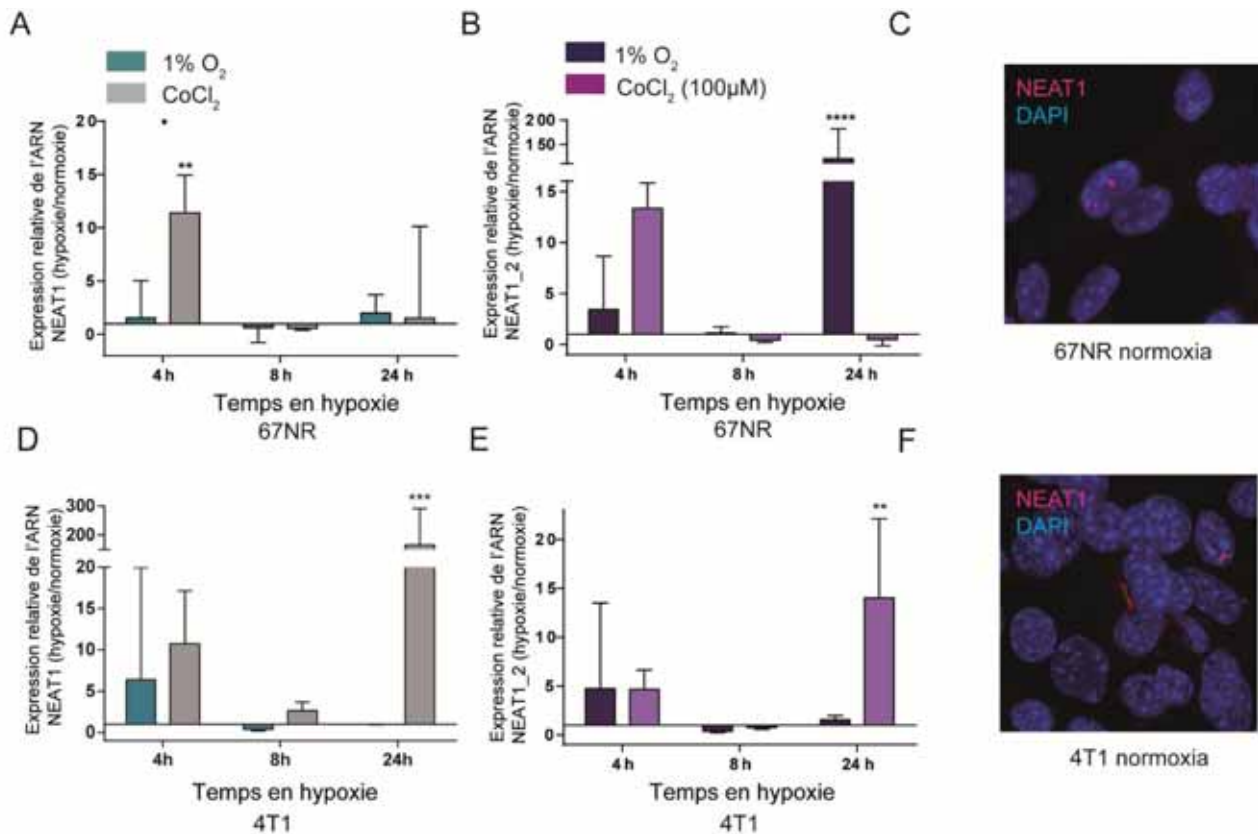


Figure 1. Neat1 est induit en hypoxie dans les carcinomes mammaires 67NR et 4T1.

A Niveau d'expression de Neat1 ou **B** Neat1_2 (Rq) dans les cellules 67NR et **D** et **E** 4T1 à 4 h, 8 h et 24 h en hypoxie à 1% d'O₂ ou hypoxie chimique (CoCl₂ 100μM). Quantification par qPCR des ADNc, comparaison au 18S et normalisation sur le Rq en normoxie. Les histogrammes représentent la moyenne géométrique et l'écart-type. L'analyse statistique Two-way ANOVA a été effectuée avec test de comparaison multiple de Dunnett : normoxie vs hypoxie pour chaque temps (*p<0,05 ; **p<0,005 ; ***p<0,0005 ; ****p<0,0001 ; n=2-3). Expérience d'hybridation in situ (FISH) pour marquer Neat1 (cy3) et le noyau des cellules (DAPI) de cellules 67NR **D** et 4T1 **E**. Les cellules ont été cultivées en normoxie sur des lamelles coatées avec de la gélatine 1%.

Dans la lignée métastatique 4T1 issues de la même tumeur que la lignée 67NR, (**Figure 1 D, E**), on observe une augmentation de l'expression de Neat1 et Neat1_2 de cinq à dix fois par rapport à la normoxie à 4 h pour les deux traitements. Cependant elle n'est pas statistiquement significative. L'expression ne varie pas à 8 h, tout comme pour la lignée 67NR. Enfin, à 24 h en hypoxie chimique, on observe une très forte induction de Neat1_2/Neat1, de 15 fois à 150 fois par rapport à la normoxie. Pour 24 h d'hypoxie en chambre, il n'y a pas, ou une très faible, induction de Neat1. Même si ces résultats demandent à être reproduits pour vérifier si cette différence entre les deux méthodes d'hypoxie est effective ou seulement artéfactuelle, ces données nous suggèrent que Neat1 est induit lors de l'hypoxie dans les cellules 4T1 et qu'il y a deux phases d'induction, l'une à 4 h et l'autre à 24 h.

Ces premiers résultats, bien que devant être confirmés par de nouvelles cinétiques suggèrent que l'hypoxie induit Neat1, et plus particulièrement l'isoforme Neat1_2, dans les deux lignées étudiées.

Cependant il se dégage des particularités propres à chaque lignée, sans doute liées à des différences de sensibilité à l'hypoxie. L'induction est effective à 24 h dans les cellules 4T1, et aux deux temps dans les cellules 67NR. De plus, les cinétiques font apparaître notamment dans les cellules 67NR deux événements d'induction discontinus, étant donné qu'aucune variation significative de l'expression de Neat1 n'est observée à 8 h.

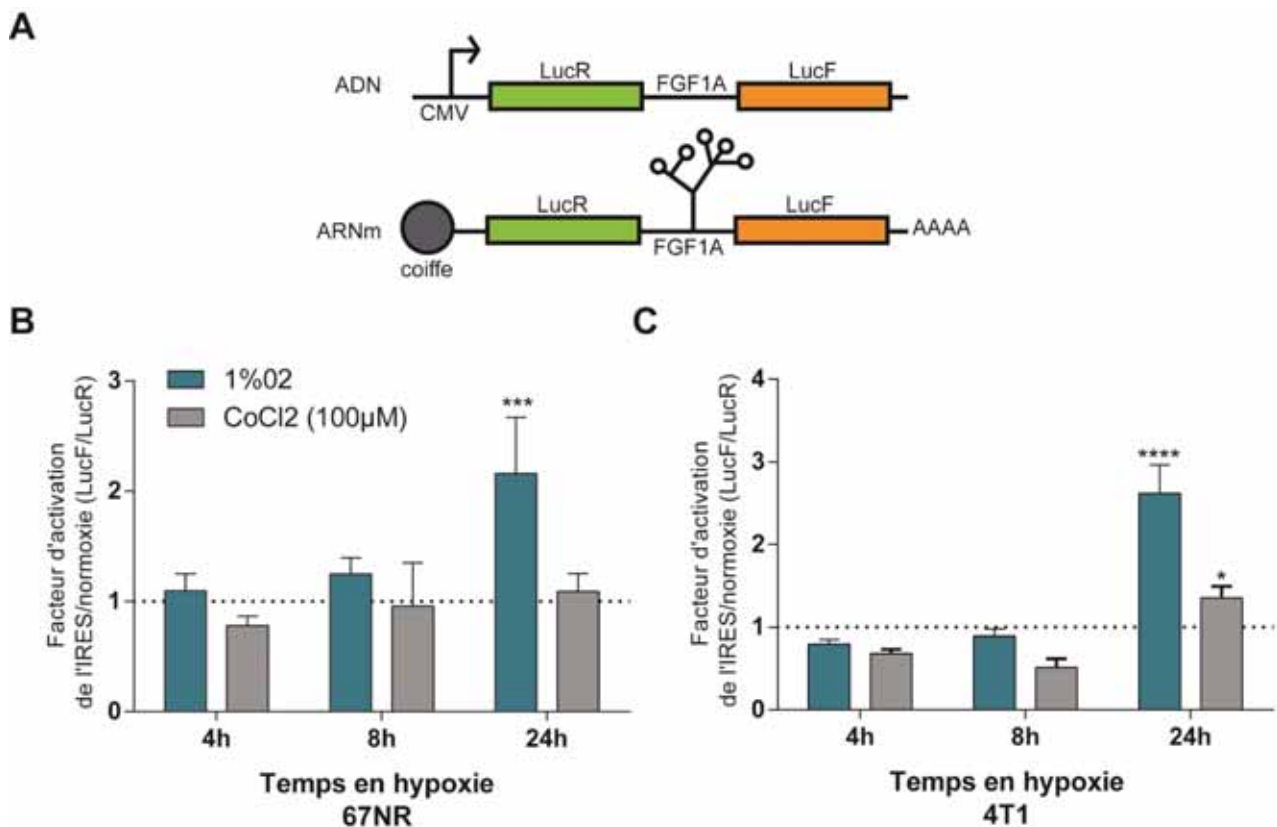


Figure 2. L'IRES du FGF1 est activé en hypoxie tardive dans le carcinome mammaire

A Rapporteur bicistronique « Lucky-Luke ». Cassette sous contrôle du promoteur viral CMV ; **B** Activité de l'IRES du FGF1 dans les cellules 67NR **B** ou 4T1 **C** à 1% d'O₂ ou traitées au CoCl₂ (100µM), transduites par le lentivecteur bicistronique « CRF1AL+ ». Ratio de luminescence LucF/LucR en hypoxie reporté sur le ratio en normoxie. Les histogrammes représentent la moyenne géométrique et l'écart-type. L'analyse statistique Two-way ANOVA a été effectuée avec test de comparaison multiple de Dunnett : normoxie vs hypoxie pour chaque temps (*p<0,05 ; **p<0,005 ; ***p<0,0005 ; ****p<0,0001 ; n=3)

2. L'IRES du FGF1 est activé après 24 h d'hypoxie dans les lignées tumorales 4T1 et 67NR

Afin de trouver les conditions permettant l'activation de l'IRES du FGF1 dans les lignées tumorales, nous avons utilisé un lentivecteur bicistronique exprimant deux gènes rapporteurs luciférase, validé au laboratoire (**Figure 2A**). Ce rapporteur « Lucky-Luke » est cloné sous contrôle du promoteur CMV. La cassette contient en premier cistron le gène de la luciférase Renilla traduit par le mécanisme classique dépendant de la coiffe, et en deuxième cistron celui de la luciférase Firefly sous contrôle de l'IRES étudié. L'activité de l'IRES est reflétée par le ratio de bioluminescence LucF/LucR, la traduction dépendante de la coiffe n'étant jamais totalement inhibée. L'utilisation d'un lentivecteur permet d'obtenir une insertion stable du transgène dans la cellule cible. Les lignées tumorales 4T1 et 67NR ont été transduites par ce lentivecteur « Lucky-Luke » et l'activité de l'IRES mesurée au luminomètre compteur de photons à double injecteur. Les **figure 2B et C** ont été obtenues en plaçant les cellules en chambre à hypoxie et avec un traitement au CoCl₂.

Pour la lignée 67NR, on constate que l'IRES du FGF1 n'est pas activé à 4 h d'hypoxie, ni à 8 h pour les deux traitements. C'est à 24 h et à 1% en O₂ qu'on peut observer une activité de l'IRES 2,2 fois plus importante que l'activité en normoxie (**Figure 2B**). L'hypoxie chimique n'a pas eu d'effet sur l'activité de l'IRES dans cette expérience. Dans les cellules 4T1, la même activité IRES est observée : activation d'un facteur 2,5 à 24 h à 1% d'O₂. L'hypoxie chimique révèle également une activation de l'IRES, plus modeste mais significative. (**Figure 2C**). L'expérience sera à renouveler pour confirmer les résultats obtenus. Ces données nous permettent de conclure que l'IRES du FGF1 est activé à 24 h d'hypoxie dans les lignées tumorales 67NR et 4T1, à 1% d'oxygène. Ces conditions d'activation ont été utilisées pour la suite du projet. En conclusion, cette étude de la régulation de l'IRES du FGF1 par l'hypoxie permet de dire que l'IRES est activé en hypoxie tardive dans les lignées 4T1 et 67NR. Ces résultats font émerger une corrélation possible entre l'induction de l'ARN non codant Neat1 (plus particulièrement Neat1_2) et l'activation de l'IRES à 24 h dans les lignées tumorales 67NR et 4T1 qui semblent plus résistantes à l'hypoxie que les cardiomyocytes HL-1.

3. Etude de l'effet de l'inactivation de Neat1 sur l'activité de l'IRES

Le concept du miARN artificiel

Afin d'établir un lien direct entre l'activation de l'IRES et l'induction de Neat1 en hypoxie, nous avons développé un outil permettant de procéder à l'inactivation de Neat1 par interférence ARN. En

effet, si Neat1 est impliqué dans la régulation de l'IRES, son extinction devrait résulter en une diminution de l'activité. L'effet des siARN étant transitoire, leur utilisation ne convient pas si l'on cherche une expression sur le long terme. De plus, certains types cellulaires sont difficiles à transfecter et par conséquent le knockdown devient moins efficace. L'utilisation des shARN (small-hairpin ARN) est également possible : l'expression est permanente car ils peuvent être délivrés dans la cellule au moyen de vecteurs lentiviraux. Cependant, un promoteur de la polymérase III (U6, H1) est utilisé la plupart du temps ce qui produit les shARN à un haut niveau. L'expression en est moins bien contrôlée spatialement³³¹. De plus, une trop forte expression du shARN peut induire une saturation du complexe RISC, des difficultés pour la cellule à prendre en charge la maturation du shARN^{332,333} alors que ces mêmes shARN insérés dans un squelette de miARN sont bien plus efficacement pris en charge³³⁴. Enfin, les shARN sont susceptibles d'induire une toxicité pour la cellule³³⁵.

Ainsi notre choix s'est porté sur l'utilisation de miARN artificiel, adapté du kit BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi de LifeTechnologies (invitrogen). Le système BLOCK-IT se base sur la séquence du miARN-155, produit de façon endogène chez la souris³³⁶, amélioré pour que le knockdown soit plus efficace (notamment en raccourcissant la boucle interne à deux nucléotides au lieu de 5). Les séquences 5' et 3' du transcrit miR-155 sont conservées afin de reconstituer la structure d'origine mais la partie centrale est remplacée par une séquence permettant de cibler l'ARNm d'intérêt (Cf. **figure 3A**). Le produit de transcription imite un pré-miARN et est pris en charge par la machinerie d'interférence à ARN : le miARN est exporté puis la boucle terminale clivée par Dicer et le brin fonctionnel (antisens) chargé avec Ago2 dans le complexe RISC qui ira éteindre le gène cible par clivage de l'ARNm, car le brin fonctionnel est conçu de sorte que l'hybridation ARNm/miARN soit complète. Ainsi l'effet de ce miARN artificiel sera équivalent à une invalidation par un siARN³³⁷.

Afin d'optimiser le knockdown nous avons conçu quatre séquences miR ciblant Neat1 (miR-G1-4) et quatre séquences miR ciblant Neat1_2 (miRG6-9). Ces 8 constructions ont été clonées avec succès et les lentivecteurs ont été produits (Cf. **Matériel et Méthode**). Nous avons choisi les cellules 67NR pour la transduction, celles-ci présentant la plus forte induction de Neat1_2 à 24 h d'hypoxie à 1% d'O₂, mais également une forte activation de l'IRES du FGF1 à ce même temps et dans ces mêmes conditions.

Invalidation de Neat1 dans les cellules 67NR

Les cellules 67NR ont été transduites par les quatre lentivecteurs miARN (G1-4), ciblant les deux isoformes de Neat1, pour maximiser les chances d'obtenir une extinction. Les résultats indiquent un knockdown (KD) de Neat1 (comparé à des cellules non-transduites) de respectivement : 64%, 72%, 68% et 66% pour les miR-G1/2/3/4 (**Figure 3A**). Compte-tenu de ces résultats et pour tenter d'obtenir

un KD de Neat1 plus important, des combinaisons de miARN ont été testées en co-transduisant deux et trois miARN : G2-4 et G2-3-4. Ces combinaisons ont permis un KD de respectivement 74% et 77% (**Figure 3B**). Une combinaison de deux autres miRNA ciblant Neat1_2 spécifiquement, miRG6+7, a également été utilisée avec succès (données non montrées). La stratégie des miARN artificiels (qui n'avait jamais encore été développée au laboratoire) ciblant Neat1 ou Neat1_2 insérés dans des lentivecteurs a été utilisée pour la poursuite de l'étude.

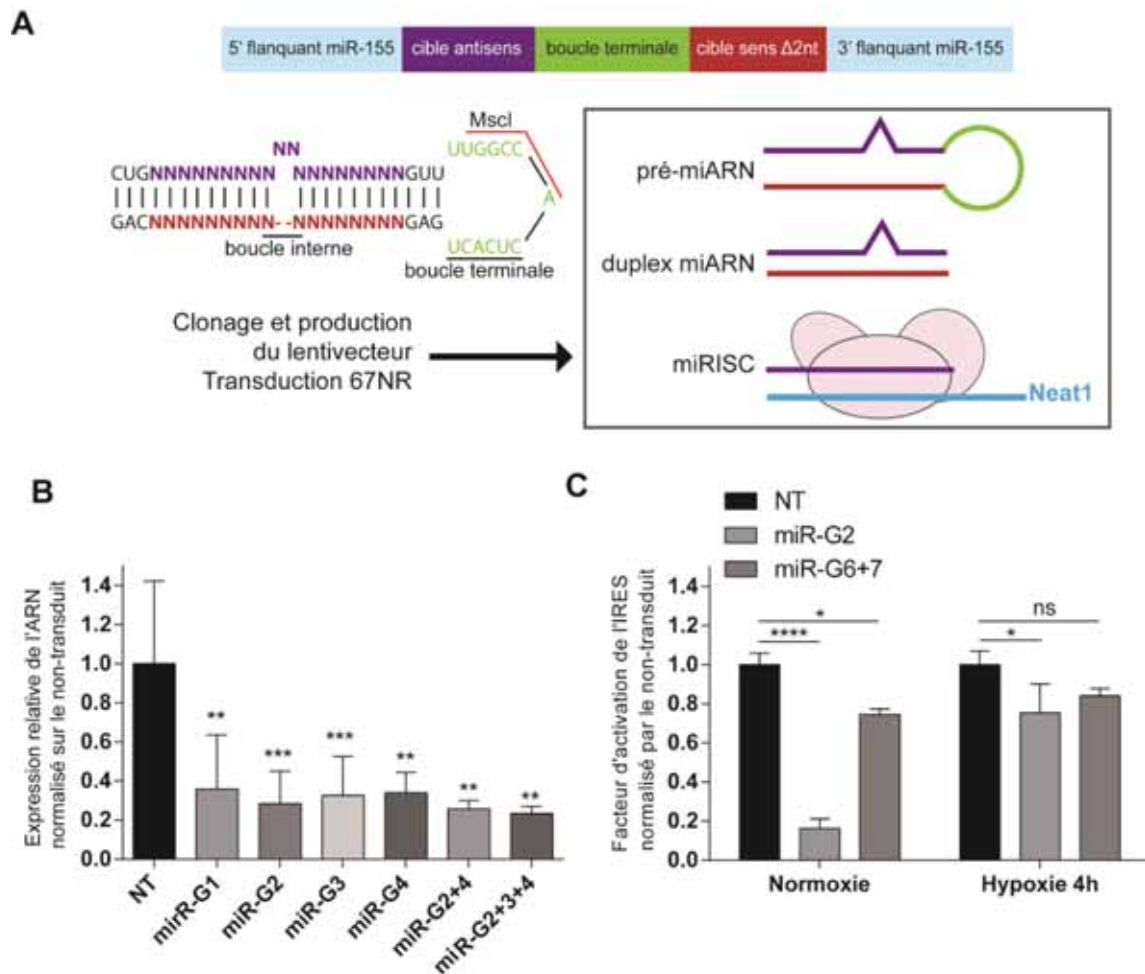


Figure 3. L'extinction de Neat1 entraîne une baisse de l'activité de l'IRES du FGF1 en normoxie et hypoxie

A Violet : séquence du miARN/siARN mature (adapté de BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits Manual). Construction insérée dans le vecteur pTRIP-CMV-MCS utilisé pour la production de lentivecteur. Dans le modèle cellulaire, transcription du pré-miARN, export et clivage : duplex de miARN, complexe RISC avec Ago2 et extinction de la cible. En parallèle les cellules 67NR ont été transduites par le lentivecteur GFP. Le dot pot résulte du taux de cellules GFP+ (en vert dans le cadre violet) : en abscisse l'intensité de fluorescence GFP, en ordonnée SSC (Side Scatter pour la granularité des cellules). **B** Niveau d'expression de Neat1 (Rq) dans les cellules 67NR transduites par les miARN G1-4, G2-4 et G2-3-4. Quantification par qPCR des ADNc, comparaison au 18S et normalisation sur le Rq non-transduit (NT). Les histogrammes représentent la moyenne géométrique et l'écart-type. L'analyse statistique utilisée est One-way ANOVA avec le test de comparaison multiple de Dunnett : NT vs miR pour chaque combinaison (**p<0,005 ; ***p<0,0005 n=2-6). **C** Activité de l'IRES A du FGF1 en normoxie et à 24 h d'hypoxie à 1% d'O₂ dans les lignées 67NR,

67NR-mirG2, 67NR-miR-6+7, transduites par le lentivecteur bicistronique « CRF1AL+ ». Les histogrammes représentent la moyenne géométrique et l'écart-type du ratio la luminescence LucF/LucR en hypoxie reporté sur le ratio NT en normoxie. L'analyse statistique utilisée est le Two-way ANOVA, avec le test de comparaison multiple de Sidak (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ et ns : non significatif; $n = 2-3$).

L'extinction de Neat1 provoque une baisse de l'activité de l'IRES du FGF1

Les cellules 67NR contrôle (NT) ou transduites par LV-miR-G2 ou une co-transduction par LVmiRG6 + LV miRG7 ont été de nouveau transduites par le lentivecteur rapporteur bicistronique Lucky Luke puis après 48 h ont été placées ou non 24 h en hypoxie à 1% d'O₂. L'activité de l'IRES de FGF1 a été mesurée au luminomètre en parallèle d'une RT-qPCR pour vérifier l'invalidation de Neat1.

En normoxie, les cellules transduites par le LV-miR-G2 ont une activité IRES fortement diminuée (**Figure 3C**), de 25% en hypoxie, à plus de 80% de baisse en normoxie. La transduction des cellules par le LV-miR-G6-7 en revanche engendre une modeste baisse de son activité, de 10% (non-significative) à 25% selon les conditions (**Figure 3C**).

On constate ici que l'inhibition de Neat1 et Neat1_2 a un effet variable en normoxie et hypoxie sur l'activité de l'IRES du FGF1. Cependant ces premières données sont encourageantes : si Neat1 est requis pour que l'IRES soit activé, cela renforce notre hypothèse que Neat1 pourrait être un facteur transactivateur (ITAF) de l'IRES du facteur angiogénique FGF1 dans les cellules cancéreuses.

Conclusion et discussion

Durant ce projet nous avons cherché à comprendre le rôle de Neat1 dans l'initiation de la traduction IRES-dépendante lors du stress hypoxique. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de Neat1 dans des lignées cellulaires modélisant l'hypoxie tumorale. Les deux lignées cellulaires étudiées présentent une induction de Neat1 en hypoxie. Une cinétique hypoxique nous a permis de mettre en évidence le profil d'expression de Neat1 : dans les cellules de cancer du sein métastatique ou non (4T1, 67NR), on observe deux phases d'induction de Neat1 à 4 h et 24 h d'hypoxie. L'induction de Neat1 en hypoxie se fait de manière HIF-dépendante, plus particulièrement grâce à l'isoforme HIF2- mécanisme plus rarement répandu que la régulation de la transcription par HIF1³³⁰. Il serait intéressant de voir si d'autres gènes cibles de HIF2 sont induits à ces mêmes temps dans ces lignées.

De plus dans cette étude nous faisons un comparatif de l'hypoxie chimique, induite par le chlorure de cobalt et de l'hypoxie physiologique sur l'expression de Neat1 et l'activité de l'IRES du FGF1. Ces deux hypoxies sont différentes : l'hypoxie induite par CoCl₂ ne concerne que la voie HIF, alors que l'hypoxie physiologique agit à différents niveaux. L'hypoxie chimique ne résume donc pas tous les

aspects de l'hypoxie physiologique. Le cobalt interagit avec l'ODD (*oxygen-dependent degradation domain*) de HIF en inhibant son hydroxylation et son interaction avec pVHL (Cf. [Introduction I.1.1](#))³³⁸. Ainsi HIF α (aussi bien le 1 que le 2) est stabilisé en hypoxie au lieu d'être dégradé. Neat1 est une cible de HIF2, l'hypoxie chimique tout comme l'hypoxie physiologique sont donc susceptible d'induire sa transcription. De façon intéressante, on remarque que les deux lignées cellulaires, 67NR et 4T1, ne réagissent pas de la même façon aux deux traitements : à 24 h dans les 4T1, Neat1 et Neat1_2 sont induit par le CoCl₂ alors que l'induction de Neat1_2 à ce même temps dans les 67NR est due à l'hypoxie physiologique. Bien que ces résultats doivent être reproduits, on voit ici que les deux lignées ont un comportement différents dans l'induction de la transcription de Neat1 en fonction du stress appliqué.

Nous avons également mis en évidence que l'IRES du FGF1 est activé à 24 h dans les 4T1 et 67NR. Dans les cardiomyocytes HL-1, observés dans le [chapitre II](#), nous avons constaté que l'IRES du FGF1 était activé après seulement 4 h d'hypoxie. Les cellules tumorales étant plus résistantes à l'hypoxie que les cardiomyocytes, cela pourrait expliquer le délai d'activation observé. L'hypoxie chimique n'active ici pas ou très peu l'activité des IRES.

Nous avons par la suite mis en place et validé un système de microARN artificiels dirigés contre Neat1 : nous avons cloné et produit des lentivecteurs permettant l'expression de ces ARN interférents. Ainsi nous avons obtenu une extinction maximale du long ARNnc de 78%. En plus d'obtenir une expression stable, sur le long terme (du moment que la suppression du facteur cible n'induit pas un phénotype délétère pour la cellule auquel cas un promoteur inductible sera nécessaire), cette stratégie permet l'utilisation du lentivecteur-miARN dans le cas d'une étude *in vivo*.

Enfin, nous avons étudié l'effet du knockdown de Neat1 sur l'activité de l'IRES dans les conditions d'activations précédemment obtenues. Cette dernière expérience permet d'observer que l'extinction de Neat1 provoque une baisse de l'activité IRES comparé aux cellules non transduites pour le miR-Neat1 et les miR-Neat1_2 en normoxie et en hypoxie, malgré une variation dans l'efficacité d'interférence des miARN. Au vu de ces résultats, et sachant que Neat1 interagit directement avec p54^{nrb}³³⁹, que cette dernière interagit directement avec hnRNP-M²²⁷ et l'IRES¹⁷⁴, on peut en conclure que Neat1 joue un rôle d'ITAF dans les cellules 67NR pour l'IRES du FGF1, comme nous l'avons observé dans les cellules HL-1 dans le chapitre précédent.

Les effets de l'extinction de Neat1 sont cependant variables selon les miARN utilisés. En effet, les mirG2 ciblant les deux isoformes de Neat1 a globalement un effet plus fort que la combinaison des miRG6 et G7 visant Neat1_2 spécifiquement. Cette expérience nécessite d'être reproduite, mais ce résultat pourrait signifier que les deux isoformes de Neat1 ont leur importance dans la régulation de la traduction IRES-dépendante dans les cellules de carcinome mammaire. De plus le niveau d'extinction

de Neat1 et Neat1_2 par le miARN peut varier grandement selon les expériences et les taux de transduction des lentivecteurs (données non montrées) et le niveau d'inhibition de l'activité IRES également, probablement en corrélation. Cette variation peut venir du fait que les microARN sont pris en charge par le complexe RISC dans le cytoplasme de la cellule, et que le long ARN non-codant Neat1 en plus d'être abondant est décrit comme principalement nucléaire. Or l'activité des miARN est principalement cytoplasmique. Il serait intéressant de tester l'extinction de Neat1 par des gapmères LNA testés dans le [chapitre II](#) et qui n'étaient pas disponibles au laboratoire au moment de la présente étude. Cependant le miARN artificiel exprimé par un lentivecteur reste un outil de choix pour l'étude de l'expression d'ARN cytoplasmique³⁴⁰. Une baisse plus forte et reproductible dans l'intensité nous permettrait de conclure plus fermement sur le rôle de Neat1 en tant qu'ITAF de l'IRES du FGF1 dans les cellules cancéreuses.

Pour la suite du projet, le lien entre l'induction de Neat1 en hypoxie et la (lymph)angiogenèse pourra être investigué. Plusieurs études associent en effet l'induction de Neat1 avec un mauvais pronostic pour les patients atteint de cancer, notamment dans le carcinome du poumon à grandes cellules (NSCLC : non-small cell lung carcinoma)³⁴¹ ou dans le cancer du sein³³⁰. L'angiogenèse promeut le développement tumoral et la lymphangiogenèse la dissémination métastatique^{342,343}. Neat1, en tant que composant principal des paraspeckles et en tant qu'activateur de la traduction de facteurs lymphangiogéniques en hypoxie, constituerait une cible de choix pour une thérapie anticancéreuse.

Matériel et méthode

Culture cellulaire

Les cellules HL-1 (lignée de cardiomyocytes murins) ont été cultivées dans du milieu Claycomb complet (10% de sérum de veau fœtal, 100 µM de norépinéphrine, 2 mM de L-glutamine et pénicilline/streptomycine à 100ug /mL) dans une atmosphère contrôlée à 20% d'oxygène/5% de CO₂ à 37°C. Les lignées cancéreuses 4T1 (carcinome mammaire murin) et 67NR (carcinome mammaire murin métastatique) ont été respectivement cultivées dans du milieu DMEM glutaMax et RPMI 1640 complet (10% de sérum, pénicilline/streptomycine à 100µg /mL, L-glutamine en plus pour RPMI).

Hybridation in situ et imagerie

Les cellules HL-1 ont été cultivées sur une lamelle de verre coatée à la gélatine 1%. Puis les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde à 4% (electron microscopy science), rincées deux fois au PBS et perméabilisées sur la nuit avec 70% d'ETOH à 4°C. Les sondes de FISH ont été achetées et produites par Sigma-Aldrich, reçues purifiées HPLC à 0.05µmol. Les trois sondes utilisées par cible

(Neat1) font entre 38-40 nt de long et sont conjuguées à une Cy3 via une modification de l'acide amine en 5'. La réaction d'hybridation a été réalisée sur la nuit à 37°C puis la lamelle a été rincée deux fois dans un mélange 1X SSC 15% formamide et une fois dans du SSC 1X avant montage sur du mowiol supplémenté avec du DAPI. Les images ont été acquises sur un microscope "widefield" à fluorescence Olympus avec le logiciel MetaMorph.

Transduction par le lentivecteur bicistronique

Les cellules HL-1 ont été transduites par le lentivecteur bicistronique « Lucky-luke » CRF1AL+, disponible au laboratoire, contenant le gène LucR de la luciférase Renilla sous le contrôle du promoteur CMV et du gène Luc+ de la luciférase Firefly sous contrôle de l'IRES du FGF1. Les cellules HL-1 en plaque 6 puits ont été transduites par le lentivecteur à une concentration de 8.10^5 TU/mL dans du milieu de transduction OptiMEM contenant 5 µg/mL de protamine sulfate. L'efficacité de transduction a été mesurée en parallèle par analyse FACS (BD FACSVerse™) de cellules transduites par le lentivecteur GFP.

Etude de l'activité de l'IRES par mesure de la luminescence

Les cellules transduites sur la nuit ont été incubées dans un milieu « préconditionné » en hypoxie ou dans du milieu contenant 100 µM/300 µM de CoCl₂ et ont été récoltées pour la cinétique d'activation de l'IRES (4 h, 5h, 6h, 7h, 8 h, 24 h). Les cellules préalablement lavées au PBS ont été lysées dans du Passive Lysis Buffer (Dual-Luciferase® Reporter Assay System Promega) puis réparties en triplicats dans une plaque 96 puits pour la lecture au luminomètre.

Analyse des ARN

Les ARN totaux des cellules HL-1 ont été extraits avec le kit GeneJet RNA purification de ThermoScientific, et les ARN des cellules 4T1/67NR ont été extraits par la méthode Trizol/Chloroforme. Ils ont ensuite été dilués à 500ng/µL pour être rétrotranscrits en ADNc avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Les ADNc obtenus ont été dilués au 1/10^e. L'expression du gène d'intérêt (Neat1) a été étudiée par PCR quantitative avec le mix 5 x HOT Pol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (avec ROX), sur une machine StepOne™ ou ViiA™ 7 (Applied Biosystems®). Chaque réaction a été effectuée avec le gène 18S comme référence.

Construction des vecteurs

Les lentivecteurs pTRIP-CMV-miRNA-G1/9 ont été clonés à partir d'oligonucléotides doubles-brins (Sigma-Aldrich) possédant des extrémités collantes BamHI et SalI. Ceux-ci ont été obtenus à partir d'oligonucléotides simples brins complémentaires qui ont été phosphorylés dans 2 µL de T4

DNA ligase buffer (Promega) en présence de 10U de polynucléotide kinase T4 (ThermoScientific) puis ont ensuite été appariés en chauffant 3 minutes à 95°C et en laissant refroidir lentement. Les fragments d'ADN double-brin ainsi générés ont été insérés dans un vecteur pTRIP linéarisé par les sites de restrictions BamHI, Sall et PvuI pour une ligation trimoléculaire. Les vecteurs ont été amplifiés avec le kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit (BioBasic, Canada) et EZ-500 Spin Column Endotoxin-Free Plasmid DNA Maxi-Preps Kit pour les vecteurs pTRIP destinés à la production de lentivecteurs.

Construction des miARN artificiels et production de lentivecteurs

Des miARN artificiels ont été construits, dérivés de la séquence du miR-155 utilisée dans le kit BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector de LifeTechnology. La séquence cible du miARN (21 nucléotides) a été déléetée de 2 nucléotides (11e et 12e) pour former le « bulge » de la boucle interne. La séquence ainsi créée a été clonée dans un vecteur pTRIP-CMV. Les lentivecteurs correspondant ont été produits grâce à la méthode de tri-transfection dans des cellules 293FT et avec les plasmides pLvPack et pLvVSVg (Sigma-Aldrich) comme décrit précédemment³⁴⁴. Le titre des lentivecteurs a été mesuré par un test de transduction effectué avec le lentivecteur GFP produit au même moment que les miARNs : dans une plaque 24 puits, des cellules HT1080 ont été transduites en concentrations décroissante (du 1/2 au 1/514^e dans du milieu OptiMEM additionné de 5µg/mL de protamine sulfate. Par la suite le titre a été déterminé par analyse de cytométrie en flux (BD FACSVerse).

Discussion

Ce travail de thèse aura contribué d'une part à apporter une meilleure compréhension de la régulation de l'expression des gènes (lymph)angiogéniques et de réponse au stress et d'autre part à élucider en partie la composition et la formation de l'IRESome des facteurs (lymph)angiogéniques dans les cardiomyocytes en hypoxie. De plus, les résultats obtenus nous permettent de redéfinir la notion d'ITAF.

Activation séquentielle : les ITAF ont-ils des IRES ?

Dans le **premier chapitre**, nous avons étudié l'expression et le recrutement dans les polysomes de 96 gènes liés à l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et la réponse au stress dans les cardiomyocytes en hypoxie par rapport à la normoxie. Nous avons constaté que mis à part les gènes cibles du facteur de transcription stabilisé en hypoxie, HIF (comme VEGFA, Angiopoïétine ou Apeline) la majorité des gènes étudiés ne montrent que peu de régulation en hypoxie, voire dans certains cas comme FGF2 et VEGFC, une inhibition. En revanche, à quelques rares exceptions près, la majorité de ces gènes est activée au niveau traductionnel, c'est à dire qu'ils sont recrutés dans les polysomes et donc dans les ARN interagissant avec les ribosomes et en cours de traduction. De façon intéressante, plusieurs des gènes étudiés portent des séquences dont l'activité IRES a été identifiée. C'est le cas des facteurs de croissance des fibroblastes FGF1 et FGF2 et des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire VEGFA (portant deux IRES, a et b), VEGFC et VEGFD, mais aussi le récepteur du facteur de croissance insulin-like IGF1R. De nombreux gènes induits ne présentent cependant pas de structure IRES identifiée, tel que SerpinF1.

On peut se demander si l'ARNm de la vasohibine 1 (VASH-1) identifiée en tant qu'ITAF de l'IRES du FGF1 ne posséderait pas aussi un IRES. En effet comme nous l'avons constaté dans le **chapitre I**, l'expression de cet ARNm baisse à 4 h d'hypoxie - ce qui peut être le cas en signe de forte traduction, alors que sa présence dans les polysomes augmente. De plus, le niveau d'expression de la protéine augmente en hypoxie. L'expression de VASH-1 est donc régulée au niveau traductionnel. Il a été décrit que HuR augmente l'expression protéique de VASH1 dans les cellules endothéliales (HUVEC) sans modifier le niveau de l'ARNm. Or, HuR se lie au 3'UTR de VASH1 via un élément ARE, ce qui stabilise l'ARNm et augmente sa traduction^{345,346}. On peut cependant faire l'hypothèse que VASH1 posséderait un IRES, et que HuR agirait en tant qu'ITAF de cet IRES. Un tel mécanisme permettrait de répondre en boucle à un stress afin d'augmenter la réponse cellulaire de manière séquentielle : l'ITAF serait synthétisé *via* la traduction IRES-dépendante, et irait à son tour activer son ou ses IRES cible.

Cette régulation pourrait engendrer des phases d'activation séquentielle d'IRES en réponse au stress. Or, nous avons également constaté dans le **chapitre I** que les IRES des facteurs

(lymph)angiogéniques étudiés sont activés lors de l'hypoxie précoce dans les cardiomyocytes (4 h-8 h) alors que la traduction IRES-dépendante du proto-oncogène c-myc et de l'IRES viral EMCV n'ont lieu qu'en hypoxie plus tardive (24 h). p54^{nrb} a été identifié comme ITAF de FGF1 en hypoxie, tout comme PSPC1 (**chapitre II**). Or, les ARNm de ces deux ITAF sont recrutés dans les polysomes en hypoxie précoce, indiquant que leur traduction est activée tout comme celle de l'ARNm de VASH-1. C'est également le cas d'autres ITAF : hnRNPM pour l'IRES de FGF1, PSF/SFPQ pour les IRES de P53, c-l-n-myc, BAG1, LEF1. Leurs ARNm porteraient-ils eux aussi un IRES ? Il serait intéressant de voir si ce type d'activation séquentielle des IRES s'applique à d'autres gènes en réponse à un stress.

Ischémie et hypoxie tumorale dans la traduction IRES

L'ensemble des IRES des facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques décrits plus hauts est activé par l'hypoxie non-tumorale pour promouvoir la synthèse protéique durant l'ischémie, ou par l'hypoxie tumorale, à l'exception VEGFD qui n'est pas activé par l'hypoxie mais par le choc thermique dans les cellules tumorales. La différence d'activité de l'IRES VEGFD selon les types cellulaires peut s'expliquer par une différence de nature ou de disponibilité des ITAF selon les cellules étudiées¹⁴⁵. On a pu observer que l'hypoxie dans les cellules tumorales ou cardiaques entraîne une activation des IRES étudiés à des temps différents. Les cardiomyocytes HL-1 arborent une activation des IRES plus précoce que les carcinomes mammaires 4T1 et 67NR en ce qui concerne l'IRES du FGF1 notamment, et l'IRES du VEGFC dans les HL-1 comparé aux 4T1. De plus, le long ARN non-codant Neat1_2 est induit à différents temps d'hypoxie dans ces lignées : dès 4 h d'hypoxie dans les HL-1, et dans les 4T1 et 67NR une activation modérée à 4 h puis très forte à 24 h d'hypoxie est constatée. Cette différence de cinétique peut s'expliquer par le fait que les cellules cancéreuses, de par leur nature, sont plus résistantes à l'hypoxie.

Le modèle du rapporteur bicistronique

Recherche d'un meilleur contrôle des promoteurs et sites d'épissages cryptiques dans les séquences IRES

Bien qu'imparfait, à ce jour, le meilleur outil pour l'identification d'une activité IRES dans un fragment d'ARN est de l'insérer entre deux gènes rapporteurs et de regarder l'expression de chacun des cistrons afin d'en faire un ratio. Des promoteurs cryptiques et/ou sites d'épissages cryptiques peuvent aussi entrer en compte, argument principal des détracteurs des IRES cellulaires dont l'existence a longtemps été questionnée. Aussi des contrôles sont nécessaires afin de vérifier que l'ARN est présent en un seul transcrit et pas deux, résultant d'un événement transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

Dans le cas de l'outil "Lucky-luke" développé au laboratoire, les sites donneurs d'épissage prédits de la luciférase *Renilla* placée en premier cistron ont été mutés, ce qui contrecarre un éventuel épissage cryptique. Cependant il est possible qu'un promoteur ou site d'épissage cryptique réside dans la séquence IRES étudiée. C'est pourquoi un contrôle très souvent effectué passe par l'établissement d'un ratio du premier cistron sur le second cistron quantifié par qPCR. Des amorces ciblant la LucR et la LucF, dans notre cas, sont utilisées pour amplifier les ADNc obtenus à partir de cellules transduites par le rapporteur bicistronique. Un ratio d'expression LucF/LucR est ensuite effectué en comparant avec un IRES dont la séquence a été démontrée comme ne possédant aucun promoteur ni site d'épissage cryptique, en l'occurrence EMCV. Si ce ratio est égal à 1, alors on considère que le bicistronique est bien constitué d'un seul bloc et que les deux Luc ne sont pas sur des ARN différents.

Cependant, un tel contrôle dépend de plusieurs paramètres comme l'efficacité de la transcription inverse, de celles des couples d'amorces de qPCR, et de ce fait il est nécessaire de comparer les Ct à un ARN bicistronique portant un IRES contrôle (en général EMCV). La précision de la technique de RT qPCR, ni d'ailleurs aucune des autres méthodes utilisées, est insuffisante pour être totalement certain qu'il n'y a pas d'ARN monocistronique. C'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point un contrôle plus précis de ce type d'évènement qui serait indépendant d'une comparaison avec un autre IRES. Pour cela, nous avons utilisé la technologie de droplet digital PCR (ddPCR), qui permet la détection d'évènements rares contrairement à la qPCR classique. La ddPCR permet de s'affranchir de la compétition qu'il peut y avoir pour la cible par rapport aux autres ADNc pour les réactifs et amorces, car les molécules d'ADNc sont réparties dans plusieurs milliers de gouttelettes différentes aux sein desquelles la réaction d'amplification a lieu en parallèle. Le fait que la répartition des molécules ne se fasse pas de manière uniforme n'est pas un problème, car le nombre de copies présentes dans l'échantillon est prédit selon la loi de poisson qui rectifie la distribution observée. La ddPCR permet aussi le marquage simultané de deux cibles dans le même puits (sondes FAM/HEX) à l'aide de deux canaux de fluorescence.

Nous avons donc cherché à mesurer la fluorescence produite par l'amplification de LucF par rapport à LucR sur un plasmide tout d'abord, puis à partir d'ADNc générés par rétrotranscription d'un ARN transcrit *in vitro* et enfin à partir d'ADNc de cellules transduites par le rapporteur bicistronique. Notre objectif était de détecter les molécules bicistroniques par amplification des deux ADNc dans une même gouttelette. Les résultats obtenus ont été joints en annexe. De manière surprenante, la ddPCR faite à partir de plasmide bicistronique n'aboutit pas une double détection dans toutes les gouttelettes contenant l'ADN. Le ratio LucF/LucR est bien égale à 1 mais 13 à 20% des gouttelettes ne présentent qu'un seul signal de fluorescence. Aucune dégradation de l'ADN n'ayant été détectée, cette observation suggère qu'il y a une compétition entre les deux couples d'amorces qui peut engendrer

l'amplification d'un seul des deux cistrons alors que les deux sont présents dans la gouttelette. Nous avons par ailleurs testé l'efficacité de la rétrotranscription (RT). Il s'avère que LucF est toujours moins efficacement rétrotranscrit que LucR. Avec de l'ARN bistronique transcrit *in vitro*, dont l'intégrité a été vérifiée, LucF ne génère que 65% des copies obtenus pour LucR. Quand on utilise des ARN totaux purifiés de cellules transduites, le pourcentage est de 75%. Ce résultat a été obtenu avec une construction bicistronique contenant l'IRES du FGF1 aussi bien qu'avec une construction contrôle contenant une hairpin, et donc dépourvue de promoteur ou de site d'épissage cryptique. Cette différence d'efficacité est probablement due à l'utilisation d'amorces aléatoires pour la reverse transcription, qui ne produit que peu de molécule bicistronique complète, la taille moyenne des ADNc étant aux alentours de 1000 nt, donc très inférieure à la taille de l'ARNm bicistronique. Aussi, un double signal (reflétant les molécules bicistroniques générées après la RT) a été mesuré avec un pourcentage de 53% (par rapport au total de gouttelettes) dans l'échantillon issu de la RT d'un ARN *in vitro*, mais seulement de 0.16% dans l'échantillon issu de cellules. Cette différence est probablement due à la plus grande dilution de la cible au sein des ARN totaux.

En conclusion, la ddPCR ne permet pas de détecter les deux cistrons d'un ARN bicistronique dans une même gouttelette pour au moins deux raisons : d'une part la ddPCR avec deux couples d'amorce ne permet pas d'identifier LucR et LucF dans chaque gouttelette même si le rapport global LucF/LucR est égal à 1 quand on utilise l'ADN bicistronique comme matrice, et d'autre part la reverse transcriptase présente des différences d'efficacité entre les deux cistrons, qui varient selon la dilution de la cible. Cependant, nos résultats ont permis de montrer la précision et la reproductibilité de la technologie pour un type d'échantillon, la ddPCR pourra donc être utilisée pour déterminer le ratio LucF/LucR par comparaison avec un ARN bicistronique contrôle (LucR-hairpin-LucF par exemple), comme c'était déjà le cas pour la RT qPCR, mais avec beaucoup plus de fiabilité.

La traduction est-elle indépendante de la coiffe ?

Pour montrer que la traduction est bien coiffe-indépendante, il est nécessaire d'isoler la séquence à tester dans un ARN bicistronique contenant un premier cistron sous le contrôle de la traduction coiffe-dépendante et résultant de l'activité du promoteur. Lors d'un stress comme l'hypoxie, la théorie veut que la traduction coiffe-dépendante soit inhibée, et donc la luminescence *Renilla* devrait logiquement baisser suite à la diminution de la traduction de la luciférase. Cependant cela ne se vérifie pas dans toutes les cellules étudiées. Dans les cardiomyocytes HL-1, ainsi que dans les lignées cancéreuses 67NR et 4T1, en réponse à l'hypoxie, nous avons observé que la LucR a un niveau d'expression variable. Parfois, elle ne diminue pas, elle peut rester stable ou même augmenter. L'absence d'inhibition l'expression de LucR peut s'expliquer par une grande stabilité de la protéine ou par le fait

que l'absence d'un 5' très structuré engendre une initiation de la traduction qui n'est que peu dépendante de la coiffe. En effet il a été montré que ce sont les ARNm porteurs de 5'UTR très structurés qui sont particulièrement dépendants d'eIF4E³⁴⁷. Une autre hypothèse est que le recrutement de l'ARNm bicistronique dans les polysomes permet de traduire le premier cistron. Un effet activateur de l'IRES sur la traduction du premier cistron d'un ARNm bicistronique a été observé précédemment^{169,348}. Le ratio LucF/LucR reste cependant le meilleur moyen de visualiser l'activité IRES grâce au rapporteur bicistronique. Dans le cas où le premier cistron varie beaucoup et ne reflète plus la quantité d'ARNm, il faut alors normaliser par rapport à la quantité d'ARNm.

L'inhibition de la traduction peut être mesurée en regardant le niveau de phosphorylation d'eIF2 α et de 4EBP1. Comme décrit en introduction ([II.2.2](#)), la phosphorylation d'eIF2 α fait partie de ce qu'on appelle Réponse Intégrée au Stress. Cette phosphorylation empêche l'interaction avec eIF2B et le recyclage de GDP en GTP et donc prévient de la formation du complexe ternaire. 4EBP en revanche est en état d'hypophosphorylation lorsque le complexe mTORC1 est inactivé. 4EBP1 peut alors interagir avec eIF4E et prévenir de la formation du complexe eIF4F qui permet la reconnaissance de la coiffe de l'ARN. Dans les cardiomyocytes HL-1, eIF2 α est fortement phosphorylé dès 4 h d'hypoxie ce qui signifie que la traduction globale est bien inhibée. En revanche l'état de phosphorylation de 4EBP1 ne varie pas : il est hypophosphorylé basalement en normoxie dans ces cellules. La réponse à l'hypoxie dans les cardiomyocytes HL-1 est donc indépendante de la voie mTOR.

Le couplage transcription-traduction dans la formation de l'IRESome

Le promoteur utilisé pour exprimer le transgène bicistronique peut, dans certains cas, changer l'intensité de l'activité IRES mesurée : c'est notre cas pour l'IRES du FGF1. En effet, mon équipe d'accueil a montré que l'IRES du FGF1 est activé par un mécanisme de couplage entre la transcription et la traduction dans les myoblastes en différenciation. L'hypothèse proposée est que les ITAF de cet IRES, hnRNPM et p54^{nrb}, se fixent au niveau du promoteur Fgf1 pour être ensuite chargés sur l'ARN en cours de transcription, et jouent leur rôle d'ITAF une fois que l'ARNm est exporté dans le cytoplasme. Ainsi lorsque le rapporteur bicistronique est exprimé par le promoteur natif, l'activité IRES est beaucoup plus forte qu'avec le promoteur viral constitutif CMV : elle passe de 14 avec le promoteur CMV à 548 avec le promoteur de FGF1¹⁷⁴. Dans les études du [chapitre I et II](#), nous avons choisi d'exprimer l'ARN à partir du promoteur viral CMV, notre but étant de dissocier les effets transcriptionnels des effets traductionnels, les autres IRES étudiés étant eux aussi exprimés grâce au promoteur CMV. Il serait cependant intéressant pour décrypter le mécanisme de pré-assemblage de l'IRESome dans le noyau d'étudier l'effet du promoteur natif. À quel moment les ITAF sont-ils recrutés au niveau de la structure IRES ? Ce qui est certain, c'est qu'un évènement nucléaire est nécessaire pour

que l'IRES soit activé. Les ARN bicistroniques portant les IRES de FGF1 et c-myc, transcrits *in vitro* et transfectés dans le cytoplasme de la cellule, ne montrent pas d'activité IRES, alors que les IRES viraux EMCV et HRV le sont dans ces conditions^{174,186}. Une transfection d'ADN permet en revanche aux IRES cellulaires d'être activés^{174,186}. On peut faire l'hypothèse qu'un passage dans le noyau est requis pour la liaison de certains ITAF à l'IRES. Est-ce que le couplage transcription-traduction pourrait-être un mécanisme applicable à d'autres gènes ? C'est en tout cas le cas du facteur d'élongation eEF1A1 de façon un peu différente, qui recrute un activateur transcriptionnel de HSP70, se lie à la polymérase II en cours d'élongation et sur le 3'UTR de l'ARNm, puis le stabilise et facilite son export aux ribosomes actifs dans le cytoplasme³⁴⁹. De nombreux ITAF connus, principalement de la famille des hnRNP et donc liés à l'épissage, pourraient potentiellement se lier à l'ARN en cours de maturation avant l'export de l'IRESome (Cf. [Annexe I](#))¹³⁴.

Quel mécanisme d'action pour Neat1 dans la traduction IRES-dépendante ?

Neat1 est-il exporté dans le cytoplasme ?

Le couplage transcription-traduction est une hypothèse de mécanisme intéressante qui s'est avérée vraie pour FGF1, mais une autre explication potentielle émerge des données obtenues lors de ce travail de thèse. Les résultats présentés dans le [chapitre II](#) mettent en avant le rôle de Neat1 dans la traduction IRES-dépendante. La suppression de Neat1 entraîne une forte diminution de l'activité de l'ensemble des IRES étudiés, hormis VEGFAa en normoxie et EMCV. De plus on a constaté que son extinction provoque une diminution de la protéine FGF1 endogène. On peut donc en conclure que Neat1 est bien un ITAF des IRES des facteurs (lymph)angiogéniques et cardioprotecteurs (c-myc ayant également ce rôle). En somme Neat1 régule tous les IRES cellulaires étudiés. De façon intéressante, l'IRES viral EMCV n'est pas impacté. À quel niveau Neat1 peut-il intervenir ? Il s'agit d'un ARN non-codant, nucléaire et abondant, comme décrit en [Introduction partie II](#). La traduction a lieu dans le cytoplasme de la cellule, donc si l'action de Neat1 est d'être au cœur de l'IRESome, il doit être exporté du noyau. Les images de FISH obtenues lors de notre étude ne montrent aucun signal détectable de Neat1 dans le cytoplasme. Cependant des données non montrées de fractionnement cellulaire suggèrent que Neat1 et Neat1_2 sont également présents dans le cytoplasme en petite quantité. De plus, nous avons détecté Neat1 dans les polysomes, avec les ARN associés aux ribosomes (Cf [Chapitre I, figure 2](#)). Une étude de Kenneweg *et al* publiée très récemment montre que Neat1, dans les cardiomyocytes HL-1, est exporté dans le cytoplasme en hypoxie²⁶³ comme visualisé par fractionnement cellulaire et FISH. Toutefois les paramètres de l'expérience ne sont pas les mêmes que les nôtres : les HL-1 sont incubées 24 h à 0,1% d'O₂, alors que nos résultats ont été obtenus sur des cellules traitées 4 h à 1% d'O₂.

L'intensité du stress hypoxique n'est donc pas le même, cela pourrait expliquer pourquoi l'export dans le cytoplasme de Neat1 n'a pas été visualisé en FISH dans notre cas. Neat1 serait donc potentiellement exporté dans le cytoplasme pour agir dans l'IRESome.

Quel fonction pour Neat1 dans le cytoplasme ?

Un seul ARN non-codant, TRMP, a été à ce jour décrit comme ITAF (négatif) de l'IRES p27^{kip}. Il prévient l'activation de l'IRES par séquestration de l'ITAF PTBP1¹⁸⁴. Le mécanisme d'action de Neat1 est différent, car c'est un ITAF régulant positivement l'activité de l'IRES. On pourrait bien sûr penser qu'il séquestre des ITAF inhibiteurs, cependant les autres ITAFs identifiés et interagissant avec Neat1, p54^{nrb} et PCPC1, sont des activateurs pour les IRES étudiés ici. Du fait de sa grande taille (3,2 kb pour Neat1_1 et 20,8 kb pour Neat1_2 chez la souris²⁰⁸), il pourrait former une structure de plateforme de recrutement des ITAF, voire même des ribosomes : en effet, la triple hélice portée par Neat1_2 lui confère la capacité de non seulement stabiliser l'ARN mais aussi d'augmenter la traduction¹⁶. Il est donc possible que cette triple hélice permette une interaction avec les ribosomes. Cela conforterait l'observation que nous avons fait de Neat1 présent au sein des polysomes. Pour répondre à cette question il reste cependant nécessaire de définir quelle isoforme de Neat1 est impliquée dans la traduction IRES dépendante, l'hypothèse de la triple hélice ne concernant que Neat1_2. Cette réponse n'a pas encore été apportée par notre étude car les gapmères LNA utilisés pour l'invalidation de Neat1 ciblent les deux isoformes. Aussi, une expérience est en cours pour déterminer le rôle de Neat1 et l'impact de la déplétion de ses deux isoformes ou de l'isoforme Neat1_2 seule sur la traduction d'un panel de gènes. Nous allons effectuer une expérience de puce à qPCR pour analyser les polysomes de cardiomyocytes traités par des gapmers Neat1 ou Neat1_2, par rapport au ARN libre, et observer l'impact de la déplétion sur le translatome de gènes de l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et surtout d'ARNm portant des IRES.

Un nouveau rôle pour le paraspeckle ?

Comme décrit en [introduction](#), Shen *et al* ont montré que, lors d'un stress nucléolaire, la déplétion de Neat1 conduit à la libération de SFPQ et p54^{nrb}, ITAF de l'IRES de c-myc, et à une interaction accrue de ces protéines avec l'ARNm de c-myc²⁴⁰. Les auteurs en concluent que Neat1 régule négativement la traduction de c-myc en séquestrant les ITAF responsables de l'activité de son IRES²⁴⁰. Cependant, dans cette étude il manque un lien direct avec la traduction IRES : seule l'interaction des protéines avec l'ARNm de c-myc est montrée ainsi que le profil de polysomes, mais aucune expérience avec un rapporteur bicistronique n'est effectuée. Or c'est le seul moyen de prouver que l'activité IRES

est modulée. De plus, cette étude est menée dans un contexte cellulaire différent et avec une déplétion de la polymérase I ce qui peut ajouter une couche de complexité à l'effet observé.

Neat1 est le squelette et composant essentiel du paraspeckle, corps nucléaire apparaissant lors de certains processus physiologiques et de stress. Le paraspeckle rassemble comme décrit en **Introduction partie II** une quarantaine de protéines parmi lesquelles sept sont à l'heure actuelle décrites en tant qu'ITAF. J'ai par ailleurs démontré le rôle d'ITAF d'une huitième d'entre elles, PSPC1, dans la traduction des IRES FGF1 et FGF2, VEGFAa, VEGFC et IGF1R en normoxie et FGF1 et FGF2 en hypoxie (Cf. **Chapitre II**). Plusieurs de ces protéines ont la capacité de se lier à l'ARN et pour certaines de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Enfin, le paraspeckle est connu pour rassembler des ARNm en son sein lors de stress. Le rôle de Neat1 dans les paraspeckles et son effet sur l'activité IRES serait-il lié ?

Aussi nous avançons dans ce travail de thèse l'hypothèse que le paraspeckle aurait un rôle de plateforme de pré-assemblage de l'IRESome dans le noyau. Sa capacité de se former en réponse au stress, grâce au long ARN non-codant Neat1 qui est synthétisé en particulier lors de l'hypoxie, le fait qu'il regroupe des protéines impliquées dans la maturation, le transport des ARNm messager et la synthèse protéique, qu'il rassemble des ARNm, et enfin que la déplétion de Neat1 et de plusieurs des composants du paraspeckle entraînent une baisse drastique de l'activité d'un ensemble d'IRES sont autant d'indices nous conduisant à cette hypothèse. Une expérience toujours en cours, nous permettra de déterminer si notre hypothèse se révèle vraie : la localisation d'un ARNm à IRES au sein de la cellule marquée également pour Neat1 et donc pour les paraspeckles. Grâce à la technique de smiFISH, nous avons pu détecter des molécules d'ARNm bicistronique portant l'IRES du FGF1 ainsi que Neat1 et nous cherchons à savoir s'il y a colocalisation de ces deux marquages dans les cardiomyocytes en normoxie et hypoxie. Une expérience supplémentaire d'immunoprécipitation d'ARN sera effectuée pour tenter de déterminer si Neat1 et l'ARN bicistronique se retrouvent à un moment donné dans le même complexe.

L'hypothèse d'une formation de l'IRESome au sein du paraspeckle concorde avec l'observation qu'un événement nucléaire est requis pour l'activité des IRES d'ARNm cellulaires. Elle n'est pas incompatible avec le rôle du promoteur, car le paraspeckle se forme précisément au niveau des foyers de transcription active (voir ci-dessous).

Comment l'ARNm à IRES peut-il être recruté dans les paraspeckles ?

Pour aller plus loin, je souhaite discuter de la façon dont les ARNm portant des IRES pourraient être recrutés au sein des paraspeckles pour rencontrer leur ITAF. La première hypothèse que nous pouvons formuler est que les ARNm recrutés sont édités. En effet le paraspeckle est décrit dans la

littérature pour son rôle de rétention des ARN édités d'adénosine en inosine. p54^{nrb}, un de ses composant principal, a la faculté d'interagir avec les inosine des ARN²²⁵. L'édition de A en I s'effectue sur des structures ARN double-brin. Or, les IRES présentent de fait ce type de structure. Les IRES pourraient-ils être édités ? J'ai réalisé durant ma thèse une expérience de clonage de l'IRES murin de FGF1 dans les cardiomyocytes en soumettant une trentaine de clones plasmidiques au séquençage. Par cette technique, on s'attend à lire un « G » à la place d'un « I » et donc une potentielle édition là où devrait figurer un « A ». Cependant aucune modification n'a été détectée (données non montrées). On ne peut néanmoins pas conclure à ce stade que l'IRES n'est pas édité, car il est soit possible que les conditions n'aient pas été adéquates pour identifier une édition potentielle, soit encore il s'agit d'un évènement rare peu facilement détectable, auquel cas cela ne pourrait pas expliquer un recrutement efficace aux paraspeckles.

Une deuxième hypothèse porte sur la dynamique de formation des paraspeckles. Comme discuté plus haut, certains ITAF (p54^{nrb}, hnRNPM) sont recrutés sur l'ARNm dès sa transcription. Si un tel mécanisme s'étend à d'autres ARN, on pourrait imaginer que Neat1, qui est également décrit comme interagissant avec des foyer actifs de transcription, serait recruté au niveau de ces ARN naissants et le paraspeckle se formerait autour de sa structure. Un tel mécanisme refléterait le haut dynamisme de formation des paraspeckles. Comme mentionné en introduction, les paraspeckles se forment en deux temps : d'abord le RNP minimal à son site de transcription, composé de Neat1_2, p54^{nrb} et SFPQ, puis l'agrégation de ces RNP en paraspeckle grâce à la séparation de phase liquide-liquide. p54^{nrb} et SFPQ sont toutes deux des ITAF. Aussi on pourrait imaginer des complexes RNP formés de Neat1_2 stabilisé, migrant jusqu'aux foyer de transcription des ARN à IRES, pour englober l'ARN naissant et entraîner son assemblage avec les ITAF dans la deuxième phase de formation des paraspeckles pour ensuite diffuser jusqu'aux alentours des speckles.

Variation de la composition de l'IRESome

Le paraspeckle est hautement dynamique, grâce à une courte demi-vie de Neat1 ce qui fait que celui-ci est en permanence recyclé²¹¹. De même, le paraspeckle doit varier en composition. Lors de la déplétion de SFPQ dans les cardiomyocytes, j'ai pu constater que sa perte était compensée par une hausse de l'expression de l'ARNm de PSPC1. Ce type de compensation est largement décrit pour les trois protéines de la famille des DBHS (Cf. [introduction partie II](#)). Or, la déplétion de SFPQ ne mène en moyenne à aucune inhibition de l'activité de l'IRES du FGF1 (Cf. [chapitre II, figure supplémentaire 3](#)), voire même dans certains réplicats d'expérience à une légère augmentation (données non montrées). Nous expliquons cette observation par le fait que l'expression de PSPC1 étant augmentée en réponse à la déplétion de SFPQ, elle compense le rôle d'ITAF potentiel de SFPQ. Si le

paraspeckle est indispensable à l'activité IRES, la disparition de SFPQ devrait entraîner une baisse de la traduction IRES. Il est étonnant nous n'ayons pas observé de rôle de SFPQ, protéine essentielle des paraspeckles, dans la régulation de la traduction IRES de FGF1 alors que deux autres composants essentiels, p54^{nrb} et Neat1, ont un rôle. Aussi nous proposons que le paraspeckle soit amené à varier en composition dans différents tissus ou différentes conditions, au cours du temps, engendrant une régulation fine de l'expression des gènes. Dans notre cas, PSPC1 compenserait la perte de SFPQ pour maintenir l'intégrité des paraspeckles et son rôle dans la traduction IRES-dépendante. Afin d'établir l'existence de ces mécanismes de compensation entre les protéines DBHS, il serait intéressant de réaliser une double ou triple déplétion de ces protéines. Comme on a pu le constater avec les résultats obtenus lors de mon travail de thèse, un IRES peut avoir plusieurs ITAF différents, en fonction du stress, du tissu, tout comme un ITAF peut réguler un ensemble d'IRES. L'IRESome varie donc en composition, ce qui contribue à expliquer l'activation séquentielle des IRES observée dans le [premier chapitre](#).

Redéfinir la notion d'ITAF

Au vu des résultats obtenus durant mon travail de thèse, nous pouvons discuter de la définition d'ITAF. À partir de quand un facteur agissant sur un IRES peut-il être défini en tant qu'ITAF ? Si l'interaction est directe et l'effet présent, la réponse est évidente, mais à partir de quel degré d'interaction considère-t-on qu'une molécule est un ITAF ou un simple acteur en amont ? Le long ARN non-codant Neat1 est la clé de la régulation de la traduction IRES-dépendante des IRES étudiés dans ces travaux. C'est la première fois qu'un ARN non-codant est montré comme étant impliqué à un tel degré dans la régulation de la traduction IRES-dépendante. S'il agit à partir du noyau pour contrôler la traduction IRES, peut-on dire qu'il s'agit d'un ITAF, alors que la traduction a lieu dans le cytoplasme ? Pourtant sa déplétion entraîne une inhibition de l'activité IRES bien plus forte que celles qui sont observés pour les autres ITAF étudiés. TRMP1, l'autre ARN non codant qui a un rôle d'ITAF, est d'ailleurs aussi un ARN nucléaire. Si Neat1 agit au sein des paraspeckles pour réguler la traduction IRES-dépendante, je pense qu'on peut considérer qu'il s'agit d'un ITAF, qui agit en *trans* comme le mentionne son nom. Dans ce cas-là l'ITAF n'est pas présent au sein de l'IRESome au moment de la traduction, mais en amont dans le but de promouvoir sa formation. Un ITAF pourrait être donc défini comme : facteur moléculaire agissant en *trans* pour moduler l'activité d'un IRES, en promouvant la formation de l'IRESome ou agissant au sein de celui-ci de façon directe ou indirecte.

Existe-il un ITAF de l'hypoxie ?

Dans ces trois chapitres, nous avons cherché à identifier un « ITAF de l'hypoxie » c'est-à-dire un facteur qui pourrait réguler un simultanément des IRES lors de l'hypoxie, qu'elle soit cardiaque ou tumorale, une sorte de "hub" connectant entre elles un ensemble de voies de signalisation de réponse au stress. Or, nous avons bel et bien identifié un ITAF agissant sur un grand nombre d'IRES, Neat1. Cependant nous avons constaté qu'il agissait aussi bien en normoxie qu'en hypoxie dans les cardiomyocytes. Comment expliquer alors l'activité IRES en hausse en hypoxie ? Nous pouvons répondre à cette question de deux façons.

Premièrement, Neat1 est induit en hypoxie dans les cardiomyocytes, de même que dans les cellules du carcinome mammaire^{263,330}. Mais Neat1 est déjà présent de base et de façon abondante dans ces cellules, qu'elles soient immortalisées comme les HL-1 ou transformées comme les cellules cancéreuses. En normoxie, dans les cardiomyocytes HL-1, Neat1 et Neat1_2 sont exprimés grâce au gardien du génome p53^{215,263}. Pourtant il a été noté que Neat1_2 n'est pas présent dans la quasi-totalité des tissus d'un mammifère en bonne santé. Chez la souris notamment il s'exprime exclusivement dans les cellules épithéliales de l'intestin et de l'estomac²¹⁹. Il apparaît en revanche lors de certaines étapes du développement et en cas de pathologie^{215,246,350}. Neat1_2 ne s'exprime pas dans non plus dans les cellules souches. Comme expliqué en introduction, les conditions environnementales de la culture cellulaire ne récapitulent pas celles qui existent *in vivo*. Aussi la transcription de Neat1_2 est activée du moment que les cellules sont en culture et un tant soit peu transformées. Il n'est donc pas surprenant de voir que Neat1 agit en tant qu'ITAF en normoxie vu son abondance dans les cellules étudiées, et vu que les IRES ont aussi une activité basale dans ces cellules. On peut expliquer l'activation de l'IRES en hypoxie par le fait que la transcription de Neat1 est induite dans cette condition, ce qui mène à une augmentation du nombre de paraspeckles. Il serait intéressant de regarder l'activité de l'IRES dans des cellules souches ou dans un modèle *vivo* d'ischémie cardiaque ou de cancer lorsque Neat1 est supprimé.

Deuxièmement, il est possible que l'implication de Neat1 en normoxie et hypoxie soit aussi compensée par la variation de composition de l'IRESome par les autres ITAF. Comme nous l'avons vu dans les [chapitres I et II](#), nous avons identifié au cours de ce travail de thèse de nombreux ITAF de l'IRES du FGF1 : PSPC1, et Nucléoline et Rps2 potentiellement, ITAF actifs en normoxie dans les cardiomyocytes, VASH1 lors de l'hypoxie et p54^{nr}b et Neat1 dans les deux cas. VASH1 est donc nécessaire en plus de Neat1 et p54^{nr}b pour que FGF1 fonctionne en hypoxie. Or l'expression de ces protéines et du long ARN non-codant augmente en hypoxie. Cette hausse de l'expression pourrait être due à un IRES. Il y a donc davantage d'ITAF disponibles en hypoxie. Enfin, l'IRESome s'assemble

potentiellement dans le noyau, mais après export dans le cytoplasme, d'autres ITAF le rejoignent ce qui doit être le cas de VASH-1, dont les foci cytosoliques sont élargis en hypoxie (Cf. [Chapitre I, figure 6](#)). La localisation et la disponibilité des ITAF entrent donc en ligne de compte dans la formation et la composition de l'IRESome¹³⁴.

Neat1 comme régulateur paracrine de l'expression des facteurs (lymph)angiogénique ?

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré le rôle central du long ARN non-codant Neat1 dans la traduction IRES-dépendante des facteurs de croissances et autres facteurs étudiés. Nous faisons l'hypothèse que le paraspeckle pourrait avoir une nouvelle fonction de plateforme de pré-assemblage de l'IRESome. Cependant une étude récente de Kenneweg *et al*²⁶³ nous amène à élargir nos perspectives. Dans le cœur, il existe un échange entre les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales pour coordonner la réponse au stress ischémique provoquée par l'infarctus du myocarde^{351,352}. Cette communication passe notamment par des vésicules extracellulaires contenant des ARN non-codants (miARN, long ARN non-codants), qui servent ainsi d'effecteurs paracrine. Dans leur étude, Kenneweg *et al* ont identifié plusieurs ARN non-codants dont Neat1, enrichis dans des vésicules sécrétées par les cardiomyocytes hypoxiques. Ces vésicules sont absorbées par les fibroblastes qui expriment alors des marqueurs pro-fibrotiques. De plus, ils ont démontré que Neat1, induit dans les cardiomyocytes en hypoxie, permet de promouvoir cette réponse pro-fibrotique : sa suppression entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et induit l'apoptose dans la lignée de fibroblaste NIH3T3. Ce rôle de Neat1 est également observé *in vivo* dans un modèle murin d'infarctus du myocarde. Le niveau d'expression de Neat1 augmente à la fois dans la zone de l'infarctus/péri-infarctus et dans une zone plus éloignée du cœur et il est enrichi dans les vésicules extracellulaires isolées du cœur ischémique. Dans des souris KO pour Neat1 ayant subi un infarctus du myocarde, la fonction cardiaque est aggravée. On voit donc ici que Neat1 est primordial pour la fonction cardiaque et un remodelage efficace en réponse à l'ischémie. Il est intéressant de voir que Neat1 peut servir d'effecteur paracrine.

Dans cette étude, aucun mécanisme n'est détaillé quant à l'action de Neat1 dans les fibroblastes et comment est régulé son export au sein des vésicules extracellulaires. Au regard des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, on peut se demander si Neat1 ne pourrait pas avoir un effet plus global dans la communication intercellulaire au cours de l'ischémie cardiaque : s'il est exporté dans le cytoplasme dans les cardiomyocytes, il peut activer la traduction IRES-dépendante. En pénétrant dans les fibroblastes via des vésicules extracellulaires, il peut aussi perpétuer cette réponse aux stress en activant la traduction IRES-dépendante de ces cellules-cibles et induire la synthèse des facteurs de

croissances nécessaires au remodelage cardiaque. FGF2 est notamment décrit comme un acteur privilégié de ce remodelage par la communication intercellulaire³⁵¹. Il serait aussi intéressant de discriminer l'isoforme de Neat1 impliquée dans ce processus. De même, quel est le rôle des paraspeckles dans ce processus ?

De nombreuses questions restent encore sans réponse quant au mécanisme impliquant Neat1 dans la traduction IRES-dépendante. Néanmoins, les résultats de ces travaux de thèse offrent une perspective nouvelle dans le traitement des pathologies cardiovasculaires et du cancer : en ciblant un facteur unique, Neat1, régulant un ensemble de réponses concertées au stress hypoxique.

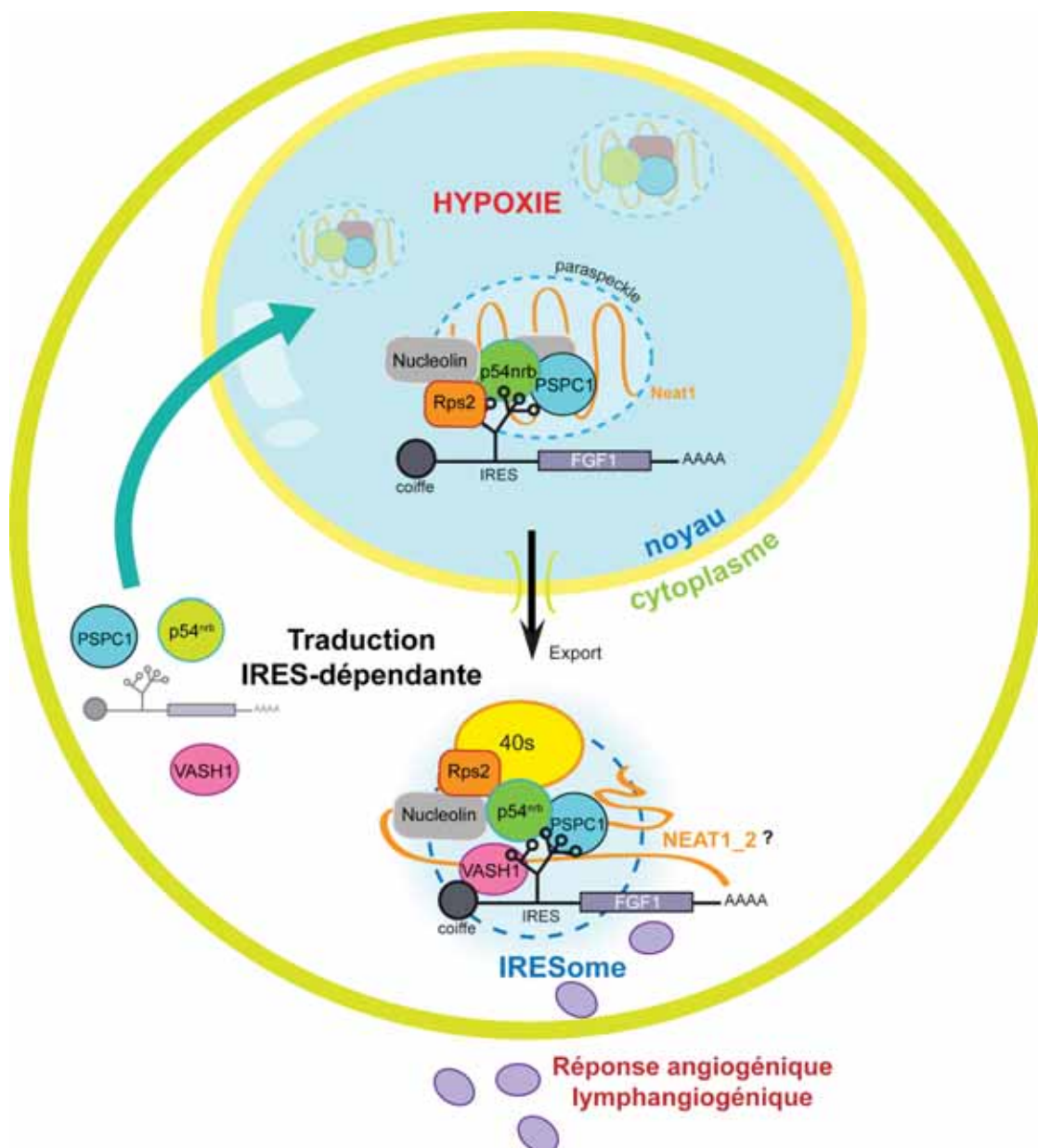


Figure 18. Modèle de traduction IRES-dépendante du FGF1 avec pré-assemblage de l'IRESome dans le noyau avant export dans le cytoplasme.

Annexes



Review

IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response

Anne-Claire Godet, Florian David, Fransky Hantelys, Florence Tatin, Eric Lacazette, Barbara Garmy-Susini  and Anne-Catherine Prats 

UMR 1048-I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UT3, 31432 Toulouse cedex 4, France;
anne-claire.godet@inserm.fr (A.-C.G.); florian.david@inserm.fr (F.D.); fransky.hantelys@gmail.com (F.H.);
florence.tatin@inserm.fr (F.T.); eric.lacazette@inserm.fr (E.L.); barbara.garmy-susini@inserm.fr (B.G.-S.)

* Correspondence: anne-catherine.prats@inserm.fr

Received: 24 December 2018; Accepted: 14 February 2019; Published: 20 February 2019



Abstract: The cellular stress response corresponds to the molecular changes that a cell undergoes in response to various environmental stimuli. It induces drastic changes in the regulation of gene expression at transcriptional and posttranscriptional levels. Actually, translation is strongly affected with a blockade of the classical cap-dependent mechanism, whereas alternative mechanisms are activated to support the translation of specific mRNAs. A major mechanism involved in stress-activated translation is the internal ribosome entry site (IRES)-driven initiation. IRESs, first discovered in viral mRNAs, are present in cellular mRNAs coding for master regulators of cell responses, whose expression must be tightly controlled. IRESs allow the translation of these mRNAs in response to different stresses, including DNA damage, amino-acid starvation, hypoxia or endoplasmic reticulum stress, as well as to physiological stimuli such as cell differentiation or synapse network formation. Most IRESs are regulated by IRES trans-acting factor (ITAFs), exerting their action by at least nine different mechanisms. This review presents the history of viral and cellular IRES discovery as well as an update of the reported ITAFs regulating cellular mRNA translation and of their different mechanisms of action. The impact of ITAFs on the coordinated expression of mRNA families and consequences in cell physiology and diseases are also highlighted.

Keywords: gene regulation; translation; mRNA; IRES; ITAF; hnRNP; chaperone; stress; nucleocytoplasmic translocation; ribosome; lncRNA; translation initiation factor; stress granules; therapeutic targets

1. Introduction

Internal ribosome entry sites (IRESs) are translation regulatory elements of mRNAs that were first discovered in viruses. Until the late 1980s, it was thought that eukaryote mRNAs could not be translated by internal ribosome entry and that the only mechanism was the cap-dependent process involving the recruitment of the small ribosome subunit at the mRNA 5' end, followed by ribosome scanning [1,2]. This dogma has been proven incorrect with the discovery, in 1988, of RNA structural elements present in the mRNA 5' untranslated regions (5'UTR) of two picornaviruses, poliovirus (PV) and encephalomyocarditis virus (EMCV), able to mediate cap-independent translation through internal ribosome entry [3,4]. Picornavirus mRNAs are uncapped, with start codons located several hundred nucleotides downstream from mRNA 5' end, rendering an improbable translation initiation at these AUG codons by the 5' end-dependent scanning mechanism. Furthermore, these viruses express a protease that cleaves the initiation factor eIF4G, a component of the cap-binding complex, which blocks the cap-dependent initiation process and results in a translational shutdown in the infected cell. The translational machinery is, thus, fully available for the viral mRNA and occurs in

a cap-independent manner. Ribosomes are recruited by internal entry via RNA structural domains called “ribosome landing pad” or “internal ribosome entry site” (IRES) that were shown later to exist in different virus families including *Picornaviridae*, *Flaviviridae*, *Dicistroviridae* and *Retroviridae* [3–12], as well as in cellular mRNAs [13,14].

2. The Viral IRESs

Four major IRES classes have been defined in viruses that differ by their mode of ribosome recruitment and secondary/tertiary structure. Type I and II IRESs, found in picornaviruses, are long (400–500 nt long) and present a strong conservation of primary and secondary sequences within each of the two classes [7,15,16]. Their main mechanistic difference is that the type I IRESs (including PV IRES) recruit the ribosome far upstream from the authentic initiation codon; thus, ribosome internal entry is followed by ribosome scanning to reach the start codon. In contrast, the type II IRESs (including EMCV IRES) recruit the ribosome directly onto the initiation codon that is located just downstream from the IRES and do not necessitate ribosome scanning to promote translation initiation. The third important class, whose prototype is hepatitis C (HCV) IRES, concerns the *Flaviviridae* (including HCV) and HCV-like picornaviruses [9,17]. This third class of IRESs is characterized by the presence of a pseudoknot upstream from the AUG codon and by the requirement of the first 30 nt of the coding sequence [18–20]. These IRESs are shorter than the Type I and II IRESs and recruit the ribosome directly onto the AUG codon. Intergenic region (IGR) IRESs constitute a fourth class of IRESs, originally identified in cricket paralysis virus (CrPV) [12,15]. IGR IRESs are conserved among members of the *Dicistroviridae* family, whose mRNA is naturally bicistronic. IGR IRESs function in the absence of any start codon. For CrPV, translation starts at a GCU triplet. Moreover, these IRESs can form 80S ribosomes without the initiator Met-tRNA [12]. *Retroviridae* IRESs, whose mRNAs are capped, resemble cellular mRNA IRESs (see below).

3. The Cellular IRESs

Soon after the finding of the two first IRESs in picornaviruses in 1988, two host trans-acting factors, La autoantigen and pyrimidine tract binding protein (PTB), were identified as IRES-binding factors required for internal initiation of translation [21–24]. This suggested that the internal initiation process might also concern cellular mRNAs, although these mRNAs are capped. Actually, the first IRES mediated by the 5' leader of a cellular mRNA was described in 1991 in the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA [13]. What could be the usefulness for a capped mRNA to contain an IRES? The first hypothesis was that IRESs could allow cellular mRNA translation when the cap-dependent process is blocked, which was known to occur during mitosis (G2-M phase) and in stress conditions such heat shock or viral infection [25–27]. Favoring this hypothesis, the BiP messenger codes for a chaperone involved in the unfolded protein response occurring during endoplasmic reticulum (ER) stress, and its synthesis was detected in spite of the translation blockade generated by poliovirus infection [13]. Although this first cellular mRNA IRES was indicative of a major role of IRES-dependent translation in the stress response, the physiological relevance of IRESs in the translation of cellular mRNAs was questioned during many years because these mRNAs are capped in contrast to the picornavirus mRNAs. Nevertheless, it quickly became clear that the BiP mRNA was not a unique case: IRESs were found in a series of other cellular mRNAs, including transcription factors such as the homeobox (Hox) gene *antennapedia*, the proto-oncogene *c-myc*, angiogenic growth factors, such as fibroblast growth factors (FGFs) and vascular endothelial growth factors (VEGFs), as well as many genes coding for the master regulators of cell responses [14,28–34]. Interestingly, it was shown that these capped IRES-containing mRNAs may be translated either by the cap-dependent or by the IRES-dependent mechanism, according to the conditions: a switch from cap- to IRES-dependent mechanism during hypoxia has been described for VEGFA and HIF1 α IRESs in breast cancer resulting from the overexpression of eIF4G and of 4E-BP, a protein that sequesters the cap-binding protein eIF4E [35]. This switch has also been reported for the p53 mRNA in conditions of oncogene-induced

senescence and for the VEGFC IRES under hypoxia [29,36]. As viral IRESs, cellular IRESs imply RNA secondary structures that are conserved in mammals [29,30,37,38]. However, in contrast to viral IRESs, they cannot be classified as they do not exhibit sequence or secondary structure similarities.

The function of cellular IRESs clearly appears in the case of mRNAs that are naturally bi- or multicistronic. A few dozen mRNAs have been reported that express two or more proteins, in most cases via IRES elements [39]. Two specific cases have been reported: mRNAs with distinct open reading frames (ORF) separated by an intergenic region and mRNAs with overlapping open reading frames leading to the synthesis of proteins with a common C-terminal portion but differing in their N-terminal part. The latter case can be illustrated by the examples of angiogenic growth factors FGF2 and VEGFA, whose mRNAs are subjected to alternative initiations of translation [40,41]. The FGF2 mRNA uses four CUGs and one AUG to express five FGF2 isoforms, which have different localizations and functions [40,42]. Translation from the upstream CUG is cap-dependent whereas all the other start codons are used by an IRES-dependent mechanism. With regards to the VEGFA, its mRNA contains two IRESs driving translation from two initiation codons CUG and AUG, leading again to isoforms with different intracellular localizations [28,41].

Only few bi- or multicistronic mRNAs with intergenic regions have been discovered [39]. The c-myc mRNA is tricistronic when transcribed from the upstream alternative promoter P0 in human [31,43]. It contains three distinct ORFs separated by intergenic regions containing IRESs. These two IRESs drive the translation of the middle ORF and MYCHEX1 and of the downstream ORF that codes for the c-myc1/c-myc2 proteins (initiated at two alternative start codons) [43]. The MDP6 antigen is coded by an ORF located in the 3' region of the myotrophin mRNA, and its synthesis is controlled by an IRES sensitive to interferon- α [44]. Thus, the translation of the two ORFs of this bicistronic mRNA are differently regulated. A bicistronic mRNA has been also described in rat brain, coding for the two subunits of a glutamate-binding protein complex in rat brain synaptic membranes, PRO1 and PRO2 [45]. These two polypeptides are synthesized from the bicistronic mRNA, implying an IRES in the intergenic sequence, which allows their coordinate expression. The same observation has been made for the two G-coupled fatty acid receptors GPR40 and GPR41 [46].

The physiological relevance of IRESs present in monocistronic mRNAs clearly appeared with the discovery of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) mRNA IRES [47]. This IRES was shown to be induced in apoptotic conditions. This observation was also made for other IRESs of mRNAs coding for factors involved in apoptosis, including the apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), c-myc and p53 [48–51]. These findings definitely highlighted the crucial role of IRES-dependent translation for cellular mRNAs. Actually, during apoptosis, the cap-dependent translation process is blocked as it is after the picornavirus infection due to the cleavage of eIF4G [52]. XIAP and APAF1 have opposite functions during apoptosis; thus, their relative level due to differential IRES activation is essential for the life/death decision of the cell in the progression of the apoptosis pathway [52].

Thereafter, the IRES physiological function was evidenced in several reports. First, an important tissue specificity of cellular IRES activities was observed in contrast to the picornavirus IRES activity. This was revealed with the FGF2 IRES in transgenic mice: the IRES was inactive in almost all adult organs, except for the brain and testis, where the activity was very strong, much stronger than in cultured cells [53]. Further investigation demonstrated that the FGF2 IRES is a key of FGF2 translational induction during spermatogenesis and during the formation of synaptic networks between neurons [54,55]. In contrast, the activity of the FGF1 IRES, another member of the FGF family, is strong in skeletal muscle and involved in the control of FGF1 expression during myoblast differentiation and muscle regeneration [56].

In addition to their roles in specific adult organs, IRESs are important in the control of gene expression during development. The FGF2 and c-myc IRESs were as active as the strong EMCV (encephalomyocarditis virus) IRES in mice embryo in contrast to what was observed in adult [53,57]. The early discovery of an IRES in the mRNA of the homeobox Hox gene *Antennapedia* in *Drosophila* also argued such a hypothesis, whereas the proof of concept, which definitely demonstrated the key role of

IRESs in development, was provided 23 years later by Maria Barna and her collaborators who identified IRESs in four HoxA mRNAs [32,58]. These authors have shown that these IRESs are conserved in evolution and demonstrated that they are essential for mouse development by generating the first targeted mouse knockout of a cellular IRES [58]. Moreover, the presence of IRESs in cellular mRNAs was investigated in a high throughput study, which uncovered thousands of sequences, allowing cap-independent translation, and which showed that 10% of the mRNAs harbour cap-independent sequences [59]. Although the methodology used in this report may include false positives, it indicates that IRES-dependent translation may concern a large number of cellular mRNAs and, thus, constitutes, under the control of ITAFs, a pivotal mechanism in the control of gene expression.

The dysfunction of IRES-dependent translation has been related to various pathologies. A single mutation in the *c-myc* IRES is responsible for *c-myc* overexpression in multiple myeloma [60]. Also, single mutations in the connexin 32 and VEGFA IRESs have revealed the essential role of IRESs in two severe neurodegenerative diseases, Charcot-Marie-Tooth disease and amyotrophic lateral sclerosis, respectively [61,62]. More recently, an aberrant increase of IRES-dependent translation of key cancer gene mRNAs has been reported in cancer cells, including the major angiogenic factors FGF1, FGF2 and VEGFA, as well as *c-myc* and insulin growth factor-like receptor (IGF1R) [63]. This study revealed that the mechanism of IRES activation results from p53 tumor suppressor inactivation: p53 represses the expression of the rRNA methyl-transferase fibrillarin, which modifies the rRNA methylation pattern and generates “cancer ribosomes” that will be preferentially recruited by IRES-containing mRNAs.

These different studies of IRES-related pathophysiological functions demonstrate the key role of IRES-dependent translation, revealing the coexistence of cap-dependent and -independent translation for capped mRNAs containing IRESs. They also provide exciting therapeutic opportunities to specifically regulate the expression of IRES-containing genes (often involved in the control of cell proliferation, cell death, angiogenesis, etc.) at the translational level by targeting different ITAFs.

4. IRES-Dependent Translation, a Pivotal Mechanism in the Stress Response

Physiological and environmental stresses induce drastic changes in the regulation of gene expression, which permits cell adaptation and survival, or in contrast, triggers programmed cell death. It was long believed that such changes mostly occur at the transcriptional level. For example, hypoxia, which is one of the major physiological stresses during development, generates the stabilization of the hypoxia-induced factor (HIF) which induces the transcription of a series of target genes. However, this strong transcriptional response is not the only way to modify gene expression during stress. Several posttranscriptional mechanisms were shown to participate in the hypoxic response, among which translational control plays a key role.

Above all, global translation is blocked during stress to save energy, as translation is estimated to consume up to 50% of cellular energy [52]. This translation blockade is observed in most stress conditions including hypoxia, nutrient limitation, temperature changes, ultraviolet irradiation, endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, viral infection, etc. The two main locks of this blockade are the translation initiation factors eIF4E and eIF2 α [64]. The first way of inhibiting translation results from the mechanistic target of rapamycin (mTOR) kinase inactivation, which induces hypophosphorylation of 4E-binding proteins (4E-BPs). When dephosphorylated, 4E-BP sequesters the cap-binding protein eIF4E, generating a blockade of cap-dependent translation. The second way of translation inhibition by stress is due to eIF2 α phosphorylation, which blocks the exchange of GDP to GTP in the eIF2 complex and prevents the assembly of the ternary complex eIF2-GTP-tRNA^{Met} required for the binding of the initiator Met-tRNA^{Met} to the 40S ribosomal subunit. There are four known stress-responsive eIF2 α kinases able to impact global translation: haem-regulated inhibitor kinase (HRI), protein kinase RNA (PKR), PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and general control non-repressible-2 (GCN2). These kinases are activated by different stresses that induce a common pathway of translation blockade [52,64]. The eIF2 pathway subtlety is that it also induces the selective translation of transcripts, mostly coding for master regulators of the cell responses,

including transcription factors, growth factors, etc. Such a selective translation occurs by two main initiation mechanisms: small upstream open reading frame (uORF)-regulated initiation and IRES-driven initiation. The best documented example of translation initiation regulated by uORFs is the yeast transcriptional activator GCN4 [65]. The GCN4 mRNA contains four uORFs upstream from the GCN4 ORF. When the ternary complex eIF2-GTP-tRNA^{Met} is abundant, uORFs are translated, which prevents the translation of the GCN4 ORF. In contrast, if the level of ternary complex is low, under amino-acid starvation, scanning ribosomes fail to initiate at the uORFs and translate the GCN4 ORF. This mechanism has also been described for the mammalian transcription factor ATF4 [64].

IRES-dependent translation, the focus of the present review, is the other main mechanism of selective translation upon eIF2 α phosphorylation. Although eIF2 α is, in principle, required for both cap-dependent and independent translation, IRES-dependent translation is selectively increased in the condition of phosphorylated eIF2 α . This was first observed for the IRES of the Arg/Lys transporter cat-1, as well as for several viral IRESs [66]. Interestingly, the activation of cat-1 IRES observed in response to amino-acid starvation, ER stress and double stranded RNA requires eIF2 α phosphorylation by GCN2, PERK and PKR, respectively. This suggests that the cat-1 IRES can function efficiently when the level of ternary complex eIF2-GTP-tRNA^{Met} is low. This was also observed for BiP, XIAP and other stress-responsive transcript IRESs [67,68]. Two models have been proposed for this intriguing observation: i) ribosome recruitment and formation of the initiation complex utilizes initiation factor 5B (eIF5B) that delivers the tRNA directly into the P site of the ribosome to form a translation-competent initiation complex [68,69] and ii) IRES-dependent translation is increased following the transcriptional induction of 4E-BP by GCN2 and its downstream transcription factor, activating transcription factor 4 (ATF4): In conditions of limiting ternary complex eIF2-GTP-tRNA^{Met}, a stronger blockade of cap-dependent translation by 4E-BP results in increased IRES-dependent translation [67].

The upregulation of IRES-dependent translation by stress has an impact in various pathologies. For instance, hypoxia appears in the center of solid tumors exceeding a volume of two cubic millimeters which are not any more irrigated by blood vessels. As the major angiogenic and lymphangiogenic growth factors of the FGF and VEGF families possess IRESs in their mRNAs, these growth factors are translationally induced as their IRESs are sensitive to hypoxia [29,35,70,71]. This results in tumoral angiogenesis and lymphangiogenesis, two processes that promote tumor cell invasion and metastasis dissemination. Hypoxic stress also occurs in cardiovascular diseases such as lower limb ischemia and ischemic heart disease. In these pathologies, cells are subjected to hypoxia due to artery occlusion in the ischemic leg or in an infarcted myocard. In particular, chronic heart failure is a public health issue. IRES-dependent translation plays a major role during ischemia: a very recent mid-scale study shows that, unexpectedly, the expression of most (lymph)angiogenic factors is not induced at the transcriptome level but at the translational level in hypoxic cardiomyocytes [72]. The same study indicates that the IRESs of (lymph)angiogenic factors mRNAs, FGF1, FGF2, VEGFA, VEGFC and VEGFD are activated in early hypoxia, while non angiogenic IRESs such as EMCV or *c-myc* IRES are activated in late hypoxia. Furthermore, the FGF1 IRES is also activated in an ischemic heart in vivo in a mouse model of an infarcted myocard [73]. The IRES-dependent translation in an ischemic myocard thus allows a rapid angiogenic response that contributes to cardiomyocyte survival. These data enlighten the strong pathophysiological impact of IRES-dependent translation to stimulate tumoral and non-tumoral (lymph)angiogenesis in response to hypoxia (Figure 1).

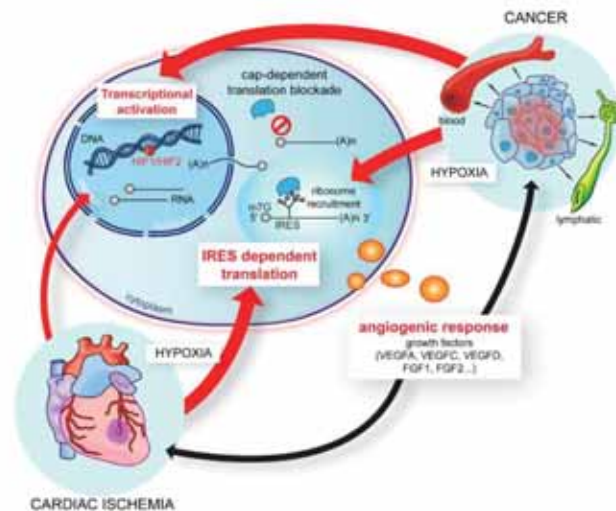


Figure 1. The regulation of the (lymph)angiogenic growth factor expression during hypoxia: (Lymph)angiogenic growth factors are regulated at the transcriptional and/or translational levels during hypoxia. In conditions of tumoral hypoxia, the regulation is both transcriptional and translational through the internal ribosome entry site (IRES)-dependent mechanism, whereas during cardiac ischemia in hypoxic cardiomyocytes, most regulation is translational [72]. The IRESs of (lymph)angiogenic growth factor mRNAs are activated during early hypoxia by an HIF1-independent mechanism.

5. IRES Trans-Acting Factors, Key Regulators of Cellular IRESs

Most IRESs, and in particular cellular IRESs, require IRES trans-acting factors (ITAFs) to function in addition to several canonical translation initiation factors. Around fifty proteins have been described for their ability to specifically regulate cellular IRESs, while a single long noncoding RNA (lncRNA), TP53-regulated modulator of p27 (TRMP), is also able to regulate IRES-dependent translation (Table 1) [74].

A near-exhaustive bibliographic analysis of ITAFs controlling cellular IRESs has been performed here, revealing several classes of ITAFs. The largest class is composed of nuclear proteins able to shuttle from the nucleus to the cytoplasm to control the IRES-dependent translation. This class contains many heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) but also other proteins such as nucleolin, HuR or p54^{nrb} (Table 1). A second ITAF class is composed of cytoplasmic proteins. Most of them are translation machinery-associated proteins with ribosomal and ribosome-associated proteins as well as translation initiation or elongation factors. However, other cytoplasmic or membrane-associated proteins have an ITAF function, whereas they have no reported interaction (at the moment) with the translation machinery except for being an ITAF. For instance, upstream of the N-ras (Unr) is a cytoplasmic cold shock protein which is also associated to the endoplasmic reticulum; hepsin is a plasmic membrane-associated protein able to control the Unr mRNA IRES, while vasohibin 1 (VASH-1) is a mostly cytoplasmic and secreted protein known for its antiangiogenic and stress resistance features before being identified as an ITAF (Table 1). A third ITAF class contains, at the moment, a single member, the 834 nucleotide long non-coding (lnc) RNA TRMP, inhibitor of the p27kip IRES [74]. Another ncRNA, miR-122, has been described but only for a viral IRES. This small liver-specific RNA binds to the HCV 5'UTR and competes with PCBP2 binding, which blocks translation and increases the viral RNA engagement in replication versus translation [75]. The discovery of an ITAF function exhibited by a lncRNA is very recent; thus, one can expect that TRMP is probably not the only lncRNA to regulate the IRES-dependent translation, as many lncRNAs could serve as assembly platforms for regulatory proteins. Interestingly, TRMP is an inhibitor of the p27kip IRES and is a direct transcriptional target of p53 itself, regulated at the IRES-dependent level by sixteen reported ITAFs (Table 1).

Table 1. An update of the reported IRES trans-acting factors (ITAFs) that regulate cellular IRESs. The different reported ITAFs regulating cellular IRESs are indicated. They are dispatched into three classes (see text). For each ITAF, the regulated IRESs, the type of regulation (activator or inhibitor), the described stimuli able to trigger their activity, the roles in cell physiology and diseases as well as the corresponding references are shown.

ITAF	Also Known As	Regulated IRESs	Regulation	Stimulus	Roles in Cell Physiology and Diseases	References
Class I: ITAFs with nucleocytoplasmic translocation						
Annexin A2		p53	activator	ER stress	cancer	[76]
CUGBP1	CELF1	SHMT1-1, p27kip	inhibitor/activator	UV irradiation	DNA repair, cell proliferation	[77,78]
DAF5	P97, NAT1, eIF4GIII	Ic1-2, Icl-XL, BAX, AIPAF-1, DAP5, Δ40p53, CDK1, HIAF2, c-myc, XIAP	activator	viral infection, apoptosis, ER stress, serum starvation, γ-irradiation	cell survival or programmed cell death	[79–88]
FBP3	FUBP3	TXNIP	activator		Renal cell carcinoma	[89]
FLS		LEF1	activator		Cancer, amyotrophic lateral sclerosis	[90]
GISH1		c-myc, L-myc, N-myc	activator		cancer	[91]
H-ferritin		SHMT1-1	activator	UV irradiation	DNA repair	[77,92]
HDMX		p53	activator	DNA damage	tumour suppression	[93]
hIRNP1		XIAP, FGF2, Nfil3, SREBP1-a, c-myc, ICL-XL, cyclin D1, AIPAF-1, ssd2, ER-α, HIF1-α	activator/inhibitor	FGF2, lipid accumulation, ER stress, osmotic shock, UV irradiation	multiple myeloma, circadian oscillation	[37,94–102]
hIRNPC	hIRNPC1/C2	p53, IGF1R, univ, c-myc, XIAP	activator	DNA damage, transcription inhibition, growth stimulus, cell cycle	inhibition of apoptosis, cancer	[103–107]
hIRNPD	IKTBP1	NRF	activator	UV irradiation	cell survival	[108,109]
hIRNPE	PCBP, alphaCP	c-myc, BAC1	activator	Chemotoxic stress	cell survival, tumorigenesis	[110–112]
hIRNP12		SHMT1	activator	UV irradiation	DNA repair	[77]
hIRNPK		c-myc	activator		myoblast differentiation, proliferation, tumor progression	[113,114]
hIRNPL		Cat-1, p53, LINE-1	activator	Amino-acid deprivation/ DNA damage	transposition inhibition	[114–116]
hIRNPM		FGF1	activator	myoblast differentiation	muscle regeneration	[117]
hIRNPQ	NSAP1	p53, rev-erb-a, PericD1, AANAT, Bfp, FMRF	activator	apoptosis/ heat shock	circadian oscillation/ cell survival/ axonal growth cone collapse/ Fragile X syndrome, autism	[118–123]
hIRNPR		AANAT	activator		circadian oscillation	[124]
HuR	ELAV1	IGF1R, caspase-2, Icl-XL, XIAP, p27kip, Thrombospondin	activator/inhibitor	amino-acid deprivation, IL-1β	cytoprotection, inhibition of apoptosis, cell proliferation, breast cancer	[108,125–130]
La auto antigen		XIAP, Bfp, RRBP1	activator/inhibitor	serum starvation, paclitaxel, actinomycin	cell survival, malignancy maintenance, hepatocellular carcinoma	[106,125–133]
Mdm2		p53, XIAP	activator	DNA damage, ionizing radiation	resistance to radiation-induced apoptosis	[93,134]
NF45		IRAF1, XIAP, NRE, ILG	activator	ER stress	polyphoidy, senescence	[135]
nPTI		IR	activator	cell density, insulin	cell proliferation	[136]
nucleolin		p53, VEGFD, LINE-1	activator/inhibitor	heat shock, DNA damage	transposition inhibition	[130,135,137,139]
p54orb	NONO	c-myc, L-myc, N-myc, APAF1, FGF1	activator	myoblast differentiation, nuclear stress, apoptosis	muscle regeneration	[91,137,139]
PICD4		P53, INR, IGF1R, Icl-XL, XIAP	activator/inhibitor	oxidative stress, absence of DNA damage, S6K2 inactivation, IGF2 pathway inhibition	apoptosis, tumour suppression	[140–143]

Table 1. Cont.

ITAF	Also Known As	Regulated IRESs	Regulation	Stimulus	Roles in Cell Physiology and Diseases	References
PSF	SFPQ	p53, c-myc, L-myc, N-myc, BAG1, LEF1	activator/inhibitor	nuclear stress, apoptosis, ER stress	cancer	[76,90,91,130]
PTB	hnRNP1/PTBP1	p53, p27kip, PTK1, IR, Cat-1, APAF1, HIF1 α , IRE1, rev-erb- α , unt, c-myc, N-myc, BAG1, Bsp, ADAR1, TNNIP	activator/inhibitor	DNA damage, hypoxia, ER stress, amino-acid deprivation, cell density, insulin	circadian oscillation, cell cycle arrest, apoptosis	[99,91,107,112,114,136,144–154]
RHA	NDH11	p53	activator	DNA damage	tumour suppression	[135]
SMAR1		p53	activator/inhibitor	glucose deprivation	cancer (tumour suppressor)	[156]
YB1	YBX1	c-myc, L-myc, N-myc, p16INK4	activator	hypoxia	multiple myeloma, cancer	[91,145,157]
Class II: Cytoplasmic ITAFs related to translational machinery						
4E-BP1		VEGFA, HIF1 α , INR	activator	hypoxia, low nutrients, low insulin	cancer, Parkinson	[33,158]
APF (ACD)		Δ 6p53	activator		Alzheimer disease	[159]
eIF1A2		utrophin A	activator		muscle regeneration	[160]
eIF3		c-myc, N-myc, XIAP	activator	apoptosis, hypoxia	cancer	[161,162]
eIF4A		c-myc, N-myc	activator	apoptosis, hypoxia	cancer	[161]
eIF4G1		APAF-1, DAP5, Bel-2, Bip, c-myc, L-myc, N-myc, VEGFA	activator	apoptosis, hypoxia	cancer	[35,96,163,165]
eIF5B		XIAP	activator	apoptosis, hypoxia	cancer	[68]
eL38	Rpl38	Hox	activator		development	[38]
e519	Rpl19	BAG1, CSDE1, LumB1	activator		erythroid differentiation, Diamond-Blackfan anemia	[164]
eS25	Rps25	APAF-1, BAG1, c-myc, L-myc, Myb, p53, Sec7	activator	ER stress	multiple myeloma	[101,165,166]
Gemin5		TNNIP	activator/inhibitor	Serum starvation	Spinal muscular atrophy	[69]
Hsp90 (also in plasmic membrane)		unt	inhibitor		Cell cycle regulation, Prostate cancer	[167]
PINK1 (also mitochondrial)		HIF1 α	activator	hypoxia	Parkinson	[168]
Rack1		IGF1R	activator/inhibitor		Hepatocellular carcinoma	[169]
TCF80	NP80, DRB17b	p53	activator	DNA damage	tumour suppression	[155]
uL1	Rpl10A	IGF2, APF, Chmp2A, Bel-2	activator		Alzheimer, leukemia, mitochondrial dysfunction	[166,170]
uL24	Rpl26	p53	activator	DNA damage	tumour suppression	[137,138]
uL5	Rpl11	BAG1, CSDE1, LumB1	activator		erythroid differentiation, Diamond-Blackfan anemia	[164]
VASH1 (also secreted and nuclear)	Vaschlin 1	FGF1	activator	hypoxia	ischemic heart disease	[72]
Class III: ncRNA-consiliated ITAFs						
TRMP		p27kip	inhibitor	induced by p53	inhibition of cell proliferation, tumor suppressor	[74]

It has been often reported that viral IRESs harbor specific secondary or tertiary structures with common domains while it is difficult to identify any structural conservation between different cellular IRESs [15,74]. Despite this difference, many reported ITAFs seem to control the IRES-dependent initiation of translation for both cellular and viral IRESs. A well-documented example is PTB (also known as hnRNP1), first described as an ITAF of the EMCV IRES [22]: This protein is able to modulate the translation of a dozen reported virus IRESs as well as at least fourteen cellular IRESs (Table 1) [152]. The IRES binding sites of this protein have been extensively studied. Six PTB binding sites have been mapped on the EMCV IRES, corresponding to unpaired oligopyrimidine tracts [22,171]. Two of them are crucial for the IRES activity, located on a stem-loop structure 400 nt upstream from the AUG and just upstream from the AUG codon [22,172]. The binding of these two PTB molecules might be required to stabilize the IRES conformation. The PTB binding to cellular IRESs has also been studied and can be illustrated by the example of the APAF1 IRES [151]. PTB and its neuronal variant nPTB have two binding sites, the major one being located in an exposed loop in the 3' part of the APAF1 IRES. The other ITAF controlling the APAF1 IRES, unr, binds to a purine-rich loop in an upstream domain of the IRES [151].

ITAFs able to drive ribosome recruitment on both viral and cellular IRESs are also found among class II cytoplasmic ITAFs: A nice example is provided by the ribosomal protein rps25 (eS25), required for *Discitroviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae* and *Retroviridae* IRES activities, as well as for at least ten cellular IRESs (Table 1) [165,173,174]. Unr is able to regulate viral IRESs such as poliovirus and human rhinovirus IRESs, as well as at least five cellular IRESs [15]. These observations indicate that the same ITAFs can control viral and cellular IRESs, suggesting that either ITAFs act via a similar mechanism for the two IRES types or a given ITAF can act by different mechanisms. An important difference between viral and cellular IRESs is the stronger tissue-specificity of cellular IRESs [53]. One can hypothesize that cellular IRESs require specific ITAFs expressed only in certain cell types or tissues and/or that they are more susceptible to negative ITAFs that would silence these IRESs in specific tissues. Specific ITAFs could regulate groups of mRNAs in a coordinated manner, thus defining regulons [58].

While several IRESs can be regulated by a same ITAF, a given IRES can be regulated by several ITAFs, which may be positive or negative regulators. As shown in Table 1, we have listed thirteen cellular ITAFs able to inhibit IRES-dependent translation. Furthermore, ten of them have the double role of IRES activator or inhibitor, depending on the IRES. Among the best-documented IRESs regulated by several ITAFs are the p53 mRNA IRESs [175]. Two p53 IRESs have been described, controlling the expression of either the full-length p53 (FL-p53) or of a p53 isoform devoid of N-terminal domain, Δ N-p53. These two IRESs are induced by genotoxic or cytotoxic stress. In basal non-stressed conditions, the IRES activity is inhibited by two negative ITAFs, nucleolin and programmed cell death protein 4 (PDCD4), whereas two other ITAFs, translational control protein 80 (TCP80) and RNA helicase A (RHA), are bound to the RNA but with an inadequate interaction that cannot activate the IRES. Following stress, the interaction of TCP80 and RHA is increased and several other positive ITAFs including ribosomal protein RPL26 (uL24) and hnRNPQ bind to the IRES, facilitating secondary structure unwinding and enhancing IRES activity. The Δ N-p53 mRNA IRES is activated during stress by several other ITAFs including PTB, death-associated protein 5 (DAP5), PTB-associated splicing factor (PSF) and Annexin A2 [175]. In addition, proteins bound to the 3'UTR of the FL-p53 mRNA also influence the IRES activity: The protein Quaking has an inhibitory effect on the IRES activity while HuR binds to the 3'UTR during stress, displaces Quaking and activates translation. It is likely that many IRESs, as well as p53 IRESs, are regulated by a protein complex rather than by a single ITAF. The composition of this complex, called the IRESome, varies among IRESs and is probably a means to regulate the IRES activity specifically. The presence of different partners in the complex may also help us to understand why a given ITAF can be either negative or positive depending on the IRES, as shown for at least nine ITAFs (Table 1).

The cryogenic electron microscopy (cryo-EM) has allowed a real technological advance to study the ribosome assembly on the IRES [176]. Only viral IRESs have been studied at this time. Two first

studies of the HCV IRES bound to 40S or 80S ribosomes at low resolution cryo-EM (between 15 and 30 Å) have revealed that the HCV IRES RNA induces a change in the 40S ribosome conformation that promotes translation initiation, while the bound 80S ribosome generates structural rearrangements in the two IRES pseudoknots [177,178]. A few years later, high resolution cryo-EM studies of ribosome interactions (3.7 to 3.9 Å) with the CrPV, HCV and classical swine fever virus (CSFV) IRESs have provided detailed information about the molecular interactions within the ribosome-IRES complexes [179–182]. Cryo-EM has revealed that the CrPV IRES pseudoknot structure interacts with the decoding center of the 40S ribosome and necessitates a translocation before it can accept an aminoacyl tRNA to start translation. Also, an atomic model of the ribosome-bound HCV IRES RNA has been proposed, showing the precise interactions of the IRES with different ribosomal proteins and with the 18S rRNA. IRES interaction with the ribosomal protein eS27 prevents the binding of eIF3 to a ribosome, which decreases the cap-dependent translation [180,181]. As eIF3 directly binds to the HCV IRES and activates the IRES activity, it appears that the role of eIF3 in IRES-dependent translation differs from its canonical role of interaction with the cap-binding factor eIF4F [180,181].

A cryo-EM analysis remains to be done for the translation initiation complexes with cellular IRESs. The data for viral IRESs indicate that this powerful approach will allow the deciphering of the molecular interactions of ITAFs with IRESs and ribosomes to better understand their modes of action.

6. Multifunctional ITAFs: How are They Assigned to the Translational Function?

ITAFs have often other functions in addition to their role in IRES-dependent translation. Most of them have been first discovered for playing roles in alternative splicing (hnRNPs), ribosome biogenesis (nucleolin, TCP80, RHA), mRNA stability (HuR), transcription (p54^{nrb}, hnRNPK, –M, RHA, SMAR1), etc. The question of how they are assigned to their translational function remains to be investigated. However, several reports provide some answers. The first one is the intracellular localization. Numerous multifunctional ITAFs are mainly nuclear proteins that can translocate in the cytoplasm. A well-documented example is hnRNPA1 [37,94,98,183]: This protein is relocalized to the cytoplasm in stress conditions, resulting in IRES negative or positive regulations. HnRNPA1 activates FGF2 and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) IRESs while it inhibits APAF1 and XIAP IRESs. Such a relocalization has been reported for other ITAFs, including PTB and poly r(C) binding protein 1 (PCBP1; also known as hnRNPE) that act in concert to activate the Bcl-2-associated athanogene 1 (BAG1) IRES in response to chemotoxic stress [110]. Also, nucleolin is translocated from nucleolus to cytoplasm to activate the VEGFD IRES in response to heat shock [30].

ITAF activity is also regulated by various posttranslational modifications. This was first demonstrated for RNA-binding motif protein 4 (RBM4), an ITAF described, at the moment, only for viral IRESs [184]. Following arsenite exposure, RBM4 is phosphorylated, which accompanies its cytoplasmic relocalization and targets stress granules. When phosphorylated, RBM4 both inhibits cap-dependent translation and activates IRES-dependent translation. With regards to cellular IRESs, hnRNPA1 constitutes a well-documented example for the role of posttranslational modifications: its binding to c-myc and cyclin D IRESs is regulated by Akt phosphorylation [95]. Furthermore, hnRNPA1 dimethylation on its glycine-arginine-rich (GAR) motif by the type II arginine transferase PRMT5 is required for the activation of cyclin D1, c-myc, HIF1α and estrogen receptor α (ER-α) IRESs [185]. Another ITAF described more recently, the tumor suppressor PDCD4, is phosphorylated by protein kinase S6K1 or Akt and subsequently degraded via the ubiquitin ligase β-TCRP [140,142,143,186]. PDCD4 inhibits cap-dependent translation, while it is a negative or positive ITAF depending on the IRES: It is a repressor of p53, Bcl-XL and XIAP and an activator of INR and IGF1R IRESs [140,141,143,186]. Multiple posttranslational modifications have been described for hnRNPK, a protein overexpressed in many cancers [187]. This multifunctional protein is subjected to phosphorylation, methylation, ubiquitination and sumoylation while it interacts with diverse groups of molecular partners involved in transcription, chromatin remodeling, RNA processing, translation

and signal transduction [188]. hnRNPK sumoylation on a lysine residue promotes its ITAF function and results in the activation of the *c-myc* IRES in Burkitt's lymphoma cells [187].

7. ITAFs Use Different Mechanisms of Action to Control IRES-Dependent Translation

We have seen above that ITAF activities are regulated by different parameters including nucleocytoplasmic shuttling, posttranslational modifications and the interaction with diverse partners. The question is by which mechanisms are ITAFs able to activate or inhibit IRES-dependent translation? As described below, nine ITAF mechanisms have been documented (Figure 2).

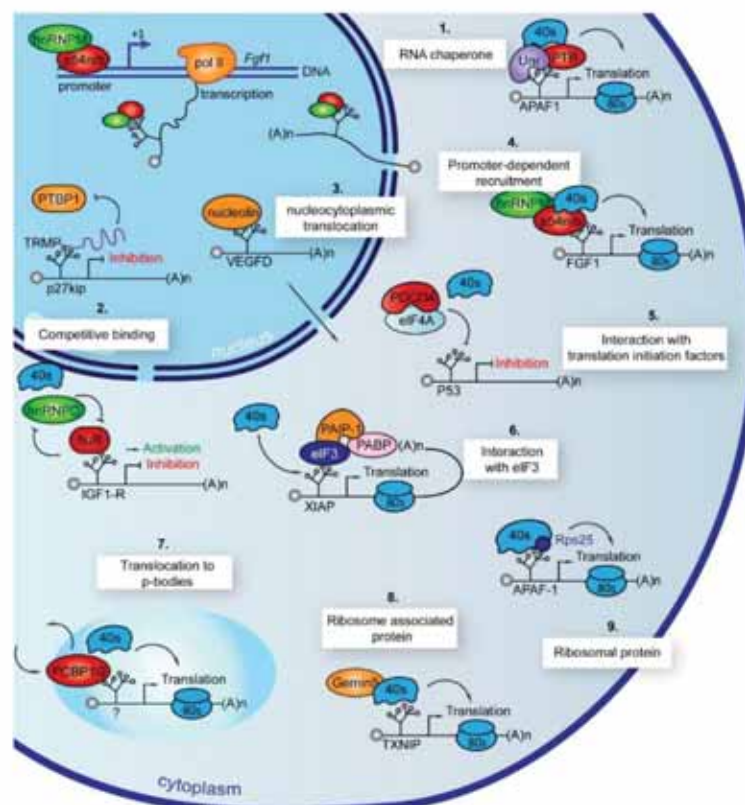


Figure 2. The ITAFs use different mechanisms of action to control IRES-dependent translation. The different reported mechanisms of ITAFs to regulate IRES activities are schematized. For each mechanism, an example is shown with the names of the ITAF and of the IRES. The start point of translation is indicated by an arrow if translation initiation is increased or by a blocked arrow if translation initiation is inhibited. Each mechanism is detailed in the text.

7.1. Chaperones

The first mechanism to be described is a role of chaperone for PTB (and its neuronal form nPTB) and Unr [151]. These two proteins are required to activate the APAF1 IRES and act by altering the secondary structure of the IRES. According to the report by Mitchell et al, Unr first binds to two stem loops identified in the IRES, generating a conformational change that renders it accessible to the nPTB or PTB binding sites [151]. Then a second conformational change occurs, providing the correct conformation for the 40S ribosome subunit binding. The cooperation of two or more ITAFs in IRES activation through an RNA conformational change has been described for other IRESs: The BAG1

IRES is also controlled by a couple of ITAFs, PTB and PCBP1 [189]. Again, there is a successive binding of the two ITAFs, with, first, PCBP1 that opens the RNA, allowing PTB binding and subsequent 40S recruitment. In these studies, PTB appears as an essential part of the preinitiation complex.

The different hnRNPs described as ITAFs are likely to act by the chaperone mechanism, often in conjunction with other mechanisms. By example, the chaperone mechanism can be associated to competition and nucleocytoplasmic translocation mechanisms, as described below.

7.2. Competitive Binding

The interplay between different ITAFs can be competitive rather than cooperative: This is the case of Annexin A2, PSF and PTB [76]. Annexin A2 and PSF would act as chaperones or by stabilizing the preinitiation complex as shown for PTB. These three ITAFs are all activators of the second IRES present in the p53 mRNA between the FL-p53 and Δ N-p53 AUG codons [175]. However, they compete for IRES binding as they share overlapping binding sites. Annexin A2 binding is calcium-dependent whereas PSF binding is not. The authors propose that the accumulation of more calcium ions in the cytoplasm during ER stress would promote Annexin A2 binding to activate the IRES activity, whereas PSF and PTB would play a role in other stress conditions or physiological stimuli. Actually, it has been proposed that PTB regulates the differential expression of p53 isoforms during the cell cycle and in response to DNA damage [148]. Competitive binding has also been reported for couples of ITAFs harboring opposite activities. HuR and hnRNPC compete for their binding to the IGF1R IRES, which is silenced by HuR and activated by hnRNPC [106]. The lncRNA TRMP inhibits the p27^{kip} IRES activity by competing with the IRES for PTB binding and thus preventing IRES activation mediated by PTB [74].

7.3. Nucleocytoplasmic Translocation

The role of nucleocytoplasmic translocation of many ITAFs in IRES activation (Table 1) does not answer the question of ITAF nuclear or cytoplasmic binding. Actually, the ITAF can be translocated to the cytoplasm upon stress and then can bind to the IRES-containing mRNA, or it can bind to the IRES in the nucleus and then be translocated with the IRES-containing mRNA as a ribonucleoprotein. In such a case, the ITAF can also play a role in the nuclear retention of the IRES-containing mRNA in the absence of stress [82]. Clearly, the regulation of APAF1 IRES by the successive binding of Unr and PTB suggests that PTB binds to this IRES in the cytoplasm because Unr is cytoplasmic. In contrast, a set of arguments indicates that certain ITAFs bind to the IRES in the nucleus. In particular, a nuclear event is required for a IRES-dependent translation controlled by certain IRESs: this has been shown for *c-myc* and FGF1 IRESs by demonstrating that these IRESs are not able to drive translation when the cells are transfected with a bicistronic in vitro-transcribed mRNA, while the same IRESs are active upon DNA transfection, implying mRNA transcription in the nucleus [50,117]. It is different for viral HRV and EMCV IRESs which exhibit a similar activity following RNA or DNA transfection, showing that the nuclear event is not required for all IRESs.

7.4. Promoter-Dependent Recruitment

A second argument favoring the existence of the nuclear recruitment of ITAFs onto the IRES is brought by the discovery of a mechanism of coupling between translation and transcription for the FGF1 IRES [56]. The activity of FGF1 IRES is promoter-dependent, a mechanism explained by ITAF recruitment onto the promoter that facilitates the recruitment on the mRNA. These two ITAFs, hnRNPM and p54^{nrb}, are able to enhance both transcription and translation: first, they activate the FGF1 promoter and then the FGF1 IRES-dependent translation. The dependence to promoter does not change the mechanism of action for ribosome recruitment. However, one can expect that such ITAFs act as chaperones to stabilize the IRES conformation very early in the mRNA maturation process. Although it has not been demonstrated that these ITAFs can bind on the nascent mRNA in a

co-transcriptional manner, it is a plausible hypothesis, as co-transcriptional binding has been shown for several hnRNPs during the alternative splicing process [117,190].

7.5. Interaction with Translation Initiation Factors or with 4E-BP

Additional ITAF mechanisms of action have been discovered that strictly occur in the cytoplasm during the translation initiation process. Several ITAFs act by inhibiting translation initiation factors. RBM4 was shown to interact with the initiation factor 4A (eIF4A) in response to arsenite treatment, which promotes the association of eIF4A with the IRES-containing mRNA [184]. By this way, RBM4 simultaneously activates IRES- and inhibits cap-dependent translation, probably by stabilizing the eIF4A interaction with the IRES which facilitates the unwinding by eIF4A of the IRES domain necessary for ribosome recruitment. Indeed, it has been reported that the IRES-dependent recruitment of ribosome 43S requires RNA unwinding [191]. Interestingly, this is concomitant with RBM4 targeting stress granules. RBM4 has not yet been shown to regulate any cellular IRES; however, its interaction with eIF4A and with eIF2 β has been shown for DAP5, an ITAF of the eIF4G family. DAP5 regulates several cellular IRESs of the genes involved in apoptosis as well as its own IRES [83]. Another ITAF acting via eIF4A interaction is PDCD4, whose interaction with eIF4A was demonstrated by crystal structure and mutation analysis, while it also interacts directly with the IRES [142]. However, in contrast to RBM4, PDCD4 has been described as a negative ITAF and acts by blocking the helicase activity of eIF4A [140]. PDCD4 would thus prevent the unwinding of the IRES ribosome recruitment domain by eIF4A. This ITAF controls at least five IRESs in p53, INR, IGF1R, Bcl-XL and XIAP mRNAs, most of them involved in apoptosis, also revealing the relevance of the eIF4A binding mechanism for cellular IRESs (Table 1).

PTEN-induced putative kinase-1 (PINK1), involved in Parkinson's disease, activates the HIF1 α mRNA translation during hypoxia by acting on 4E-BP1 [35,168]. It has been shown that PINK1 stimulates the switch of the 4E-BP hyperphosphorylated γ form (inactive form) to the hypophosphorylated α form (active form) that sequesters eIF4E and inhibits the cap-dependent translation, while it activates IRES-dependent translation by increasing the availability of eIF4G for IRES-dependent translation. PINK1 acts on 4E-BP1 as well as on 4E-BP2, the predominant 4E-BP protein in the brain. The activator effect of PINK1 has been shown only for EMCV IRES; however, the decrease of HIF1 α mRNA translation in PINK1 $^{-/-}$ mouse strongly suggests that PINK1 is also an activator of the HIF1 α IRES [168]. The authors do not rule out that PINK1 could affect the activity of other translation factors such as S6K, eIF4E, eIF4G, eEF2 or eIF2 α .

7.6. ITAF Role of eIFs, eEFs and 4E-BP

The role of canonical translation initiation in the activity of viral IRESs has been intensively addressed in the mid-1990s when IRES-mediated initiation was reconstituted in vitro, showing that EMCV IRES activity requires the same canonical factors as the cap-dependent initiation: eIF2, -3, -4A, -4B and -4F [192]. eIF4F, composed of the cap-binding protein eIF4E as well as of eIF4A and eIF4G, binds to the IRES in a cap-independent manner, and its activity is attributed to its eIF4A and -4G. It was demonstrated that eIF4A and the central domain of eIF4G are sufficient to mediate the ribosome 43S recruitment [191]. In the case of other viral IRESs, HCV and CSFV, the initiation factor eIF3 is able to bind to specific domains of these IRESs [193]. The process of ribosome recruitment onto these IRESs is exceptional because it does not involve the canonical factors eIF4A, -4B or -4F, while eIF3 is absolutely required for ribosome 80S formation on these IRESs.

In the 2000s, the specific requirement of several eIFs was also demonstrated for cellular IRES-mediated translation initiation. During apoptosis, the three members of the eIF4G family, eIF4GI, eIF4GII and DAP5, are cleaved by caspases. While the eIF4GII cleavage products are degraded, eIF4GI and DAP5 proteolytic fragments are stable and activate IRESs of pro-death APAF1 and DAP5 mRNAs, a process that will contribute to the fine-tuning of the cell fate [86]. The C-terminal domain of eIF4GI bound to eIF4A is also required for the activities of N- and c-myc IRESs [161]. In *C. elegans*,

the eIF4GI ortholog (IFG-1) activates Bip and Bcl-2 IRESs during apoptosis [163]. eIF4GI has as well an ITAF function on the HIF1 α and VEGF IRESs in conditions of hypoxia [35]. In that study, it was shown that tumors overexpress both eIF4G and 4E-BP1, which orchestrates a switch of cap-dependent to IRES-dependent translation for cancer key mRNAs resulting from an increased sequestration of eIF-4E. The overexpression of these two proteins promotes tumor growth and angiogenesis.

Supporting the similarities of viral and cellular IRES-dependent mechanisms, eIF3 is also required for N- and c-myc IRES activities by a direct mechanism that does not necessitate eIF3 binding to eIF4G, resembling the viral mechanism where eIF3 is directly recruited to the mRNA [161]. The XIAP IRES is also activated by direct eIF3 binding via an RNA structural domain located close to the AUG codon [162]. The polyA-binding protein (PABP) binding to eIF3 allows mRNA circularization that promotes ribosome binding. Thus, eIF3 acts as a scaffold for 40S ribosome recruitment.

IRES-dependent translation is also regulated by eIF5B, a factor classically known to be involved in ribosome subunit joining, whose prokaryotic homolog IF2 promotes the binding of initiator tRNA to the prokaryotic 30S ribosomal subunit. This was first shown for the CSFV IRES, whose activity is not affected by eIF2 α phosphorylation [194]. eIF5B is able to stabilize the ribosomal binding of initiator tRNA when eIF2 is inactive. This mechanism was also shown for the XIAP IRES: When eIF2 α is inactivated, the IRES-dependent translation switches to the eIF5B mode [68].

Finally, the elongation factor eEF1A2, whose canonical role is to shuttle aminoacyl-tRNA during translation elongation, has been characterized as an ITAF for the utrophin A IRES, activated during muscle regeneration [160]. Its mechanism of action has not been elucidated, but the hypothesis is that it could interact with a tRNA-like structural element in the utrophin A IRES.

7.7. Translocation to Stress Granules and P-Bodies

Stress granules are cytoplasmic foci mainly composed of stalled preinitiation complexes that appear in stress conditions due to eIF2 α phosphorylation. Processing bodies (P-bodies) are cytoplasmic structures that assemble during stress after stress granules and are dedicated to the storage and degradation of untranslated mRNA [195]. The current hypothesis is that mRNAs exiting translation would first accumulate in stress granules before being transferred to P-bodies. Interestingly, several ITAFs have been localized in stress granules or P-bodies. PTB is partially localized in stress granules upon infection by cardiovirus Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) [196]. As PTB is an activator of the TMEV IRES, its sequestration in stress granules would make it unavailable for virus genome translation, explaining in part the negative impact of stress granules on viral replication. hnRNP A1 is also a known stress granule-associated protein, giving it a role in cell survival to stress [197]. However, the relation with its ITAF function is not clear. A stress granule component, the ras GTPase SH3 stress granule assembly factor 1 (G3BP1), has been characterized as an inhibitor of foot-and-mouth disease virus (FMDV) IRES [198]. G3BP1 interacts with the FMDV IRES and also interacts with hnRNP A1 and PTB, suggesting that its inhibitory effect could occur by mRNA retention in the stress granule as well as by the sequestration of hnRNP A1 and PTB.

Also, translocation between cytoplasm and processing bodies (P-bodies) has been described for PCBP1 and PCBP2 upon stress conditions [199]. These authors suggest that PCBPs could play a role in shifting rapidly certain untranslated mRNAs into a translationally active state. However, the link between PCBP translocation and IRES-dependent translation has not been elucidated yet. Gemin5, a component of survival of motor neuron (SMN) proteins whose dysfunction is involved in spinal muscular atrophy, interacts with eIF4E and colocalizes with it in P-bodies [200]. Gemin5 is an inhibitor of cap-dependent translation but is also able to bind to FMDV and HCV IRESs and to block their activity, in particular upon serum starvation [201].

7.8. Association to Ribosome

Another cytoplasmic mechanism of IRES regulation concerns ribosome-associated proteins. RACK1, a *Drosophila melanogaster* 40S ribosome subunit-associated protein (now considered as a

ribosomal protein) was found associated to the HCV IRESome and was shown as an essential determinant of HCV, *Drosophila* C virus (DCV) and CrPV IRES activities [202,203]. RACK is an adaptor protein interacting with a variety of signaling proteins.

Reaper, a potent apoptosis inducer in *Drosophila melanogaster*, inhibits cap-dependent translation by directly binding to the 40S ribosome subunit, while it allows IRES-dependent translation to occur via the Cricket paralysis (CrPV) IRES [204]. Reaper is the first discovered cellular ribosome binding protein to allow a selective translation. Its interaction with a ribosome small subunit in the late stage of initiation might affect the function of eIF5B and inhibit 60S joining or might directly inhibit the recognition of the start codon. Although Reaper has not yet been documented for its effect on cellular IRESs, one can hypothesize that certain cellular IRESs may also be regulated by this mechanism.

Two other inducers of apoptosis, grim in *Drosophila* and second mitochondrial activator of caspase (smac) in humans, were shown to inhibit translation, suggesting that they could allow the same selective translation as Reaper [205]. Interestingly, Reaper and grim mRNA translation are IRES-regulated [206,207]. In human, the glycogen synthase GYS1 was found associated to polysomes, while its depletion results in the loss of polysomes and affects translation positively or negatively depending on the mRNA [208]. The selectivity of these proteins towards IRES-dependent translation remains, however, unknown.

The SMN component Gemin5, described above for its P-bodies localization, is also a ribosome-associated protein. Indeed, Gemin5 inhibits the FMDV IRES activity by outcompeting PTB via its C-terminal domain, while it inhibits global translation by interacting with the uL3 and uL4 proteins of the 60S ribosomal subunit via its N-terminal domain [209,210]. Recently, Gemin5 was identified as a positive ITAF of the thioredoxin-interacting protein (TXNIP) IRES [89].

7.9. Ribosome Inherent Constituent

Finally, it appears that ribosomal proteins can be directly involved in the control of IRES-dependent translation. The ribosome has been viewed during the last decades as an apparatus able to translate the genetic code without having an intrinsic regulatory capacity. However, several reports have shifted the view of ribosome function by revealing the existence of specialized ribosomes with specific features, rendering them able to control gene expression [211]. The first demonstration of a ribosomal protein that is specifically required for IRES-mediated translation initiation, while not necessary for cap-dependent translation, was provided by Landry et al. [212]. These authors have shown that rps25 (eS25) is required for the activation of CrPV and the hepatitis C virus (HCV) IRESs. Additional studies demonstrated that this protein is globally required for viral IRES as well as for cellular IRES activities. Rps25 is an activator of many cellular IRESs including APAF-1, BAG1, *c-myc*, *L-myc*, Myb, p53 and Set7 IRESs (Table 1). Other ribosomal proteins seem to regulate families of messengers, thus defining regulons. It has been documented in a report showing that RPL38 (eL38) is required for ribosome recruitment onto IRESs of the hox gene family, constituted of homeobox genes involved in development [58]. A recent report has definitely demonstrated that heterogeneous ribosomes are able to preferentially translate distinct subpools of mRNAs [166]. This study highlights the role of RPL10A (uL1) in the activation of IGF2, amyloid precursor protein (APP), charged multivesicular body protein 2A (Chmp2A) and Bcl-2 IRESs [166,170]. Such IRES activation would occur by the direct interaction of the ribosomal protein with the IRES, resulting in ribosome recruitment.

8. Discussion

The present update highlights the discovery of about fifty ITAFs able to regulate the IRES-dependent translation of cellular mRNAs. It also recapitulates the extensive work performed on viral IRESs that had a pioneer role in the scientific advances in understanding the mechanisms of IRES-dependent translation. Viral IRESs have paved the way to cellular IRESs. Advanced technologies

such as cryo-EM will soon provide information on the interaction of cellular IRESs with ribosomes and reveal the molecular role of ITAFs in such interactions.

The existence of cellular IRESs have long been a controversial topic, as it was more difficult to definitely prove with adequate controls the IRES-dependent translation mechanism of capped mRNA compared to viruses with uncapped mRNAs. Also, it is easier to measure viral replication than a cell biological process to demonstrate the IRES physiological relevance. Due to the presence of the cap-structure at the mRNA 5' end, the only way to demonstrate the presence of an IRES in eukaryotic mRNAs has been to use the bicistronic reporter system. It has been shown that several previously reported IRES structures contain cryptic promoters or splicing acceptor sites, resulting in false positive findings. However, the presence of a cryptic promoter or splicing site is not incompatible with the presence of an IRES. As shown for VEGFA, an alternative promoter has been identified just between the two IRES sequences; nevertheless, the two IRESs are actually operational in the VEGFA mRNA [70]. With regards to XIAP, a cryptic splicing event has been observed but only when the first cistron is the renilla luciferase (LucR), due to cryptic splicing donor sites in the LucR sequence [52]. This problem has been circumvented by using another reporter gene such as beta-galactosidase [52]. Mutating the cryptic splicing sites in the LucR gene is also a good solution [72]. Stringent and carefully controlled experiments such as Northern blots, RT qPCR or first cistron knockdown have been necessary to demonstrate the presence of *bona fide* cellular IRESs [49,51,53,58]. In spite of these difficulties and of several articles claiming the non-existence of cellular IRESs, it has now been evidenced, based on many reports, that the process of IRES-dependent translation not only concerns viral mRNAs but also has a crucial impact in the translational regulation of cellular mRNA expression, in particular in stress conditions.

The discovery of about fifty ITAFs (the list remains to be completed in the future) able to regulate cellular IRESs indicates that the control of gene expression by the IRES-dependent process is far from marginal. These different ITAFs play a key role in many physiological processes including development, cell differentiation, cell cycle regulation, apoptosis or circadian oscillation. Furthermore, they are pivotal in the cell response to all possible stress conditions (Table 1). Given that ITAFs regulate the expression of families of genes involved in these processes, they have a strong impact in different pathologies. ITAFs are important actors in many cancers but also in cardiovascular diseases such as ischemic heart disease and neurodegenerative diseases including Parkinson's disease, Alzheimer's disease or amyotrophic lateral sclerosis.

The ITAF involvement in many pathologies provides important perspectives to find new targets to regulate the translation of specific genes or gene networks in a therapeutic objective. Actually, this is being investigated for cancer therapeutics. An intensive area of research concerns the search for new molecules that could reactivate p53 expression [175]. The p53 positive ITAFs TCP80 and RHA appear as promising therapeutic targets to increase p53 levels. Their reduced expression seems to be responsible for a decreased p53 response following DNA damage in breast cancer cells expressing the wild type p53: they represent targets whose expression could be stimulated [155]. Also, the knockdown of p53 negative ITAFs may be an attractive strategy. Moreover, ITAFs are of great interest as therapeutic targets because they are able to control the translation of families of mRNAs. For example, an ITAF able to activate the IRESs of several angiogenic growth factors during hypoxia will constitute a target of choice to block angiogenesis. The discovery of ITAFs controlling IRES regulons, thus, opens an avenue to find new therapeutics.

Author Contributions: Writing-original draft preparation, A.C.P.; Figure original drawing, A.C.G.; Writing-Review & Editing, A.-C.G., A.-C.P., B.G.-S., E.L., F.D., F.H. and F.T.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

4E-BP	4E binding protein
AANAT	Arylalkylamine N-acyltransferase
ADAR1	Adenosine deaminase RNA specific 1
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor1
APP	Amyloid precursor protein
ATF4	Activating transcription factor 4
BAG1	Bcl-2-associated athanogene 1
BiP	Immunoglobulin heavy-chain binding protein
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
Chmp2A	Charged multivesicular body protein 2A
CrPV	Cricket paralysis virus
Cryo-EM	Cryogenic electron microscopy
CSDE1	Cold shock domain containing E1
CSFV	Classical swine fever virus
CUGBP1	CUG triplet repeat RNA-binding protein 1
DAP5	Death-associated protein 5
DCV	Drosophila C virus
eIF	Eukaryotic initiation factor
ELAV	Embryonic lethal abnormal vision
ELAV1	ELAV-like protein 1
ELG	Elongatus
EMCV	Encephalomyocarditis virus
ER	Endoplasmic reticulum
ER- α	Estrogen receptor alpha
FBP3	Far-upstream element binding protein 3
FGF	Fibroblast growth factor
FMDV	Foot-and-mouth disease virus
FMRP	Fragile X mental retardation protein
FUS	Fused in sarcoma
G3BP1	Ras GTPase SH3 stress granule assembly factor 1
GCN2	General control non-derepressible 2
GCN4	General control non-derepressible 4
GRSF1	G-rich RNA sequence binding factor 1
HCV	Hepatitis C virus
HIAP2	Human inhibitor of apoptosis 2
HIF	Hypoxia-inducible factor
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
Hox	Homeobox
HRI	Haem-regulated inhibitor kinase
IGF1R	Insulin growth factor-like receptor
IGR	Intergenic region
IR	Insulin receptor
IRES	Internal ribosome entry site
IRF2	Interferon regulatory factor 2
ITAF	IRES trans-acting factor
LEF1	Lymphoid enhancer binding factor 1
LucR	<i>Renilla</i> luciferase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NAT-1	N-acetyltransferase 1
NRF	NFKB repressing factor
NSAP	Nephritis strain-associated protein
P-bodies	Processing bodies
PABP	PolyA-binding protein
PCBP	poly r(C) binding protein
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase

PINK1	PTEN-induced putative kinase-1
PKR	Protein kinase RNA
PRMT5	Protein arginine methyltransferase
PSF	PTB-associated splicing factor
PTB	Pyrimidine tract binding protein
PV	Poliovirus
RBM4	RNA-binding motif protein 4
RHA	RNA helicase A
RRBP1	Ribosome binding protein 1
SHMT-1	Serine hydroxymethyltransferase 1
Smac	Second mitochondrial activator of caspase
SMN	Survival of motor neurone
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
TCP80	Translational control protein 80
TRMP	TP53-regulated modulator of p27
TXNIP	Thioredoxin-interacting protein
Unr	Upstream of N-ras
uORF	Upstream open reading frame
UTR	Untranslated region
VASH-1	Vasohibin 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

References

1. Kozak, M. Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes. *Nature* **1979**, *280*, 82–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kozak, M. The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 229–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. 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. [[PubMed](#)]
4. 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](#)] [[PubMed](#)]
5. Balvay, L.; Lopez Lastra, M.; Sargueil, B.; Darlix, J.L.; Ohlmann, T. Translational control of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 128–140. [[CrossRef](#)]
6. Berlioz, C.; Darlix, J.L. An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polypeptide precursors. *J. Virol.* **1995**, *69*, 2214–2222. [[PubMed](#)]
7. Jackson, R.J. The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a011569. [[CrossRef](#)]
8. Kwan, T.; Thompson, S.R. Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**. [[CrossRef](#)]
9. Tsukiyama-Kohara, K.; Iizuka, N.; Kohara, M.; Nomoto, A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **1992**, *66*, 1476–1483.
10. Vagner, S.; Waysbort, A.; Marenda, M.; Gensac, M.C.; Amalric, F.; Prats, A.C. Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20376–20383. [[CrossRef](#)]
11. Wang, C.; Sarnow, P.; Siddiqui, A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* **1993**, *67*, 3338–3344.
12. Wilson, J.E.; Pestova, T.V.; Hellen, C.U.; Sarnow, P. Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **2000**, *102*, 511–520. [[CrossRef](#)]
13. Macejak, D.G.; Sarnow, P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **1991**, *353*, 90–94. [[CrossRef](#)]

14. Vagner, S.; Gensac, M.C.; Maret, A.; Bayard, F.; Amalric, F.; Prats, H.; Prats, A.C. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 35–44. [\[CrossRef\]](#)
15. Lee, K.M.; Chen, C.J.; Shih, S.R. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 547–562. [\[CrossRef\]](#)
16. Thompson, S.R. So you want to know if your message has an IRES? *Wires RNA* **2012**, *3*, 697–705.
17. Wang, C.; Sarnow, P.; Siddiqui, A. A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **1994**, *68*, 7301–7307.
18. Lu, H.H.; Wimmer, E. 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. USA* **1996**, *93*, 1412–1417. [\[CrossRef\]](#)
19. Reynolds, J.E.; Kaminski, A.; Carroll, A.R.; Clarke, B.E.; Rowlands, D.J.; Jackson, R.J. Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: The ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* **1996**, *2*, 867–878.
20. Wang, C.; Le, S.Y.; Ali, N.; Siddiqui, A. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* **1995**, *1*, 526–537.
21. Hellen, C.U.; Witherell, G.W.; Schmid, M.; Shin, S.H.; Pestova, T.V.; Gil, A.; Wimmer, E. A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7642–7646. [\[CrossRef\]](#)
22. Jang, S.K.; Wimmer, E. 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.* **1990**, *4*, 1560–1572. [\[CrossRef\]](#)
23. Luz, N.; Beck, E. Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **1991**, *65*, 6486–6494.
24. Meerovitch, K.; Pelletier, J.; Sonenberg, N. A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: Implications for internal translation initiation. *Genes Dev.* **1989**, *3*, 1026–1034. [\[CrossRef\]](#)
25. Bonneau, A.M.; Sonenberg, N. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11134–11139.
26. Huang, J.T.; Schneider, R.J. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* **1991**, *65*, 271–280. [\[CrossRef\]](#)
27. Lindquist, S. Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: Implications for regulation. *Dev. Biol.* **1980**, *77*, 463–479. [\[CrossRef\]](#)
28. Huez, I.; Creancier, L.; Audigier, S.; Gensac, M.C.; Prats, A.C.; Prats, H. Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol. Cell Biol.* **1998**, *18*, 6178–6190. [\[CrossRef\]](#)
29. Morfisse, F.; Kuchnio, A.; Frainay, C.; Gomez-Bouchet, A.; Delisle, M.B.; Marzi, S.; Helfer, A.C.; Hantelys, F.; Pujol, F.; Guillermet-Guibert, J.; et al. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep.* **2014**, *6*, 155–167. [\[CrossRef\]](#)
30. Morfisse, F.; Tatin, F.; Hantelys, F.; Adoue, A.; Helfer, A.C.; Cassant-Sourdy, S.; Pujol, F.; Gomez-Bouchet, A.; Ligat, L.; Lopez, F.; et al. Nucleolin Promotes Heat Shock-Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 4394–4405. [\[CrossRef\]](#)
31. Nanbru, C.; Lafon, I.; Audigier, S.; Gensac, M.C.; Vagner, S.; Huez, G.; Prats, A.C. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32061–32066. [\[CrossRef\]](#)
32. Oh, S.K.; Scott, M.P.; Sarnow, P. Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes Dev.* **1992**, *6*, 1643–1653. [\[CrossRef\]](#)
33. Prats, A.C.; Prats, H. Translational control of gene expression: Role of IRESs and consequences for cell transformation and angiogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2002**, *72*, 367–413.
34. Stoneley, M.; Paulin, F.E.; Le Quesne, J.P.; Chappell, S.A.; Willis, A.E. C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* **1998**, *16*, 423–428. [\[CrossRef\]](#)
35. Braunstein, S.; Karpisheva, K.; Pola, C.; Goldberg, J.; Hochman, T.; Yee, H.; Cangiarella, J.; Arju, R.; Formenti, S.C.; Schneider, R.J. A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 501–512. [\[CrossRef\]](#)

36. Bellodi, C.; Kopmar, N.; Ruggero, D. Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *Embo J.* **2010**, *29*, 1865–1876. [[CrossRef](#)]
37. Bonnal, S.; Pileur, F.; Orsini, C.; Parker, F.; Pujol, F.; Prats, A.C.; Vagner, S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4144–4153. [[CrossRef](#)]
38. Martineau, Y.; Le Bec, C.; Monbrun, L.; Allo, V.; Chiu, I.M.; Danos, O.; Moine, H.; Prats, H.; Prats, A.C. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 7622–7635. [[CrossRef](#)]
39. Karginov, T.A.; Pastor, D.P.H.; Semler, B.L.; Gomez, C.M. Mammalian Polycistronic mRNAs and Disease. *Trends Genet.* **2017**, *33*, 129–142. [[CrossRef](#)]
40. Arnaud, E.; Touriol, C.; Boutonnet, C.; Gensac, M.C.; Vagner, S.; Prats, H.; Prats, A.C. 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.* **1999**, *19*, 505–514. [[CrossRef](#)]
41. Huez, I.; Bornes, S.; Bresson, D.; Creancier, L.; Prats, H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 2197–2210. [[CrossRef](#)]
42. Prats, H.; Kaghad, M.; Prats, A.C.; Klagsbrun, M.; Lelias, J.M.; Liauzun, P.; Chalon, P.; Tauber, J.P.; Amalric, F.; Smith, J.A.; et al. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1836–1840. [[CrossRef](#)]
43. Nanbru, C.; Prats, A.C.; Droogmans, L.; Defrance, P.; Huez, G.; Kruys, V. Translation of the human c-myc P0 tricistronic mRNA involves two independent internal ribosome entry sites. *Oncogene* **2001**, *20*, 4270–4280. [[CrossRef](#)]
44. Xiong, Z.; Liu, E.; Yan, Y.; Silver, R.T.; Yang, F.; Chen, I.H.; Chen, Y.; Verstovsek, S.; Wang, H.; Prchal, J.; et al. An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 4907–4916. [[CrossRef](#)]
45. Hui, D.; Kumar, K.N.; Mach, J.R.; Srinivasan, A.; Pal, R.; Bao, X.; Agbas, A.; Hofner, G.; Wanner, K.T.; Michaelis, E.K. A rat brain bicistronic gene with an internal ribosome entry site codes for a phenacyclidine-binding protein with cytotoxic activity. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2245–2257. [[CrossRef](#)]
46. Bahar Halpern, K.; Veprik, A.; Rubins, N.; Naaman, O.; Walker, M.D. GPR41 gene expression is mediated by internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation of bicistronic mRNA encoding GPR40 and GPR41 proteins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20154–20163. [[CrossRef](#)]
47. Holcik, M.; Lefebvre, C.; Yeh, C.L.; Chow, T.; Korneluk, R.G. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 190–192. [[CrossRef](#)]
48. Coldwell, M.J.; Mitchell, S.A.; Stoneley, M.; MacFarlane, M.; Willis, A.E. Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* **2000**, *19*, 899–905. [[CrossRef](#)]
49. Ray, P.S.; Grover, R.; Das, S. Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *Embo Rep.* **2006**, *7*, 404–410. [[CrossRef](#)]
50. Stoneley, M.; Chappell, S.A.; Jopling, C.L.; Dickens, M.; MacFarlane, M.; Willis, A.E. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 1162–1169. [[CrossRef](#)]
51. Yang, D.Q.; Halaby, M.J.; Zhang, Y. 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* **2006**, *25*, 4613–4619. [[CrossRef](#)]
52. Holcik, M.; Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 318–327. [[CrossRef](#)]
53. 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](#)]
54. Audigier, S.; Guiramand, J.; Prado-Lourenco, L.; Conte, C.; Gonzalez-Herrera, I.G.; Cohen-Solal, C.; Recasens, M.; Prats, A.C. Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA* **2008**, *14*, 1852–1864. [[CrossRef](#)]

55. Gonzalez-Herrera, I.G.; Prado-Lourenco, L.; Pileur, F.; Conte, C.; Morin, A.; Cabon, F.; Prats, H.; Vagner, S.; Bayard, F.; Audigier, S.; et al. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *Faseb J.* **2006**, *20*, 476–478. [\[CrossRef\]](#)
56. Conte, C.; Ainaoui, N.; Delluc-Clavieres, A.; Khoury, M.P.; Azar, R.; Pujol, F.; Martineau, Y.; Pyronnet, S.; Prats, A.C. Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5267–5278. [\[CrossRef\]](#)
57. Creancier, L.; Mercier, P.; Prats, A.C.; Morello, D. c-myc Internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 1833–1840. [\[CrossRef\]](#)
58. Xue, S.; Tian, S.; Fujii, K.; Kladwang, W.; Das, R.; Barna, M. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* **2015**, *517*, 33–38. [\[CrossRef\]](#)
59. Weingarten-Gabbay, S.; Elias-Kirma, S.; Nir, R.; Gritsenko, A.A.; Stern-Ginossar, N.; Yakhini, Z.; Weinberger, A.; Segal, E. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **2016**, *351*, aad4939. [\[CrossRef\]](#)
60. Chappell, S.A.; LeQuesne, J.P.C.; Paulin, F.E.M.; deSchoolmeester, M.L.; Stoneley, M.; Soutar, R.L.; Ralston, S.H.; Helfrich, M.H.; Willis, A.E. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: A novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* **2000**, *19*, 4437–4440. [\[CrossRef\]](#)
61. Hudder, A.; Werner, R. Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34586–34591. [\[CrossRef\]](#)
62. Lambrechts, D.; Storkebaum, E.; Morimoto, M.; Del-Favero, J.; Desmet, F.; Marklund, S.L.; Wyns, S.; Thijs, V.; Andersson, J.; van Marion, I.; et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 383–394. [\[CrossRef\]](#)
63. 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. [\[CrossRef\]](#)
64. Ryoo, H.D.; Vasudevan, D. Two distinct nodes of translational inhibition in the Integrated Stress Response. *Bmb Rep.* **2017**, *50*, 539–545. [\[CrossRef\]](#)
65. Hinnebusch, A.G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 407–450. [\[CrossRef\]](#)
66. Fernandez, J.; Yaman, I.; Sarnow, P.; Snider, M.D.; Hatzoglou, M. Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 alpha. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19198–19205. [\[CrossRef\]](#)
67. Kang, M.J.; Vasudevan, D.; Kang, K.; Kim, K.; Park, J.E.; Zhang, N.; Zeng, X.M.; Neubert, T.A.; Marr, M.T.; Ryoo, H.D. 4E-BP is a target of the GCN2 ATF4 pathway during Drosophila development and aging. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 115–129. [\[CrossRef\]](#)
68. Thakor, N.; Holcik, M. IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2 alpha-independent manner during stress. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 541–552. [\[CrossRef\]](#)
69. Holcik, M. Could the eIF2 alpha-Independent Translation Be the Achilles Heel of Cancer? *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 264. [\[CrossRef\]](#)
70. Bornes, S.; Prado-Lourenco, L.; Bastide, A.; Zanibellato, C.; Iacovoni, J.S.; Lacazette, E.; Prats, A.C.; Touriol, C.; Prats, H. Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 305–308. [\[CrossRef\]](#)
71. Conte, C.; Riant, E.; Toutain, C.; Pujol, F.; Arnal, J.F.; Lenfant, F.; Prats, A.C. FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3078. [\[CrossRef\]](#)
72. Hantelys FGodet, A.C.; Tatin, F.; Renaud-Gabardos, E.; Pujol, F.A.I.; Ligat, L.; Henras, A.; Lacazette, E.; Parini, A.; Garmy-Susini, A. aPAC Vasohibin1, a new IRES trans-acting factor for sequential induction of angiogenic factors in hypoxia. *BioRxiv* **2019**. [\[CrossRef\]](#)
73. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

74. Yang, Y.; Wang, C.F.; Zhao, K.L.; Zhang, G.; Wang, D.C.; Mei, Y.D. TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 886. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Masaki, T.; Arend, K.C.; Li, Y.; Yamane, D.; McGivern, D.R.; Kato, T.; Wakita, T.; Moorman, N.J.; Lemon, S.M. miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 217–228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Sharathchandra, A.; Lal, R.; Khan, D.; Das, S. Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1429–1439. [\[CrossRef\]](#)
77. Fox, J.T.; Shin, W.K.; Caudill, M.A.; Stover, P.J. A UV-responsive internal ribosome entry site enhances serine hydroxymethyltransferase 1 expression for DNA damage repair. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 31097–31108. [\[CrossRef\]](#)
78. Zheng, Y.; Miskimins, W.K. CUG-binding protein represses translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 365–371. [\[CrossRef\]](#)
79. Hanson, P.J.; Ye, X.; Qiu, Y.; Zhang, H.M.; Hemida, M.G.; Wang, F.; Lim, T.; Gu, A.; Cho, B.; Kim, H.; et al. Cleavage of DAP5 by coxsackievirus B3 2A protease facilitates viral replication and enhances apoptosis by altering translation of IRES-containing genes. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 828–840. [\[CrossRef\]](#)
80. Henis-Korenblit, S.; Shani, G.; Sines, T.; Marash, L.; Shohat, G.; Kimchi, A. The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5400–5405. [\[CrossRef\]](#)
81. Henis-Korenblit, S.; Strumpf, N.L.; Goldstaub, D.; Kimchi, A. A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 496–506. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Lewis, S.M.; Holcik, M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* **2008**, *27*, 1033–1035. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Liberman, N.; Gandin, V.; Svitkin, Y.V.; David, M.; Virgili, G.; Jaramillo, M.; Holcik, M.; Nagar, B.; Kimchi, A.; Sonenberg, N. DAP5 associates with eIF2beta and eIF4A1 to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 3764–3775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Liberman, N.; Marash, L.; Kimchi, A. The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 204–209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Marash, L.; Liberman, N.; Henis-Korenblit, S.; Sivan, G.; Reem, E.; Elroy-Stein, O.; Kimchi, A. DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis. *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 447–459. [\[CrossRef\]](#)
86. Nevins, T.A.; Harder, Z.M.; Korneluk, R.G.; Holcik, M. Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3572–3579. [\[CrossRef\]](#)
87. Warnakulasuriyarachchi, D.; Cerquozzi, S.; Cheung, H.H.; Holcik, M. Translational induction of the inhibitor of apoptosis protein HIAP2 during endoplasmic reticulum stress attenuates cell death and is mediated via an inducible internal ribosome entry site element. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17148–17157. [\[CrossRef\]](#)
88. Weingarten-Gabbay, S.; Khan, D.; Liberman, N.; Yoffe, Y.; Bialik, S.; Das, S.; Oren, M.; Kimchi, A. The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA. *Oncogene* **2014**, *33*, 611–618. [\[CrossRef\]](#)
89. Lampe, S.; Kunze, M.; Scholz, A.; Brauss, T.F.; Winslow, S.; Simm, S.; Keller, M.; Heidler, J.; Wittig, I.; Brune, B.; et al. Identification of the TXNIP IRES and characterization of the impact of regulatory IRES trans-acting factors. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2018**, *1861*, 147–157. [\[CrossRef\]](#)
90. Tsai, B.P.; Wang, X.; Huang, L.; Waterman, M.L. Quantitative profiling of in vivo-assembled RNA-protein complexes using a novel integrated proteomic approach. *Mol. Cell Proteomics* **2011**, *10*, M110 007385. [\[CrossRef\]](#)
91. Cobbold, L.C.; Spriggs, K.A.; Haines, S.J.; Dobbyn, H.C.; Hayes, C.; de Moor, C.H.; Lilley, K.S.; Bushell, M.; Willis, A.E. Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 40–49. [\[CrossRef\]](#)
92. Woeller, C.F.; Fox, J.T.; Perry, C.; Stover, P.J. A ferritin-responsive internal ribosome entry site regulates folate metabolism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29927–29935. [\[CrossRef\]](#)

93. Malbert-Colas, L.; Ponnuswamy, A.; Olivares-Illana, V.; Tournillon, A.S.; Naski, N.; Fahraeus, R. HDMX folds the nascent p53 mRNA following activation by the ATM kinase. *Mol. Cell* **2014**, *54*, 500–511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Cammas, A.; Pileur, F.; Bonnal, S.; Lewis, S.M.; Leveque, N.; Holcik, M.; Vagner, S. Cytoplasmic relocation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 5048–5059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Jo, O.D.; Martin, J.; Bernath, A.; Masri, J.; Lichtenstein, A.; Gera, J. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site function through Akt signaling. (vol 283, pg 23274, 2008). *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 31268. [\[CrossRef\]](#)
96. Kim, H.J.; Lee, H.R.; Seo, J.Y.; Ryu, H.G.; Lee, K.H.; Kim, D.Y.; Kim, K.T. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates rhythmic synthesis of mouse Nfil3 protein via IRES-mediated translation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42882. [\[CrossRef\]](#)
97. Kunze, M.M.; Benz, F.; Brauss, T.F.; Lampe, S.; Weigand, J.E.; Braun, J.; Richter, F.M.; Wittig, I.; Brune, B.; Schmid, T. sST2 translation is regulated by FGF2 via an hnRNP A1-mediated IRES-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 848–859. [\[CrossRef\]](#)
98. Lewis, S.M.; Veyrier, A.; Hosszu Ungureanu, N.; Bonnal, S.; Vagner, S.; Holcik, M. Subcellular relocation of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 1302–1311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Roy, R.; Durie, D.; Li, H.; Liu, B.Q.; Skehel, J.M.; Mauri, F.; Cuorvo, L.V.; Barbareschi, M.; Guo, L.; Holcik, M.; et al. hnRNP A1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 12483–12497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Shi, Y.; Frost, P.J.; Hoang, B.Q.; Benavides, A.; Sharma, S.; Gera, J.F.; Lichtenstein, A.K. IL-6-induced stimulation of c-myc translation in multiple myeloma cells is mediated by myc internal ribosome entry site function and the RNA-binding protein, hnRNP A1. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 10215–10222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Shi, Y.; Yang, Y.; Hoang, B.; Bardeleben, C.; Holmes, B.; Gera, J.; Lichtenstein, A. Therapeutic potential of targeting IRES-dependent c-myc translation in multiple myeloma cells during ER stress. *Oncogene* **2016**, *35*, 1015–1024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Siculella, L.; Tocci, R.; Rochira, A.; Testini, M.; Gnani, A.; Damiano, F. Lipid accumulation stimulates the cap-independent translation of SREBP-1a mRNA by promoting hnRNP A1 binding to its 5'-UTR in a cellular model of hepatic steatosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 471–481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Christian, K.J.; Lang, M.A.; Raffalli-Mathieu, F. Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment. *Mol. Pharm.* **2008**, *73*, 1558–1567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Holcik, M.; Gordon, B.W.; Korneluk, R.G. The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 280–288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Kim, J.H.; Paek, K.Y.; Choi, K.; Kim, T.D.; Hahm, B.; Kim, K.T.; Jang, S.K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 708–720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Meng, Z.; Jackson, N.L.; Choi, H.; King, P.H.; Emanuel, P.D.; Blume, S.W. 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.* **2008**, *217*, 172–183. [\[CrossRef\]](#)
107. Schepens, B.; Tinton, S.A.; Bruynooghe, Y.; Parthoens, E.; Haegman, M.; Beyaert, R.; Cornelis, S. A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *Embo J.* **2007**, *26*, 158–169. [\[CrossRef\]](#)
108. Omnus, D.J.; Mehrtens, S.; Ritter, B.; Resch, K.; Yamada, M.; Frank, R.; Nourbakhsh, M.; Reboll, M.R. JKTBP1 is involved in stabilization and IRES-dependent translation of NRF mRNAs by binding to 5' and 3' untranslated regions. *J. Mol. Biol.* **2011**, *407*, 492–504. [\[CrossRef\]](#)
109. Reboll, M.R.; Oumard, A.; Gazdag, A.C.; Renger, I.; Ritter, B.; Schwarzer, M.; Hauser, H.; Wood, M.; Yamada, M.; Resch, K.; et al. NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14-nt RNA element. *RNA* **2007**, *13*, 1328–1340. [\[CrossRef\]](#)

110. Dobbyn, H.C.; Hill, K.; Hamilton, T.L.; Spriggs, K.A.; Pickering, B.M.; Coldwell, M.J.; de Moor, C.H.; Bushell, M.; Willis, A.E. Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene* **2008**, *27*, 1167–1174. [\[CrossRef\]](#)
111. Evans, J.R.; Mitchell, S.A.; Spriggs, K.A.; Ostrowski, J.; Bomsztyk, K.; Ostarek, D.; Willis, A.E. Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* **2003**, *22*, 8012–8020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Pickering, B.M.; Mitchell, S.A.; Evans, J.R.; Willis, A.E. Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 639–646. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Notari, M.; Neviani, P.; Santhanam, R.; Blaser, B.W.; Chang, J.S.; Galletta, A.; Willis, A.E.; Roy, D.C.; Caligiuri, M.A.; Marcucci, G.; et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood* **2006**, *107*, 2507–2516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Majumder, M.; Yaman, I.; Gaccioli, F.; Zeenko, V.V.; Wang, C.; Caprara, M.G.; Venema, R.C.; Komar, A.A.; Snider, M.D.; Hatzoglou, M. The hnRNA-binding proteins hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Mol. Cell Biol.* **2009**, *29*, 2899–2912. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Peddigari, S.; Li, P.W.; Rabe, J.L.; Martin, S.L. hnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 575–585. [\[CrossRef\]](#)
116. Seo, J.Y.; Kim, D.Y.; Kim, S.H.; Kim, H.J.; Ryu, H.G.; Lee, J.; Lee, K.H.; Kim, K.T. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) L promotes DNA damage-induced cell apoptosis by enhancing the translation of p53. *Oncotarget* **2017**, *8*, 51108–51122. [\[CrossRef\]](#)
117. Ainaoui, N.; Hantelys, F.; Renaud-Gabardos, E.; Bunel, M.; Lopez, F.; Pujol, F.; Planes, R.; Bahraoui, E.; Pichereaux, C.; Burlet-Schiltz, O.; et al. Promoter-Dependent Translation Controlled by p54nrb and hnRNPM during Myoblast Differentiation. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136466. [\[CrossRef\]](#)
118. Cho, S.; Park, S.M.; Kim, T.D.; Kim, J.H.; Kim, K.T.; Jang, S.K. BiP internal ribosomal entry site activity is controlled by heat-induced interaction of NSAP1. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*, 368–383. [\[CrossRef\]](#)
119. Choi, J.H.; Kim, S.H.; Jeong, Y.H.; Kim, S.W.; Min, K.T.; Kim, K.T. hnRNP Q regulates IRES-mediated *fmr1* translation in neurons. *Mol. Cell Biol.* **2018**. [\[CrossRef\]](#)
120. 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. hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 226–234. [\[CrossRef\]](#)
121. Kim, D.Y.; Woo, K.C.; Lee, K.H.; Kim, T.D.; Kim, K.T. hnRNP Q and PTB modulate the circadian oscillation of mouse *Rev-erb alpha* via IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7068–7078. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Kim, T.D.; Woo, K.C.; Cho, S.; Ha, D.C.; Jang, S.K.; Kim, K.T. Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian melatonin production. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 797–810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Lee, K.H.; Woo, K.C.; Kim, D.Y.; Kim, T.D.; Shin, J.; Park, S.M.; Jang, S.K.; Kim, K.T. Rhythmic interaction between *Period1* mRNA and hnRNP Q leads to circadian time-dependent translation. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 717–728. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Lee, H.R.; Kim, T.D.; Kim, H.J.; Jung, Y.; Lee, D.; Lee, K.H.; Kim, D.Y.; Woo, K.C.; Kim, K.T. Heterogeneous ribonucleoprotein R regulates arylalkylamine N-acetyltransferase synthesis via internal ribosomal entry site-mediated translation in a circadian manner. *J. Pineal Res.* **2015**, *59*, 518–529. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Badawi, A.; Biyance, A.; Nasrullah, U.; Winslow, S.; Schmid, T.; Pfeilschifter, J.; Eberhardt, W. Inhibition of IRES-dependent translation of caspase-2 by HuR confers chemotherapeutic drug resistance in colon carcinoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18367–18385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Durie, D.; Hatzoglou, M.; Chakraborty, P.; Holcik, M. HuR controls mitochondrial morphology through the regulation of BclxL translation. *Translation* **2013**, *1*, e23980. [\[CrossRef\]](#)
127. Durie, D.; Lewis, S.M.; Liwak, U.; Kisilewicz, M.; Gorospe, M.; Holcik, M. RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation. *Oncogene* **2011**, *30*, 1460–1469. [\[CrossRef\]](#)
128. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
129. Meng, Z.; King, P.H.; Nabors, L.B.; Jackson, N.L.; Chen, C.Y.; Emanuel, P.D.; Blume, S.W. The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2962–2979. [\[CrossRef\]](#)

130. Yeh, C.H.; Hung, L.Y.; Hsu, C.; Le, S.Y.; Lee, P.T.; Liao, W.L.; Lin, Y.T.; Chang, W.C.; Tseng, J.T. RNA-binding protein HuR interacts with thrombomodulin 5'untranslated region and represses internal ribosome entry site-mediated translation under IL-1 beta treatment. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 3812–3822. [[CrossRef](#)]
131. Gao, W.; Li, Q.; Zhu, R.; Jin, J. La Autoantigen Induces Ribosome Binding Protein 1 (RRBP1) Expression through Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Mediated Translation during Cellular Stress Condition. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Holcik, M.; Korneluk, R.G. Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: Role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 4648–4657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Kim, Y.K.; Back, S.H.; Rho, J.; Lee, S.H.; Jang, S.K. La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 5009–5016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Gu, L.; Zhu, N.; Zhang, H.; Durden, D.L.; Feng, Y.; Zhou, M. Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 363–375. [[CrossRef](#)]
135. Faye, M.D.; Graber, T.E.; Liu, P.; Thakor, N.; Baird, S.D.; Durie, D.; Holcik, M. Nucleotide composition of cellular internal ribosome entry sites defines dependence on NF45 and predicts a posttranscriptional mitotic regulon. *Mol. Cell Biol.* **2013**, *33*, 307–318. [[CrossRef](#)]
136. Spriggs, K.A.; Cobbold, L.C.; Ridley, S.H.; Coldwell, M.; Bottley, A.; Bushell, M.; Willis, A.E.; Siddle, K. The human insulin receptor mRNA contains a functional internal ribosome entry segment. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5881–5893. [[CrossRef](#)]
137. Chen, J.; Guo, K.; Kastan, M.B. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 16467–16476. [[CrossRef](#)]
138. Takagi, M.; Absalon, M.J.; McLure, K.G.; Kastan, M.B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **2005**, *123*, 49–63. [[CrossRef](#)]
139. Shen, W.; Liang, X.H.; Sun, H.; De Hoyos, C.L.; Crooke, S.T. Depletion of NEAT1 lncRNA attenuates nucleolar stress by releasing sequestered P54nrb and PSF to facilitate c-Myc translation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173494. [[CrossRef](#)]
140. Liwak, U.; Thakor, N.; Jordan, L.E.; Roy, R.; Lewis, S.M.; Pardo, O.E.; Seckl, M.; Holcik, M. Tumor Suppressor PDCD4 Represses Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Proteins and Is Regulated by S6 Kinase 2. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 1818–1829. [[CrossRef](#)]
141. Olson, C.M.; Donovan, M.R.; Spellberg, M.J.; Marr, M.T., 2nd. The insulin receptor cellular IRES confers resistance to eIF4A inhibition. *Elife* **2013**, *2*, e00542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Wang, Q.; Yang, H.S. The role of Pdc4 in tumour suppression and protein translation. *Biol. Cell* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Wedeken, L.; Singh, P.; Klempnauer, K.H. Tumor suppressor protein Pdc4 inhibits translation of p53 mRNA. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 42855–42862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Cho, S.; Kim, J.H.; Back, S.H.; Jang, S.K. Polypyrimidine tract-binding protein enhances the internal ribosomal entry site-dependent translation of p27Kip1 mRNA and modulates transition from G1 to S phase. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 1283–1297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Cobbold, L.C.; Wilson, L.A.; Sawicka, K.; King, H.A.; Kondrashov, A.V.; Spriggs, K.A.; Bushell, M.; Willis, A.E. Upregulated c-myc expression in multiple myeloma by internal ribosome entry results from increased interactions with and expression of PTB-1 and YB-1. *Oncogene* **2010**, *29*, 2884–2891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Cornelis, S.; Tinton, S.A.; Schepens, B.; Bruynooghe, Y.; Beyaert, R. UNR translation can be driven by an IRES element that is negatively regulated by polypyrimidine tract binding protein. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3095–3108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Dhar, D.; Venkataramana, M.; Ponnuswamy, A.; Das, S. Role of polypyrimidine tract binding protein in mediating internal initiation of translation of interferon regulatory factor 2 RNA. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7049. [[CrossRef](#)]
148. Grover, R.; Ray, P.S.; Das, S. Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2189–2198. [[CrossRef](#)]
149. Ismail, R.; Ul Hussain, M. The up regulation of phosphofructokinase1 (PFK1) protein during chemically induced hypoxia is mediated by the hypoxia-responsive internal ribosome entry site (IRES) element, present in its 5'untranslated region. *Biochimie* **2017**, *139*, 38–45. [[CrossRef](#)]

150. Kim, Y.K.; Hahn, B.; Jang, S.K. Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of bip mRNA. *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 119–133. [\[CrossRef\]](#)
151. Mitchell, S.A.; Spriggs, K.A.; Coldwell, M.J.; Jackson, R.J.; Willis, A.E. The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 757–771. [\[CrossRef\]](#)
152. Romanelli, M.G.; Diani, E.; Lievens, P.M.J. New Insights into Functional Roles of the Polypyrimidine Tract-Binding Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 22906–22932. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
153. Schepens, B.; Tinton, S.A.; Bruynooghe, Y.; Beyaert, R.; Cornelis, S. The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1 α IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6884–6894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
154. Yang, B.; Hu, P.; Lin, X.; Han, W.; Zhu, L.; Tan, X.; Ye, F.; Wang, G.; Wu, F.; Yin, B.; et al. PTBP1 induces ADAR1 p110 isoform expression through IRES-like dependent translation control and influences cell proliferation in gliomas. *Cell Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 4383–4397. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
155. Halaby, M.J.; Harris, B.R.; Miskimins, W.K.; Cleary, M.P.; Yang, D.Q. Deregulation of Internal Ribosome Entry Site-Mediated p53 Translation in Cancer Cells with Defective p53 Response to DNA Damage. *Mol. Cell Biol.* **2015**, *35*, 4006–4017. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
156. Khan, D.; Chattopadhyay, S.; Das, S. Influence of metabolic stress on translation of p53 isoforms. *Mol. Cell Oncol.* **2016**, *3*, e1039689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
157. Bisio, A.; Latorre, E.; Andreotti, V.; Bressac-de Paillerets, B.; Harland, M.; Scarra, G.B.; Ghiorzo, P.; Spitale, R.C.; Provenzano, A.; Inga, A. The 5'-untranslated region of p16INK4a melanoma tumor suppressor acts as a cellular IRES, controlling mRNA translation under hypoxia through YBX1 binding. *Oncotarget* **2015**, *6*, 39980–39994. [\[CrossRef\]](#)
158. Marr, M.T., 2nd; D'Alessio, J.A.; Puig, O.; Tjian, R. IRES-mediated functional coupling of transcription and translation amplifies insulin receptor feedback. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 175–183. [\[CrossRef\]](#)
159. Li, M.; Pehar, M.; Liu, Y.; Bhattacharyya, A.; Zhang, S.C.; O'Riordan, K.J.; Burger, C.; D'Adamio, L.; Puglielli, L. The amyloid precursor protein (APP) intracellular domain regulates translation of p44, a short isoform of p53, through an IRES-dependent mechanism. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36*, 2725–2736. [\[CrossRef\]](#)
160. Miura, P.; Coriati, A.; Belanger, G.; De Repentigny, Y.; Lee, J.; Kothary, R.; Holcik, M.; Jasmin, B.J. The utrophin A 5'-UTR drives cap-independent translation exclusively in skeletal muscles of transgenic mice and interacts with eEF1A2. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1211–1220. [\[CrossRef\]](#)
161. Spriggs, K.A.; Cobbald, L.C.; Jopling, C.L.; Cooper, R.E.; Wilson, L.A.; Stoneley, M.; Coldwell, M.J.; Poncet, D.; Shen, Y.C.; Morley, S.J.; et al. Canonical initiation factor requirements of the Myc family of internal ribosome entry segments. *Mol. Cell Biol.* **2009**, *29*, 1565–1574. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
162. Thakor, N.; Smith, M.D.; Roberts, L.; Faye, M.D.; Patel, H.; Wieden, H.J.; Cate, J.H.D.; Holcik, M. Cellular mRNA recruits the ribosome via eIF3-PABP bridge to initiate internal translation. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 553–567. [\[CrossRef\]](#)
163. Morrison, J.K.; Friday, A.J.; Henderson, M.A.; Hao, E.; Keiper, B.D. Induction of cap-independent BiP (hsp-3) and Bcl-2 (ced-9) translation in response to eIF4G (IFG-1) depletion in *C. elegans*. *Translation* **2014**, *2*, e28935. [\[CrossRef\]](#)
164. Horos, R.; Ijspeert, H.; Pospisilova, D.; Sendtner, R.; Andrieu-Soler, C.; Taskesen, E.; Nieradka, A.; Cmejla, R.; Sendtner, M.; Touw, I.P.; et al. Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* **2012**, *119*, 262–272. [\[CrossRef\]](#)
165. Hertz, M.I.; Landry, D.M.; Willis, A.E.; Luo, G.X.; Thompson, S.R. Ribosomal Protein S25 Dependency Reveals a Common Mechanism for Diverse Internal Ribosome Entry Sites and Ribosome Shunting. *Mol. Cell Biol.* **2013**, *33*, 1016–1026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. Shi, Z.; Fujii, K.; Kovary, K.M.; Genuth, N.R.; Rost, H.L.; Teruel, M.N.; Barna, M. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 71–83 e77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
167. Zhang, C.; Zhang, M.; Wu, Q.; Peng, J.; Ruan, Y.; Gu, J. Hepsin inhibits CDK1p58 IRES activity by suppressing unr expression and eIF-2 α phosphorylation in prostate cancer. *Cell Signal* **2015**, *27*, 789–797. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

168. Lin, W.; Wadlington, N.L.; Chen, L.; Zhuang, X.; Brorson, J.R.; Kang, U.J. Loss of PINK1 attenuates HIF-1 α induction by preventing 4E-BP1-dependent switch in protein translation under hypoxia. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 3079–3089. [CrossRef] [PubMed]
169. Veklavas, C.; Zinn, K.R.; Samuel, S.L.; Meng, Z.; Grizzle, W.E.; Choi, H.; Blume, S.W. Translational control of the undifferentiated phenotype in ERpositive breast tumor cells: Cytoplasmic localization of ER α and impact of IRES inhibition. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 2482–2498. [PubMed]
170. Kampen, K.R.; Sulima, S.O.; Verbelen, B.; Girardi, T.; Vereecke, S.; Rinaldi, G.; Verbeeck, J.; Op de Beeck, J.; Uytendaele, A.; Meijerink, J.P.P.; et al. The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* **2018**. [CrossRef]
171. Kolupaeva, V.G.; Hellen, C.U.; Shatsky, I.N. 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* **1996**, *2*, 1199–1212. [PubMed]
172. Kafasla, P.; Morgner, N.; Poyry, T.A.; Curry, S.; Robinson, C.V.; Jackson, R.J. Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Mol. Cell* **2009**, *34*, 556–568. [CrossRef] [PubMed]
173. Carvajal, F.; Vallejos, M.; Walters, B.; Contreras, N.; Hertz, M.L.; Olivares, E.; Caceres, C.J.; Pino, K.; Letelier, A.; Thompson, S.R.; et al. Structural domains within the HIV-1 mRNA and the ribosomal protein S25 influence cap-independent translation initiation. *FEBS J.* **2016**, *283*, 2508–2527. [CrossRef]
174. Olivares, E.; Landry, D.M.; Caceres, C.J.; Pino, K.; Rossi, F.; Navarrete, C.; Huidobro-Toro, J.P.; Thompson, S.R.; Lopez-Lastra, M. The 5' Untranslated Region of the Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 mRNA Enables Cap-Independent Translation Initiation. *J. Virol.* **2014**, *88*, 5936–5955. [CrossRef]
175. Ji, B.; Harris, B.R.E.; Liu, Y.H.; Deng, Y.B.; Gradilone, S.A.; Cleary, M.P.; Liu, J.H.; Yang, D.Q. Targeting IRES-Mediated p53 Synthesis for Cancer Diagnosis and Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, E93. [CrossRef] [PubMed]
176. Johnson, A.G.; Grosely, R.; Petrov, A.N.; Puglisi, J.D. Dynamics of IRES-mediated translation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160177. [CrossRef] [PubMed]
177. Boehringer, D.; Thermann, R.; Ostareck-Lederer, A.; Lewis, J.D.; Stark, H. Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: Remodeling of the HCV IRES. *Structure* **2005**, *13*, 1695–1706. [CrossRef]
178. Spahn, C.M.; Kieft, J.S.; Grassucci, R.A.; Penczek, P.A.; Zhou, K.; Doudna, J.A.; Frank, J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. *Science* **2001**, *291*, 1959–1962. [CrossRef]
179. Fernandez, I.S.; Bai, X.C.; Murshudov, G.; Scheres, S.H.; Ramakrishnan, V. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell* **2014**, *157*, 823–831. [CrossRef]
180. Hashem, Y.; des Georges, A.; Dhote, V.; Langlois, R.; Liao, H.Y.; Grassucci, R.A.; Pestova, T.V.; Hellen, C.U.; Frank, J. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature* **2013**, *503*, 539–543. [CrossRef]
181. Quade, N.; Boehringer, D.; Leibundgut, M.; van den Heuvel, J.; Ban, N. Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7646. [CrossRef]
182. Yamamoto, H.; Collier, M.; Loerke, J.; Ismer, J.; Schmidt, A.; Hilal, T.; Sprink, T.; Yamamoto, K.; Mielke, T.; Burger, J.; et al. Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA. *Embo J.* **2015**, *34*, 3042–3058. [CrossRef] [PubMed]
183. Damiano, F.; Rochira, A.; Tocci, R.; Alemanno, S.; Gnoni, A.; Siculella, L. hnRNP A1 mediates the activation of the IRES-dependent SREBP-1a mRNA translation in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem. J.* **2013**, *449*, 543–553. [CrossRef] [PubMed]
184. Lin, J.C.; Hsu, M.; Tarn, W.Y. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2235–2240. [CrossRef] [PubMed]
185. Gao, G.; Dhar, S.; Bedford, M.T. PRMT5 regulates IRES-dependent translation via methylation of hnRNP A1. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 4359–4369. [CrossRef] [PubMed]
186. Dorrello, N.V.; Peschiaroli, A.; Guardavaccaro, D.; Colburn, N.H.; Sherman, N.E.; Pagano, M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* **2006**, *314*, 467–471. [CrossRef]

187. Suk, F.M.; Lin, S.Y.; Lin, R.J.; Hsine, Y.H.; Liao, Y.J.; Fang, S.U.; Liang, Y.C. Bortezomib inhibits Burkitt's lymphoma cell proliferation by downregulating sumoylated hnRNP K and c-Myc expression. *Oncotarget* **2015**, *6*, 25988–26001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
188. Lu, J.; Gao, F.H. Role and molecular mechanism of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development and progression. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 657–663. [\[CrossRef\]](#)
189. Pickering, B.M.; Mitchell, S.A.; Spriggs, K.A.; Stoneley, M.; Willis, A.E. 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.* **2004**, *24*, 5595–5605. [\[CrossRef\]](#)
190. Braunschweig, U.; Guerousov, S.; Plocik, A.M.; Graveley, B.R.; Blencowe, B.J. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* **2013**, *152*, 1252–1269. [\[CrossRef\]](#)
191. Pestova, T.V.; Shatsky, I.N.; Hellen, C.U. Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: The 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 6870–6878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
192. Pestova, T.V.; Hellen, C.U.; Shatsky, I.N. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 6859–6869. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
193. Sizova, D.V.; Kolupaeva, V.G.; Pestova, T.V.; Shatsky, I.N.; Hellen, C.U. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.* **1998**, *72*, 4775–4782. [\[PubMed\]](#)
194. Pestova, T.V.; de Breyne, S.; Pisarev, A.V.; Abaeva, I.S.; Hellen, C.U. eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: A common role of domain II. *Embo J.* **2008**, *27*, 1060–1072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
195. Balagopal, V.; Parker, R. Polysomes, P bodies and stress granules: States and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 403–408. [\[CrossRef\]](#)
196. Borghese, F.; Michiels, T. The leader protein of cardiociruses inhibits stress granule assembly. *J. Virol.* **2011**, *85*, 9614–9622. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
197. Guil, S.; Long, J.C.; Caceres, J.F. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 5744–5758. [\[CrossRef\]](#)
198. Galan, A.; Lozano, G.; Pineiro, D.; Martinez-Salas, E. G3BP1 interacts directly with the FMDV IRES and negatively regulates translation. *FEBS J.* **2017**, *284*, 3202–3217. [\[CrossRef\]](#)
199. Fujimura, K.; Katahira, J.; Kano, F.; Yoneda, Y.; Murata, M. Selective localization of PCBP2 to cytoplasmic processing bodies. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 878–887. [\[CrossRef\]](#)
200. Fierro-Monti, I.; Mohammed, S.; Matthiesen, R.; Santoro, R.; Burns, J.S.; Williams, D.J.; Proud, C.G.; Kassem, M.; Jensen, O.N.; Roepstorff, P. Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1367–1378. [\[CrossRef\]](#)
201. Pacheco, A.; Lopez de Quinto, S.; Ramajo, J.; Fernandez, N.; Martinez-Salas, E. A novel role for Gemin5 in mRNA translation. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 582–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
202. Majzoub, K.; Hafirassou, M.L.; Meignin, C.; Goto, A.; Marzi, S.; Fedorova, A.; Verdier, Y.; Vinh, J.; Hoffmann, J.A.; Martin, F.; et al. RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* **2014**, *159*, 1086–1095. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
203. Yu, Y.; Ji, H.; Doudna, J.A.; Leary, J.A. Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: Native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1438–1446. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
204. Colon-Ramos, D.A.; Shenvi, C.L.; Weitzel, D.H.; Gan, E.C.; Matts, R.; Cate, J.; Kornbluth, S. Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 103–111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
205. Yoo, S.J.; Huh, J.R.; Muro, I.; Yu, H.; Wang, L.; Wang, S.L.; Feldman, R.M.; Clem, R.J.; Muller, H.A.; Hay, B.A. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 416–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
206. Hernandez, G.; Vazquez-Pianzola, P.; Sierra, J.M.; Rivera-Pomar, R. Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* **2004**, *10*, 1783–1797. [\[CrossRef\]](#)
207. Vazquez-Pianzola, P.; Hernandez, G.; Suter, B.; Rivera-Pomar, R. Different modes of translation for hid, grim and sickle mRNAs in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 286–295. [\[CrossRef\]](#)

208. Fuchs, G.; Diges, C.; Kohlstaedt, L.A.; Wehner, K.A.; Sarnow, P. Proteomic analysis of ribosomes: Translational control of mRNA populations by glycogen synthase GYS1. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 118–130. [[CrossRef](#)]
209. Francisco-Velilla, R.; Fernandez-Chamorro, J.; Ramajo, J.; Martinez-Salas, E. The RNA-binding protein Gemin5 binds directly to the ribosome and regulates global translation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8335–8351. [[CrossRef](#)]
210. Pineiro, D.; Fernandez, N.; Ramajo, J.; Martinez-Salas, E. Gemin5 promotes IRES interaction and translation control through its C-terminal region. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1017–1028. [[CrossRef](#)]
211. Xue, S.; Barna, M. Specialized ribosomes: A new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 355–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Landry, D.M.; Hertz, M.I.; Thompson, S.R. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2753–2764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 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/>).



Invited Review Article

How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms?

Leïla Halidou Diallo, Florence Tatin, Florian David, Anne-Claire Godet, Audrey Zamora, Anne-Catherine Prats, Barbara Garmy-Susini, Eric Lacazette*

UMR 1048-I2MC, Université de Toulouse UT3, INSERM, 1 Avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432, Toulouse, Cedex 4, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2019

Accepted 27 June 2019

Available online 29 June 2019

Keywords:

circRNA

Translation

IRES

N6-methyladenosine

ABSTRACT

Circular RNAs (circRNAs) are covalently closed RNA loops produced by a very large number of expressed eukaryotic genes. Initially considered as splicing background and/or splicing side products, recent studies have shown that they are evolutionary conserved and abundant in cells. Yet, their functions remain largely unknown. Because of their circular shape, they were initially categorized as non-coding RNAs. However, recent studies based on mass spectrometry analysis indicate that some cytoplasmic circRNAs are effectively translated into detectable peptides. This raises the interesting question of which mechanisms regulate the translation initiation of those circular transcripts, i.e. unable to recruit the small ribosome subunit through the 5' cap. A possible mechanism for alternative translation initiation is the presence of an IRES (Internal Ribosome Entry Site) that allows direct recruitment of initiation factors and ribosomes on the RNA independently from the cap. This is the case for several circRNAs that exhibit IRES upstream from the start codon. Yet, another process seems to be involved in initiating the translation of circRNAs: the presence of N⁶-methyladenosine (m⁶A) residues. These m⁶A can promote cap-independent translation and have been shown to be enriched in circRNAs. Interestingly, these two alternative translation initiation processes are generally activated under cellular stress to allow expression of specific stress response genes. These discoveries therefore link circRNA translation to cellular response to stress conditions, raising new enquiries about the regulation of circRNA expression under stress conditions and their functions. This review provides a state of the art on this emerging area.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

Contents

1. Introduction	46
2. circRNA translation	47
2.1. Cap-independent translation initiation mechanisms	48
2.2. IRES driven circRNA translation	49
2.2.1. IRES-driven translation of circZNF609	49
2.2.2. IRES-driven translation of circMbl	49
2.2.3. IRES-driven translation of circSHPRH	49
2.2.4. IRES-driven translation of circFBXW7	49
2.2.5. IRES-driven translation of circLINC-PINT	50
2.2.6. IRES-driven translation of circβ-catenin	50
2.3. m ⁶ A driven circRNA translation	50
3. Translation of synthetic circular RNAs	50
Outlook	51
Conflict of interest	51
Declaration of interests	51
Author agreement	51

* Corresponding author. INSERM U1048, 1 avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432, Toulouse, France.

E-mail address: eric.lacazette@inserm.fr (E. Lacazette).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.015>

0300-9084/© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Circular RNAs (circRNAs) are endogenous to eukaryotic cells. Discovered more than 25 years ago, circRNAs have for long been considered as irrelevant artefacts of RNA processing [1,2]. However, recent studies have uncovered their peculiar properties and large scale involvement in physiological and pathological gene expression [3–6]. Indeed, data arising from RNA-seq projects demonstrated the significant amount of circRNAs in eukaryotic cell and the evolutionary conservation of this new category of RNAs, clearly stating that they are not merely splicing background. The first article describing a massive presence of circular RNAs in eukaryotic cells was from Salzman et al. [7]. In that study, the authors aimed to identify cancer-specific exon scrambling events, corresponding to non-colinear exon junctions. For this, they selected and analyzed non-colinear sequencing reads, evidence of “scrambled” exons and potential circRNAs in RNA-seq data. In this article they identified a total of 2748 scrambled isoforms, or circRNAs, in HeLa and H9 embryonic cells. At the same time, a study conducted by Memczak et al. extended the exploration to different species and led to the identification of approximately 2000 circRNA in humans, 1900 in mice and 700 in nematodes and showed that circRNAs are often expressed with specific expression patterns depending on tissues or developmental stages [8]. Subsequently, Jeck et al. modified the approach by adding a 3' exoribonuclease (RNase R) treatment prior to sequencing, thus enriching the population of circular RNAs in the samples. This enhancement led to the identification of a significantly higher number of circular RNAs, and the results suggested that 14.4% of actively transcribed genes produced circular RNAs in human fibroblasts [9]. It is also the development of specific bioinformatics tools, based on split mapping of RNA-seq reads, that allowed the efficient prediction of circular RNAs from RNA-seq data [8,10–13].

A relatively large number of actively transcribed genes generate circular RNAs in mammalian cells. They mostly originate from coding genes by a spliceosome-mediated alternative splicing of the pre-messenger RNA called backsplicing [3,7–9,14]. Using the spliceosome to link a splice acceptor (3' splice site) to a downstream splice donor (5' splice site) on the same exon or further, circRNA biogenesis can compete with the maturation of its linear counterpart [7–9,15,16]. This non-colinear splicing forms a backspliced junction specific to each circular RNA species and absent from the canonical linear RNAs. This process is promoted by the presence of complementary inverted repeats and RNA binding proteins (RBPs) binding motifs in introns flanking the two splice sites (Fig. 1). The pairing of complementary sequences or formation of RBP dimers brings the circularized exons close together [9,14,17–19]. In primates, Alu repeats are the most abundant form of repeated sequences and have thus been associated with circRNA biogenesis in human cells. Formation of these double stranded RNA structures can also imply *trans*-acting RBPs that will modulate backsplicing either positively, by stabilizing the structure as is the case with NF90/NF110, or negatively, by destabilising the base-pairing like the editing enzyme adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR1) [20,21].

The covalently closed circular structure of circRNAs renders them resistant to 3' or 5' exoribonucleases. From this characteristic derives their high stability with a half-life reaching up to 10 times that of linear RNAs (median half-life 2.5 times longer on 60

analyzed circRNAs) [22]. In eukaryotes, the length of circRNAs is variable but tends to average between 200 and 800 nucleotides (nt) with a range of 100–4000 nt in length [23]. One estimate that in humans, circular RNA may account for 1% as many molecules as poly (A) RNA [7].

On the functional level, circRNAs are tuned to retain tissue and developmental stage specificity and can be sensitive to cellular stresses [8,24]. They could also be involved in pathological processes such as cancer [25,26]. The circular transcripts have well-conserved sequences among eukaryotes. Based on the type of sequences they contain, they are divided into exonic (EcRNA), intronic (CiRNA) which have a different biogenesis mechanism and exon-intron (EiRNA) circRNAs. Like in other RNAs, these differences in structure and sequence define their sub-cellular localisation and function [27,28] (Fig. 1). Some intronic and exon-intron circRNAs are reported to be sequestered in the nucleus [27,29], while exonic circRNAs are mostly exported to the cytosol via a length-dependent mechanism involving *drosophila*'s Hel25E dead-box helicase and its homologues in human cells [30]. Circular RNAs are predominantly exonic and thus predominantly cytosolic [7,9].

In the nucleus, circRNAs participate in gene expression regulation at different levels. First, circRNA biogenesis is largely post-transcriptional and use the canonical splicing apparatus, thus competing with the maturation of its linear counterparts [15,16,31,32]. Second, exemplified by circPAIP2 in human cells, intronic and exon-intron circRNAs have been described as transcriptional regulators of their parental genes by interacting with RNA polymerase II, snRNPs and hnRNPs [27,29,33] (Fig. 1 (1-1)).

In the cytoplasm there is an accumulation of EcRNAs with two types of functional outcomes described so far. Firstly, because they share parts of the mature linear RNA sequence, exonic circRNAs act as competing endogenous RNAs, sequestering microRNAs (miRs) and RBPs away from their cytosolic targets (Fig. 1 (1-2)). For example, one of the first and most studied circRNAs, circCDR1as/ciRS-7 in brain tissue harbours 63 conserved binding sites for miR7, acting as an effective miR7 sponge. Over-expression of the human circCDR1as/ciRS-7 revealed a negative impact on brain development in zebrafish [8,28]. CircRNA interaction with RBPs is illustrated by the cases of circMbl and circFoxo3. The *drosophila* muscleblind gene (Mbl) produces a circular RNA (circMbl) when the Mbl protein, involved in circRNA biogenesis, accumulates. CircMbl then binds and retains the excessive Mbl protein [34]. In mammalian cells the tumour suppressor gene Foxo3 generates a circRNA (circFoxo3) that regulates cell cycle progression by binding to cell division protein kinase 2 (CDK2) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) [35]. Hence, circRNAs participate in miR and RBP transportation, storage and availability creating yet new ways of post-transcriptional regulation.

In addition, interesting recent studies have shown that a subset of exonic circRNAs is found associated with polysomes and most of them comprise the native start codon of their mRNA counterparts and exhibit favourable open reading frames [25,26,36–43]. This revealed an unexpected translation potential for circRNAs. Originally mislabelled as “noncoding”, circRNAs can actually be translated into regulatory peptides (Fig. 1 (1-3)). These observations nevertheless raise the question of translation initiation for this particular class of circular transcripts.

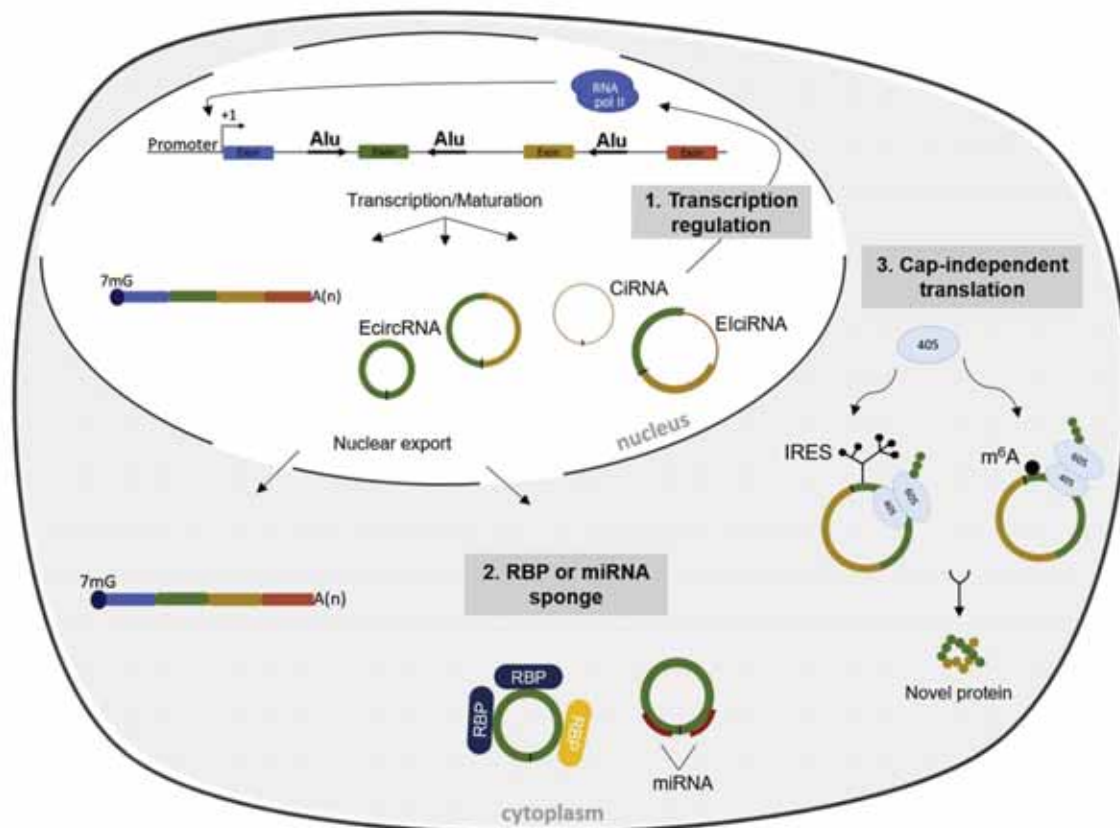


Fig. 1. Circular RNAs biogenesis and functions. Circular RNA (circRNA) biogenesis uses an alternative splicing mechanism called backsplicing, which is facilitated by inverted Alu repeats (thick arrows) in flanking introns. Once generated, circRNAs engage in different paths depending on their structure. CircRNAs are either strictly exonic (EcRNA: Exonic circRNA) or intronic (CIRNA: Circular intronic RNA) or comprised of both intron and exon (EciRNA: Exon-Intron circRNAs) (1.) CIRNA and EciRNA are sequestered in the nucleus. The latter can participate in the transcriptional regulation of their parental gene expression by interacting with the RNA polymerase II (RNA pol II) and other snRNP partners like snRNP1. Exonic circRNAs are exported from the nucleus via length-dependent mechanisms involving evolutionarily conserved helicases. In the cytosol exonic circRNAs have two known functions. (2.) They can act as endogenous competing transcripts by sponging RNA binding proteins (RBPs) or microRNAs (miRNA), participating in their transport and luring them away from their targets. (3.) Finally, circRNAs can be translated. Translation initiation can occur via two alternative cap-independent mechanisms: the presence of an internal ribosome entry site (IRES) or a N⁶-methyladenosine (m⁶A) motif. These structures allow the internal recruitment of the 40S ribosomal subunit. The resulting proteins then participate in multiple cellular functions.

2. circRNA translation

The question of circRNAs translation in cells is highly relevant since they are mainly cytoplasmic and comprised of exonic sequences (EcRNAs), often carrying an initiator codon and sometimes the canonical AUG of the associated mRNA with potential open reading frames. In addition, Chen and Sarnow have proven, in early studies in 1995, that synthetic circular RNAs could recruit the 40S ribosomal subunit and initiate translation of detectable peptides in human cells through an internal entry site [44]. However, that study does not investigate the case of endogenous circRNA molecules. Therefore, several teams investigated whether endogenous circular RNAs were translated. The early results provided rather negative responses to that problematic. In a first study Jeck et al. selected three EcRNAs that had a translation start site (common with the corresponding mRNA) and found out that they were absent from the polysome fraction [9]. This indicated that these three circular RNAs were not bound to the ribosomes and therefore not

translated. Another study, by Guo et al. systematically searched for evidence of circRNA translation by examining data from ribosome footprinting of non-poly(A) selected RNA-Seq [45]. They concluded that no evidence supported the possibility of circRNAs undergoing translation in cells. The only demonstration of EcRNAs translation by ribosome footprinting is the detection of reads spanning the backsplicing junctions. In this case, it is presumably this constraint combined with the lesser abundance of circRNAs, compared with corresponding linear RNAs, that could explain these results (i.e., no evidence of circRNA translation). In a later study, Schneider et al. investigated the association of circRNAs with proteins by sucrose gradient fractionation [46]. Like the study by Jeck et al. they focused on a limited number of abundant circRNAs and failed to find any association with polysomes. Despite these negative responses, the investigations continued and, from 2017 to this date, seven distinct circular RNAs have been deemed translated in human cells and, for some, the function of the deriving peptide have been identified [25,26,36,40,47–49]. In addition to that, a recent large scale study

by Ragan et al., identified circRNAs with a great potential of translation [50]. By performing TriP-seq (Transcript Isoform in Polysomes sequencing [51]) they found approximately 15% of all circRNA read counts in the ribosomal fraction, representing 177 potentially translated circRNA candidates in HEK293 cells [50]. Most of these candidates for translation are associated with the monosomal to tetrasomal fractions, whereas linear mRNAs are mostly associated with hepta and octasomal fractions. These results, considering the seven studies mentioned above, support the coding potential of many more endogenous circular RNAs and raises the question of the mechanisms by which their translation is initiated.

2.1. Cap-independent translation initiation mechanisms

The circular structure of circRNAs necessarily implies a cap-independent and internal mechanism to initiate translation. Indeed, eukaryotic mRNAs have their 5' end modified by the presence of a m7G (7-methyl guanosine) cap which is recognized by the eIF4E translation initiation factor [52]. The eIF4E factor combines with eIF4G (a scaffold protein) and eIF4A (an helicase protein) to form the eIF4F complex [53,54]. The interaction between eIF4E and the cap is modulated by the mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) kinase pathway (Fig. 2). When the cells are submitted to a stress like hypoxia, nutrient starvation, oxidative stress, etc ... the mTOR kinase is inactivated, leading to an overall inhibition of the cap-dependent translation due to hypophosphorylation of 4E-BPs (eIF4E-binding proteins).

Hypophosphorylated 4E-BPs compete with eIF4G for eIF4E binding and thus prevent eIF4F assembly and the 43S ribosome recruitment at the 5' end of the transcripts [55] (Fig. 2). This is one of the main pathways for translation initiation control in eukaryotes [56]. The other major mean to modulate translation initiation is through the eIF2 α factor phosphorylation. A number of serine kinases phosphorylate eIF2 α . Those kinases are activated by stresses such as amino acid deprivation (GCN2), ER stress (PERK), the presence of dsRNA (PKR), heme deficiency (HRI) or interferon [57]. When eIF2 α initiation factor is phosphorylated, there is a blockade of GDP to GTP exchange in the eIF2 complex, which in turn prevents the assembly of the ternary complex eIF2-GTP-tRNA^{Met}. Thus, during stress, the cap-dependent translation is largely inhibited [58]. Nevertheless, a subset of messenger RNAs maintain their translation during stress by using cap-independent translation initiation mechanisms [59,60].

One possibility in the cells, for cap-independent translation initiation, is the presence of an IRES (Internal Ribosome Entry site) structure in the 5'UTR of mRNAs. IRESs are sequences that form secondary structures on RNA and allow translation initiation in the total or partial absence of canonical translation initiation factors, replaced by ITAFs (IRES Tran-Acting Factors) (for review, see Ref. [61]). Although eIF2 α is, in principle, required for the initiation of cap-dependent and cap-independent translation, several reports have shown that IRES-dependent translation can occur despite eIF2 α phosphorylation [62]. The first IRES elements have been discovered in viruses [63] but are also present in the 5'UTR of many cellular mRNAs like the immunoglobulin heavy-chain binding

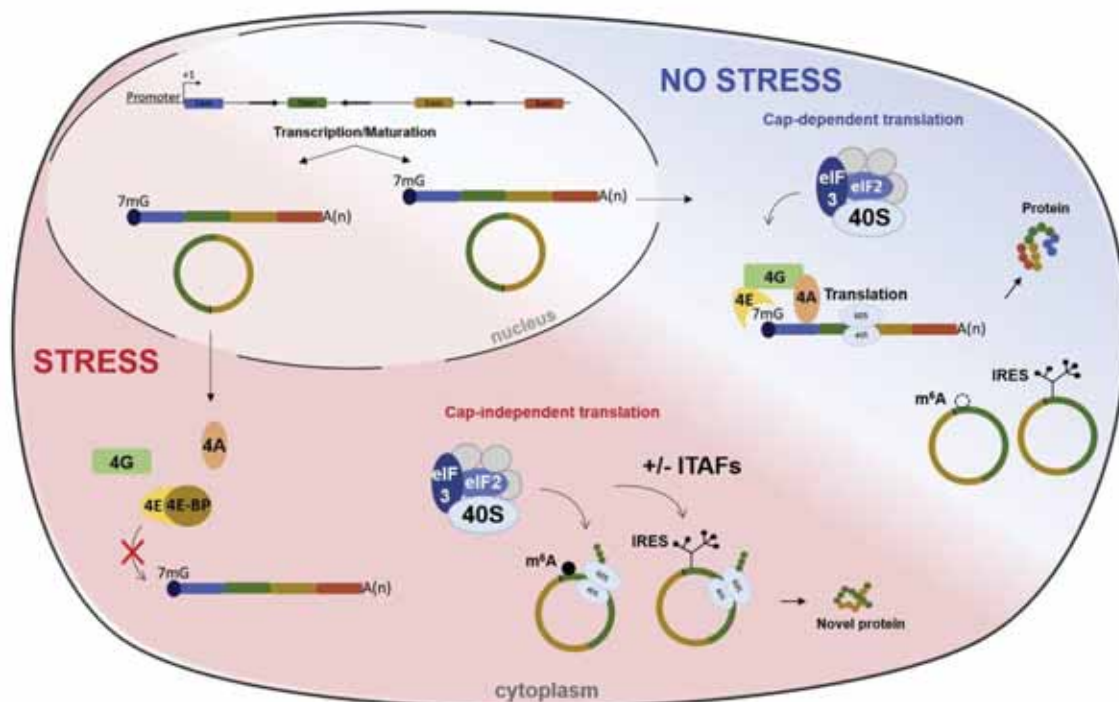


Fig. 2. Circular RNA translation. Without any stress, cytoplasmic circRNA may not be translated because cap-dependent translation is predominant. For IRES-dependent translation initiation, ITAFs may be inactive or absent; for m⁶A dependent translation initiation, m⁶A may be erased or m⁶A reader absent or inactive. Under stress conditions cap-dependent translation is repressed and circRNA translation is favoured through IRES activation due to the presence of ITAFs, or ITAF activation, or through methylation of adenosines (m⁶A) or the presence of m⁶A readers. circRNA are translated and produce detectable proteins.

protein (BiP) mRNA, the fibroblast growth factor (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNAs [61,64]. On cellular mRNAs, IRESs are particularly functional under stressful conditions. They allow the maintenance or activation of translation for a pool of RNAs equipped with IRESs, providing the cell with important proteins for its survival. These genes include master regulators like transcription factors, growth factors, etc ...

Another mechanism described recently is the cap-independent translation initiation under stress through methylated adenosine residues in the form of N⁶-methyladenosines (m⁶A) in the 5' untranslated region (5'UTR) of some transcripts [65]. 5'UTR m⁶A residues can directly recruit the eukaryotic initiation factor 3 (eIF3), which is sufficient to recruit the 43S complex and initiate translation in the absence of the cap-binding factor eIF4E. 5'UTR m⁶A residues can also modulate translation initiation during integrated stress response by redirecting ribosomes on different ORFs. This is illustrated by the case of ATF4 mRNA, which is regulated by both the eIF2 α signaling pathway and the presence of m⁶A residues, upon amino acid starvation [66]. Indeed, ATF4 mRNA is m⁶A methylated in the uORF2 located in the 5'UTR. This methylation is decreased upon amino acid starvation in a ALKBH5 and FTO demethylase-dependent manner. In fact, ribosome retention increases on the uORF2 m⁶A residues, leading to a slower ribosome scanning, which in turn promotes translation initiation at non-canonical upstream initiation sites. Ultimately, there is a decrease of translation initiation on ATF4 main ORF. This concept has been enlarged to other transcripts by global profiling of m⁶A and translation initiation sites occupancy [66]. Thus, both m⁶A and IRES dependent translation initiation are potential mechanisms for cytoplasmic circular RNAs translation (Fig. 2).

To date, only seven translated circRNAs have been uncovered by Legnini, Pamudurti, Zhang, Yang, Zheng and Liang et al. in separate studies published during the last two years [25,26,36,37,40,48,49]. In the following segments we will present each of these studies, focusing on the crucial question of which cap-independent translation initiation mechanisms are triggered by circular RNAs. Consequently, we exclude the study by Zheng et al. on circPP1R12A for which the translation initiation mechanisms were not addressed [48].

2.2. IRES driven circRNA translation

2.2.1. IRES-driven translation of circZNF609

In the study by Legnini et al. the authors showed that circZNF609 is the backsplicing product of the ZNF609 gene exon 2, encoding a poorly characterized transcription factor belonging to the zinc-finger protein family [37]. Interestingly, the Open Reading Frame (ORF) of circZNF609 starts at the same AUG codon as its linear counterparts but encounters a stop codon 3 nucleotides after the backspliced junction where a frameshift occurs. Supporting its *in vivo* translation, circZNF609 has been found in the heavy polyosomes fraction after RNase R treatment. The authors then tested whether the sequence upstream from the initiation codon (i.e. 80 nt from the 3' end of exon 2 and across the backspliced junction fused to the UTR) displayed an IRES activity. This sequence cloned into a bicistronic vector, containing the Renilla luciferase under cap-dependent translation and the Firefly luciferase under the putative IRES-dependent translation, did not display any significant IRES activity. However, when they added small fragments of the endogenous intronic sequences in the construct, in order to mimic the backsplicing occurring to generate circZNF609, they obtained a stronger IRES activity than that of EMCV. Thus circZNF609 exhibits a splicing dependent IRES activity. This observation is particularly interesting because it suggests that factors necessary for IRES activity may be recruited through splicing. It is entirely conceivable,

for example, that proteins of the hnRNP family involved in splicing could be recruited onto circRNA in the nucleus, afterwards acting as IRES Trans-Acting Factors (ITAFs) in the cytosol. This process has already been described for several hnRNPs acting as ITAFs for mRNAs [61]. Additionally, protein production from circZNF609 is increased after a heat-shock stress, which is known to activate IRES activity [58] and modulate alternative splicing [67]. These two processes may be a functional link between stress and circRNA translation initiation.

2.2.2. IRES-driven translation of circMbl

In the same issue of Molecular Cell, Pamudurti et al. presented their study in which they show that a subset of circRNAs are associated with translating ribosomes *in vivo* in *Drosophila* by ribosome footprinting [36]. They focused on a circRNA, circMbl, generated from the muscleblind locus. Like circZNF609, circMbl shares the same start codon as the linear muscleblind mRNA and the ORF stops a few nucleotides after passing the backspliced junction. Similarly, they have found an IRES activity arising from the UTR of the circRNA (cUTR) cloned into a bicistronic vector. In their experiments, they also measured Firefly and Renilla activities in the presence or absence of 4E-BP, mimicking the blockade or not of cap-dependent translation. Overexpression of 4E-BP resulted in an increase by more than 4 fold of the Firefly luciferase/Renilla luciferase luminescence ratio, sustaining cap-independent translation initiation through the circMbl cUTR in a context mimicking cellular stress. Importantly, the circMbl-encoded protein was also detected by mass spectrometry.

2.2.3. IRES-driven translation of circSHPRH

In another study, Zhang et al. identified a new circRNA produced by the gene coding the E3-ligase SNF2 histone linker PHD RING helicase (SHPRH), called circSHPRH [40]. In this case, the backsplicing of exons 26 to 29 forms circSHPRH and organises a large ORF of 146 amino acids. The particularity of circSHPRH compared to the two previous examples is that the ORF occupies the totality of the circRNA by using a start codon overlapping with two tandem repeat stop codons: UGAUGA. The authors have identified an IRES able to drive translation initiation of circSHPRH. However, this IRES is located downstream from the start codon in contrast to circZNF609 and circMbl. It is also interesting to note that the functional IRES is formed by the joint sequences of exons 26 and 29 and thus spans across the backspliced junction. Indeed, if a portion of the backspliced junction arising from either exon 26 or exon 29 is deleted, the IRES activity is dramatically reduced. This illustrates yet another example of splicing dependence for IRES mediated translation initiation of a circRNA, and points again at the possibility of ITAF recruitment through splicing. Significantly, circSHPRH produces a novel 146 amino acids protein that was detected by mass spectrometry and displayed a tumour suppressor activity by acting as a decoy, protecting the related full-length SHPRH protein from degradation.

2.2.4. IRES-driven translation of circFBXW7

In a similar way, Yang et al. have characterized a circRNA produced by the tumour suppressor E3 ligase FBXW7 [25]. The circular form of FBXW7, circFBXW7, derives from the backsplicing of exon 3 to 4 and forms a 620 nt circular RNA. In the case of circFBXW7, the authors have found a 120 nt long IRES in the cUTR that is located upstream from the AUG and downstream from the backspliced junction. The partial deletion of this sequence induced a decrease in the IRES activity. Unfortunately, it seems that the authors did not test the IRES activity of a longer sequence stretching upstream to cover the backsplicing junction, which would have been interesting to compare with the previous occurrences of circRNA IRESs.

Similarly to circSHPRH, the 185 amino acids protein encoded by the circFBXW7 (FBXW7-185aa) was detected by mass spectrometry and displayed a tumour suppressor activity in a glioblastoma model. The analysis of circFBXW7 expression in glioblastoma clinical samples confirmed its effective translation *in vivo* and the potential tumour suppressor activity of FBXW7-185aa, as the protein levels were reduced in the samples compared with their paired tumour-adjacent tissues.

2.2.5. IRES-driven translation of circLINC-PINT

A second study by Zhang et al. reported last year the translation of a circRNA originating from the long non-coding RNA and p53-induced transcript LINC-PINT [26]. The circLINC-PINT is generated by the circularisation of exon 2. The authors identified circLINC-PINT as a potential coding circular RNA from the analysis of ribosome nascent chain-sequencing data. This 1084 nt circular RNA contains several small open reading frames. The study has proven one of them to produce a 87 amino acid peptide, called PINT87aa, that participates in the control of cell proliferation and tumorigenesis in cancer cells. The authors cloned the sequence of 478 nt between the backspliced junction and the start codon and found an IRES activity able to drive cap-independent translation initiation in a bicistronic vector. In this case too, the cloned region tested for IRES activity did not span the backspliced junction. Interestingly, the most potent region that retained IRES activity, when they performed deletion experiments, was the region closest to the backspliced junction (i.e. the first 231 nt display a comparable IRES activity to the full length 478 nt).

2.2.6. IRES-driven translation of circ β -catenin

This year, Liang et al. have published the latest article to date reporting the translation of a circular RNA into a novel β -catenin isoform [49]. Circ β -catenin is formed by the backsplicing of exons 2 to 7 of the β -catenin gene, resulting in a 1129 nt long circular molecule. The authors identified an ORF spanning from the same start codon as the linear β -catenin mRNA (nucleotide 49 in exon 2) across the backspliced junction to a new stop codon (nucleotide 30 in exon 2). The study demonstrated that a 370 amino acids β -catenin isoform was produced by this ORF and detected by mass spectrometry, on a liver cancer cell line. Further experiments revealed that this protein promotes liver cancer cells growth, both *in vitro* and *in vivo*, through the activation of the Wnt pathway. By acting as a decoy for the canonic β -catenin, the circRNA derived isoform protects it from degradation and thus promotes its action. The authors identified a putative IRES sequence of 107 nt, upstream of the start codon, displaying a significant activity when cloned into a dual luciferase reporter system, strongly suggesting the presence of an IRES in this region.

Thus, like for circZNF609 and circSHPRH, the location of the stop codon a few nucleotides upstream the start codon, with respect to the size of the IRESs that are described, implies that the sequence containing the IRES overlaps the translated region. In addition, the possibility of a similar layout for the other four circRNAs is not ruled out, if not comforted in the case of circLINC-PINT. The reoccurrence of this configuration in such a small population of translated circRNAs is interesting to note as it could be a specific feature of circular RNA IRESs. Indeed, for cellular IRESs, only one example of an IRES in a translated region has been reported in the literature. It is the case of the CAT-1 mRNA, which possesses an IRES overlapping a small ORF upstream of the main start codon. In this case, the translation of the small reading frame induces a conformational change that activates the IRES [68]. Could this apply to circRNAs? Though, in the case of the CAT-1 mRNA, the activation of the IRES depends on the cap-dependent translation of an upstream ORF, whereas for circular RNAs, the IRES would need to be active enough

to initiate a pioneering translation round and then be further activated. It will be interesting to carry out an in-depth mechanistic study of these IRESs overlapping translated regions in circular RNAs to answer these questions in the future.

2.3. m⁶A driven circRNA translation

Nevertheless, it seems that mRNAs without IRES activity can still be translated independently of the eIF4F complex. Several recent articles report that methylation in the form of N⁶-methyladenosine (m⁶A) in the 5'UTR of messenger RNAs facilitates the translation of some RNAs, in a context where translation initiation via eIF4F is blocked but in an IRES-independent pathway [69]. Therefore, this mechanism seems to constitute a third way to initiate translation in eukaryotic cells and an alternative to the use of IRESs for cap-independent translation initiation. The mechanism for m⁶A-initiated translation is not well known but involves the methyltransferases METTL3, METTL14 and Wilm's tumor associated protein [70,71]. This system is reversible since translation by m⁶As can be inhibited by the demethylases FTO (fat mass and obesity-associated protein) and ALKBH5 (alkylated DNA repair protein alkB homolog 5) [72,73]. Interestingly, the initiation of m⁶A-dependent translation seems to be finely regulated under stress conditions and could constitute an additional mechanism to modulate the translation of a pool of specific transcripts under stress conditions in parallel with the pool of IRES-controlled mRNAs [66]. Here again, this mechanism, which allows the initiation of translation in an eIF4F-independent way, can be applied to translation initiation for circular RNAs, as reported by some recent studies [38]. In the article by Yang et al., the authors show that m⁶A residues are enriched on all circRNA sequences and that a single m⁶A is sufficient to initiate translation. This circRNA m⁶A-dependent translation relies on the eIF4G2 factor, and the YTHDF3 m⁶A reader. It is activated under stress conditions such as heat-shock or by the overexpression of METTL3/14 and is inhibited by the FTO demethylase. The authors performed an RNA-Seq analysis of m⁶A-targeted immunoprecipitated RNAs, treated with RNase R. They estimate that at least 13% of circular RNAs carry the m⁶A modification, but this is probably an underestimated value since the technical approach focuses only on the analysis of m⁶A motifs adjacent to backspliced junctions. This study identified 250 circRNAs associated with polysomes and some may be actively translated since this association is sensitive to puromycin treatment, although this fact alone does not constitute absolute proof of translation.

3. Translation of synthetic circular RNAs

Very recently, studies have been initiated to produce synthetic circular RNAs in order to investigate the biological characteristics of circular RNAs and their biogenesis. For this purpose, authors have designed a plasmid expression system where backsplicing is facilitated by the hybridization of complementary sequences in the synthesized "pre-circRNA" [74]. With an IRES upstream of the reading frame, the circRNAs derived from these expression vectors can produce a given protein. Yang et al. adopted this strategy to design a vector where a GFP reading frame is assembled by backsplicing [75]. The construct can therefore be used to study the efficiency of backsplicing or IRES dependent translation initiation. Considering the stable properties of circRNAs, this type of vector is also a promising tool in biotechnology for a prolonged production of recombinant proteins [75]. The IRES-dependent GFP split construct has already been transposed into an adenoviral genome to produce recombinant proteins *in vivo* [76]. Finally, very recently, a team proposed an original variant where the translation is

initiated by an "eukaryotic IRES-like site" i. e. an m⁶A motif. In this new vector, the stop codon of the reading frame has been removed and the presence of a T2A sequence allows the ribosome to continuously re-initiate translation. Therefore, the entire sequence is translated. The use of an m⁶A motif drastically reduces the size of the sequence allowing translation initiation [77]. This system enables the stable and continuous production of a protein in a given cell. The combination of the stability of circular RNAs and their high potential for continuous translation could make them major tools for future use in biotherapies. Nevertheless, much work remains to be done to optimize these vectors, especially by a thorough understanding of the translation initiation mechanisms on circular RNAs.

Outlook

New perspectives are opening for the field of research on RNAs and particularly on circular RNAs. There is no doubt that new protein coding circRNAs will be discovered in the near future. It will be essential to uncover and understand the various cellular functions of these novel proteins. These mechanisms are of utmost relevance in physiopathological contexts since circRNA derived proteins are very likely involved in stress responses, due to their cap-independent and stress responsive translation initiation, whether IRES or m⁶A-dependent. Their implications in cell differentiation and tumor cell development are proof enough of the potential of circRNA derived proteins in deciphering complex systems and finding new therapeutics. There is no doubt that a growing number of publications will enlighten us on the importance of circular RNAs in many cellular processes, including cell metabolism, which has been poorly studied so far.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Author agreement

Material submitted is original, all authors are in agreement to have the article published.

References

- [1] J.M. Nigro, K.R. Cho, E.R. Fearon, S.E. Kern, J.M. Ruppert, J.D. Oliner, et al., Scrambled exons, *Cell* 64 (1991) 607–613, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90244-5).
- [2] C. Cocquerelle, B. Mascres, J. Hétiuin, B. Bailleul, Mis-splicing yields circular RNA molecules, *FASEB J.* 7 (1993) 155–160, <https://doi.org/10.1096/faseb.7.1.7678559>.
- [3] S. Huang, B. Yang, B.J. Chen, N. Biliim, U. Ueberham, T. Arendt, et al., The emerging role of circular RNAs in transcriptome regulation, *Genomics* 109 (2017) 401–407, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.06.005>.
- [4] L. Bolha, M. Ravník-Glavac, D. Glavac, Circular rnas: biogenesis, function, and a role as possible cancer biomarkers, *Int. J. Genomics* 2017 (2017), 6218353, <https://doi.org/10.1155/2017/6218353>.
- [5] M. Dragomir, G.A. Calin, Circular RNAs in cancer - lessons learned from microRNAs, *Front. Oncol.* 8 (2018) 179, <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00179>.
- [6] S. Xu, L. Zhou, M. Ponnusamy, L. Zhang, Y. Dong, Y. Zhang, et al., A comprehensive review of circRNA: from purification and identification to

- disease marker potential, *PeerJ* 6 (2018) e5503, <https://doi.org/10.7717/peerj.5503>.
- [7] J. Salzman, C. Gawad, P.L. Wang, N. Lacayo, P.O. Brown, Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types, *PLoS One* 7 (2012) e30733, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030733>.
- [8] S. Memczak, M. Jens, A. Elefsinioti, F. Torti, J. Krueger, A. Rybak, et al., Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency, *Nature* 495 (2013) 333–338, <https://doi.org/10.1038/nature11928>.
- [9] W.R. Jeck, J.A. Sorrentino, K. Wang, M.K. Slevin, C.E. Burd, J. Liu, et al., Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats, *RNA* 19 (2013) 141–157, <https://doi.org/10.1261/rna.035667.112>.
- [10] J.O. Westholm, P. Miura, S. Olson, S. Shenker, B. Joseph, P. Sanfilippo, et al., Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation, *Cell Rep.* 9 (2014) 1966–1980, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.062>.
- [11] X.-O. Zhang, R. Dong, Y. Zhang, J.-L. Zhang, Z. Luo, J. Zhang, et al., Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs, *Genome Res.* 26 (2016) 1277–1287, <https://doi.org/10.1101/gr.202893.115>.
- [12] Y. Gao, J. Wang, F. Zhao, CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification, *Genome Biol.* 16 (2015) 4, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0571-3>.
- [13] K. Wang, D. Singh, Z. Zeng, S.J. Coleman, Y. Huang, G.L. Savich, et al., MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e178, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp622>.
- [14] N. Eger, L. Schoppe, S. Schuster, U. Laufs, J.-N. Boeckel, Circular RNA splicing, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1087 (2018) 41–52, https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_4.
- [15] R. Ashwal-Fluss, M. Meyer, N.R. Pamudurti, A. Ivanov, O. Bartok, M. Hanan, et al., circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing, *Mol. Cell* 56 (2014) 55–66, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.019>.
- [16] S. Starke, I. Jost, O. Rossbach, T. Schneider, S. Schreiner, L.-H. Hung, et al., Exon circularization requires canonical splice signals, *Cell Rep.* 10 (2015) 103–111, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.002>.
- [17] D. Liang, J.E. Wilusz, Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production, *Genes Dev.* 28 (2014) 2233–2247, <https://doi.org/10.1101/gad.251926.114>.
- [18] A. Ivanov, S. Memczak, E. Wylter, F. Torti, H.T. Porath, M.R. Orejuela, et al., Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals, *Cell Rep.* 10 (2015) 170–177, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.010>.
- [19] S.J. Conn, K.A. Pillman, J. Toubia, V.M. Conn, M. Salimandis, C.A. Phillips, et al., The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs, *Cell* 160 (2015) 1125–1134, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.014>.
- [20] X. Li, C.-X. Liu, W. Xue, Y. Zhang, S. Jiang, Q.-F. Yin, et al., Coordinated circRNA biogenesis and function with NP90/NF110 in viral infection, *Mol. Cell* 67 (2017) 214–227, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.023>, e7.
- [21] A. Rybak-Wolf, C. Stottmeister, P. Glazar, M. Jens, N. Pino, S. Giusti, et al., Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed, *Mol. Cell* 58 (2015) 870–885, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.027>.
- [22] Y. Enuka, M. Lauriola, M.E. Feldman, A. Sas-Chen, I. Ulitsky, Y. Yarden, Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 1370–1383, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1367>.
- [23] S. Memczak, P. Papavasiliou, O. Peters, N. Rajewsky, Identification and characterization of circular rnas as a new class of putative biomarkers in human blood, *PLoS One* 10 (2015) e0141214, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141214>.
- [24] J. Salzman, R.E. Chen, M.N. Olsen, P.L. Wang, P.O. Brown, Cell-type specific features of circular RNA expression, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003777, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003777>.
- [25] Y. Yang, X. Gao, M. Zhang, S. Yan, C. Sun, F. Xiao, et al., Novel role of FBXW7 circular RNA in repressing glioma tumorigenesis, *J. Natl. Cancer Inst.* 110 (2018), <https://doi.org/10.1093/jnci/djx166>.
- [26] M. Zhang, K. Zhao, X. Xu, Y. Yang, S. Yan, P. Wei, et al., A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma, *Nat. Commun.* 9 (2018) 4475, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06862-2>.
- [27] Z. Li, C. Huang, C. Bao, L. Chen, M. Lin, X. Wang, et al., Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 256–264, <https://doi.org/10.1038/nmsb.2959>.
- [28] T.B. Hansen, T.I. Jensen, B.H. Clausen, J.B. Bramsen, B. Finsen, C.K. Damgaard, et al., Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges, *Nature* 495 (2013) 384–388, <https://doi.org/10.1038/nature11993>.
- [29] V.M. Conn, V. Hugouvieux, A. Nayak, S.A. Conos, G. Capovilla, G. Cildir, et al., A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation, *Native Plants* 3 (2017) 17053, <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.53>.
- [30] C. Huang, D. Liang, D.C. Tatomer, J.E. Wilusz, A length-dependent evolutionarily conserved pathway controls nuclear export of circular RNAs, *Genes Dev.* 32 (2018) 639–644, <https://doi.org/10.1101/gad.314856.118>.
- [31] Y. Zhang, W. Xue, X. Li, J. Zhang, S. Chen, J.-L. Zhang, et al., The biogenesis of nascent circular rnas, *Cell Rep.* 15 (2016) 611–624, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.058>.

- [32] Q. Vicens, E. Westhof, Biogenesis of circular rnas, *Cell* 159 (2014) 13–14, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.005>.
- [33] M.C. Kramer, D. Liang, D.C. Tatomer, B. Gold, Z.M. March, S. Cherry, et al., Combinatorial control of *Drosophila* circular RNA expression by intronic repeats, hRNPs, and SR proteins, *Genes Dev.* 29 (2015) 2168–2182, <https://doi.org/10.1101/gad.270421.115>.
- [34] K.K. Ebbesen, J. Kjems, T.B. Hansen, Circular RNAs: identification, biogenesis and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1859 (2016) 163–168, <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.07.007>.
- [35] W.W. Du, W. Yang, E. Liu, Z. Yang, P. Dhaliwal, B.B. Yang, Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 2846–2858, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw027>.
- [36] N.R. Pamudurti, O. Bartok, M. Jens, R. Ashwal-Fluss, C. Stottmeister, L. Ruhe, et al., Translation of circRNAs, *Mol. Cell* 66 (2017) 9–21, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.021>, e7.
- [37] I. Legnini, G. Di Timoteo, F. Rossi, M. Morlando, F. Briganti, O. Sthandier, et al., Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis, *Mol. Cell* 66 (2017) 22–37, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.017>, e9.
- [38] Y. Yang, X. Fan, M. Mao, X. Song, P. Wu, Y. Zhang, et al., Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine, *Cell Res.* 27 (2017) 626–641, <https://doi.org/10.1038/cr.2017.31>.
- [39] Y. Wang, Z. Wang, Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs, *RNA* 21 (2015) 172–179, <https://doi.org/10.1261/rna.048272.114>.
- [40] M. Zhang, N. Huang, X. Yang, J. Luo, S. Yan, F. Xiao, et al., A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis, *Oncogene* 37 (2018) 1805–1814, <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0019-9>.
- [41] S. Begum, A. Yiu, J. Stebbing, L. Castellano, Novel tumour suppressive protein encoded by circular RNA, circ-SHPRH, in glioblastomas, *Oncogene* 37 (2018) 4055–4057, <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0230-3>.
- [42] J.E. Wilusz, Circular RNAs: unexpected outputs of many protein-coding genes, *RNA Biol.* 14 (2017) 1007–1017, <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1227905>.
- [43] D.C. Tatomer, J.E. Wilusz, An uncharted journey for ribosomes: circumnavigating circular rnas to produce proteins, *Mol. Cell* 66 (2017) 1–2, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.011>.
- [44] C.Y. Chen, P. Sarnow, Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs, *Science* 268 (1995) 415–417, <https://doi.org/10.1126/science.7536344>.
- [45] J.J. Guo, Y. Agarwal, H. Guo, D.P. Bartel, Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs, *Genome Biol.* 15 (2014) 409, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>.
- [46] T. Schneider, L.-H. Hung, S. Schreiner, S. Starke, H. Eckhof, O. Rossbach, et al., CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNAs, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31313, <https://doi.org/10.1038/srep31313>.
- [47] I. Legnini, G. Di Timoteo, F. Rossi, M. Morf, F. Briganti, O. Sth, et al., Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be, (n.d.).
- [48] X. Zheng, L. Chen, Y. Zhou, Q. Wang, Z. Zheng, B. Xu, et al., A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer via Hippo-YAP signaling, *Mol. Cancer* 18 (2019) 47, <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1010-6>.
- [49] W.-C. Liang, C.-W. Wong, P.-P. Liang, M. Shi, Y. Cao, S.-T. Rao, et al., Translation of the circular RNA circI-catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway, *Genome Biol.* 20 (2019) 84, <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1685-4>.
- [50] C. Ragan, G.J. Goodall, N.E. Shirokikh, T. Preiss, Insights into the biogenesis and potential functions of exonic circular RNA, *Sci. Rep.* 9 (2019) 2048, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37037-0>.
- [51] S.N. Floor, J.A. Doudna, Tunable protein synthesis by transcript isoforms in human cells, *Elife* 5 (2016), <https://doi.org/10.7554/eLife.10921>.
- [52] J.D. Gross, N.J. Moerke, T. von der Haar, A.A. Lugovskoy, A.B. Sachs, J.E.G. McCarthy, et al., Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E, *Cell* 115 (2003) 739–750, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00975-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00975-9).
- [53] P. Schütz, M. Bumann, A.E. Oberholzer, C. Bieniossek, H. Trachsel, M. Altmann, et al., Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 9564–9569, <https://doi.org/10.1073/pnas.0800418105>.
- [54] A. Marintchev, K.A. Edmonds, B. Marintcheva, E. Hendrickson, M. Oberer, C. Suzuki, et al., Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation, *Cell* 136 (2009) 447–460, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.014>.
- [55] A. Pause, G.J. Belsham, A.C. Gingras, O. Donzé, T.A. Lin, J.C. Lawrence, et al., Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function, *Nature* 371 (1994) 762–767, <https://doi.org/10.1038/371762a0>.
- [56] N. Sonenberg, A.G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets, *Cell* 136 (2009) 731–745, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>.
- [57] H.D. Ryoo, D. Vasudevan, Two distinct nodes of translational inhibition in the Integrated Stress Response, *BMB Rep* 50 (2017) 539–545, <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.11.157>.
- [58] M. Holcik, N. Sonenberg, Translational control in stress and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 318–327, <https://doi.org/10.1038/nrm1618>.
- [59] N. Sonenberg, A.G. Hinnebusch, New modes of translational control in development, behavior, and disease, *Mol. Cell* 28 (2007) 721–729, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.018>.
- [60] K.D. Meyer, m6A-mediated translation regulation, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862 (2019) 301–309, <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.10.006>.
- [61] A.-C. Godet, F. David, F. Hantelys, F. Tatin, E. Lacazette, B. Garmy-Susini, et al., IRES trans-acting factors, key actors of the stress response, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019), <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>.
- [62] J. Fernandez, I. Yaman, P. Sarnow, M.D. Snider, M. Hatzoglou, Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19198–19205, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201052200>.
- [63] S.K. Jang, H.G. Kräusslich, M.J. Nicklin, G.M. Duke, A.C. Palmenberg, E. Wimmer, A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation, *J. Virol.* 62 (1988) 2636–2643.
- [64] D.G. Macejak, P. Sarnow, Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA, *Nature* 353 (1991) 90–94, <https://doi.org/10.1038/353090a0>.
- [65] K.D. Meyer, D.P. Patil, J. Zhou, A. Zinoviev, M.A. Skabkin, O. Elemento, et al., 5' UTR m6A promotes cap-independent translation, *Cell* 163 (2015) 999–1010, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>.
- [66] J. Zhou, J. Wan, X.E. Shu, Y. Mao, X.-M. Liu, X. Yuan, et al., N6-Methyladenosine guides mRNA alternative translation during integrated stress response, *Mol. Cell* 69 (2018) 636–647, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.019>, e7.
- [67] G. Blamonti, J.F. Caceres, Cellular stress and RNA splicing, *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009) 146–153, <https://doi.org/10.1016/j.tbs.2008.11.004>.
- [68] I. Yaman, J. Fernandez, H. Liu, M. Caprara, A.A. Komar, A.E. Koromilas, et al., The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader, *Cell* 113 (2003) 519–531, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00345-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00345-3).
- [69] R.A. Coots, X.-M. Liu, Y. Mao, L. Dong, J. Zhou, J. Wan, et al., m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation, *Mol. Cell* 68 (2017) 504–514, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.002>, e7.
- [70] J. Liu, Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, et al., A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation, *Nat. Chem. Biol.* 10 (2014) 93–95, <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>.
- [71] X.-L. Ping, B.-F. Sun, L. Wang, W. Xiao, X. Yang, W.-J. Wang, et al., Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase, *Cell Res.* 24 (2014) 177–189, <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>.
- [72] G. Jia, Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, et al., N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 885–887, <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>.
- [73] G. Zheng, J.A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C.-M. Huang, C.J. Li, et al., ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility, *Mol. Cell* 49 (2013) 18–29, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>.
- [74] R.A. Wesselhoeft, P.S. Kowalski, D.G. Anderson, Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2629, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05096-6>.
- [75] Y. Yang, Z. Wang, Constructing GFP-based reporter to study back splicing and translation of circular RNA, *Methods Mol. Biol.* 1724 (2018) 107–118, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7562-4_9.
- [76] R.M. Meganck, E.K. Borchardt, R.M. Castellanos Rivera, M.L. Scalabrino, J.E. Wilusz, W.F. Marzluff, et al., Tissue-dependent expression and translation of circular RNAs with recombinant AAV vectors in vivo, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 13 (2018) 89–98, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.08.008>.
- [77] A. Costello, N.T. Lao, N. Barron, M. Clynes, Continuous translation of circularized mRNA improves recombinant protein titer, *Metab. Eng.* 52 (2019) 284–292, <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.01.002>.

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

JCI INSIGHT

RESEARCH ARTICLE

Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction

Florence Tatin,¹ Edith Renaud-Gabardos,¹ Anne-Claire Godet,¹ Fransky Hantelys,¹ Francoise Pujol,¹ Florent Morfoisse,¹ Denis Calise,² Fanny Viars,³ Philippe Valet,¹ Bernard Masri,¹ Anne-Catherine Prats,¹ and Barbara Garmy-Susini¹

¹I2MC INSERM UMR 1048, Toulouse Cedex, France. ²UMS 006, INSERM, UPS, F-31432 Toulouse, France.

³MetaToul-Lipidomique Core Facility, I2MC INSERM 1048, Toulouse, France.

Lymphatic endothelium serves as a barrier to control fluid balance and immune cell trafficking to maintain tissue homeostasis. Long-term alteration of lymphatic vasculature promotes edema and fibrosis, which is an aggravating factor in the onset of cardiovascular diseases such as myocardial infarction. Apelin is a bioactive peptide that plays a central role in angiogenesis and cardiac contractility. Despite an established role of apelin in lymphangiogenesis, little is known about its function in the cardiac lymphatic endothelium. Here, we show that apelin and its receptor APJ were exclusively expressed on newly formed lymphatic vasculature in a pathological model of myocardial infarction. Using an apelin-knockout mouse model, we identified morphological and functional defects in lymphatic vasculature associated with a proinflammatory status. Surprisingly, apelin deficiency increased the expression of lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D and exacerbated lymphangiogenesis after myocardial infarction. Conversely, the overexpression of apelin in ischemic heart was sufficient to restore a functional lymphatic vasculature and to reduce matrix remodeling and inflammation. In vitro, the expression of apelin prevented the alteration of cellular junctions in lymphatic endothelial cells induced by hypoxia. In addition, we demonstrated that apelin controls the secretion of the lipid mediator sphingosine-1-phosphate in lymphatic endothelial cells by regulating the level of expression of sphingosine kinase 2 and the transporter SPNS2. Taken together, our results show that apelin plays a key role in lymphatic vessel maturation and stability in pathological settings. Thus, apelin may represent a novel candidate to prevent pathological lymphatic remodeling in diseases.

Introduction

Preserving the vascular lymphatic barrier is essential to maintain tissue fluid homeostasis and immune cell trafficking to perform immune surveillance. The integrity of the lymphatic vasculature relies on the adhesive and mechanical properties of specialized junctions on lymphatic capillaries that allow unidirectional entry of fluids, solutes, and immune cells draining into larger collecting vessels. A defect in the lymphatic drainage is associated with severe edema, which is an aggravating factor in a large spectrum of pathologies such as heart ischemia, lymphedema, and chronic inflammatory diseases (1).

In particular, recent literature demonstrated that lymphatic drainage plays a major role in myocardial infarction (MI) (2). MI is caused by a left coronary obstruction that leads to an orchestrated series of events, initiated by immune cell infiltration (inflammatory phase), and followed by edema and an adverse left ventricular remodeling, chronic inflammation, fibrosis, and angiogenesis. Ischemic heart exhibits a dysfunctional lymphatic network that participates in the development of chronic myocardial edema and aggravates cardiac dysfunction (2, 3). Therefore, improving the integrity of the lymphatic vascular wall remains an emerging challenge in cardiovascular biology. VEGF-A is the first vascular growth factor identified to improve angiogenesis after MI (4). However, phase II clinical trials have shown that VEGF-A is not efficient in improving the contractile function of ischemic heart (5). To date, our understanding about the molecular mechanisms leading to a restricted activation of lymphatic vessels in diseases has been mainly associated with VEGF-C/VEGFR-3 signaling. VEGF-C, the major lymphangiogenic growth factor

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Submitted: March 8, 2017

Accepted: May 10, 2017

Published: June 15, 2017

Reference information:

JCI Insight. 2017;2(12):e93887.

<https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

that binds its receptor VEGFR-3, restores a functional lymphatic vasculature in models of lymphedema, chronic inflammatory bowel diseases, and lung allografts (6–8). Recently, VEGF-C appeared ineffective in improving lymphatic function in a mouse model of MI (2). Altogether, these observations demonstrate that identifying novel actors in the maintenance of vascular integrity remains a crucial challenge to restore heart function. In particular, the lipid mediator sphingosine-1-phosphate (S1P) has recently emerged as a potent mediator of vascular integrity (9, 10). In addition, the bioactive peptide apelin is a critical player in both lymphangiogenesis and angiogenesis (11–13). Apelin promotes lymphatic development in zebrafish (14) and, despite normal embryonic lymphatic vessel development in apelin-deficient mice (15), a link between apelin and the lymphatic endothelium has been clearly established in pathological models. Apelin promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis (16). In diet-induced obesity mouse models, the lack of apelin leads to hyperplasia and abnormal leakiness of lymphatic vasculature, suggesting a role in maintaining lymphatic wall integrity (17).

In the present study, we demonstrate that apelin plays a key role in cardiac lymphatic vasculature. Our data reveal that apelin-deficient mice exhibit abnormal dilated and leaky lymphatic vasculature associated with a proinflammatory status. Conversely, we provide evidence that in the pathological setting of MI, overexpression of apelin protects the lymphatic vasculature organization and function and its cardiac microenvironment. In addition, we found that apelin regulates the secretion of S1P in lymphatic endothelial cells (LECs) and maintains the integrity of cellular junctions. Therefore, our work highlights potentially novel perspectives to counteract pathological remodeling of lymphatic vasculature in a broad array of inflammatory and cardiovascular diseases.

Results

The cardiac lymphatic system. To obtain a comprehensive view of the lymphatic drainage in adult heart, we first performed paraffin and cryosection analyses along the heart from the apex through the atrioventricular (AV) junction. Most of the lymphatic vessels were located at the epicardial and subepicardial surface of the heart (Figure 1, A and B, and Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887DS1>). A low-density lymphatic network starting at the apex progressively appeared at higher density to cover the entire epicardial surface along the ventricular region (Figure 1B and Supplemental Figure 1B). Larger lymphatic vessels were seen in the epicardium and in the vicinity of the right ventricle septum, whereas the myocardium contained mainly capillaries defined as LYVE-1 positive but CD45 negative (Figure 1C and Supplemental Figure 1C). Interestingly, we found the presence of lymphatic vessels in the tricuspid and mitral valves (Figure 1D), suggesting a potential role of the lymphatic vasculature in the pathophysiology of cardiac valvular diseases. To further define the identity of cardiac LECs, we performed the immunodetection of lymphatic vessels using podoplanin, VEGFR-3, and NRP2 antibodies. We observed that all of the LEC markers were found in larger lymphatic vessels, whereas podoplanin was absent from myocardial lymphatic capillaries (Figure 1E and Supplemental Figure 1D). Based on our findings, we could envision a bidirectional drainage of the heart: a centrifugal drainage from the myocardium to the subepicardium and an ascending drainage from the apex to the AV junction. This hypothesis was confirmed by the visualization of Evan's blue drainage injected in the apex or in the myocardium (Figure 1F). The lymph drainage is represented in the schematic cartoon in Figure 1G.

MI induces a long-term dysfunctional lymphatic network. To examine the post-MI lymphatic remodeling, we generated a mouse model of MI with reduced cardiac systolic function (Supplemental Table 1) and performed whole-mount staining of cardiac lymphatic vessels with an LYVE-1 antibody. We observed 2 weeks after MI a necrotic area in the left ventricle corresponding to the ischemic zone with a rarefaction of the lymphatic system, whereas the right ventricle lymphatic system was not affected (Figure 2A). Six weeks after MI, the left ventricular wall thickness was increased due to cardiac remodeling. The lymphangiogenic process appeared disorganized with abnormal vessel morphology in the infarcted zone. Surprisingly, the growth of dilated and tortuous lymphatic vessels extended throughout the right ventricle, indicating a strong stimulation of the lymphatic vasculature beyond the ischemic zone (Figure 2A). Moreover, we examined in greater detail the remodeling of lymphatic vasculature by 2-photon microscopy using LYVE-1 immunostaining associated with the second harmonic generation to observe the arrangement of collagen fibers (Figure 2B). Two weeks after MI, disrupted lymphatic vessels were observed close to the infarcted zone, while lymphatic vessels in the ventral part were unaffected and associated with distinct collagen fibers. At 6 weeks after MI, the lymphatic network was disrupted with large, dysfunctional, and hyperplastic lymphatic

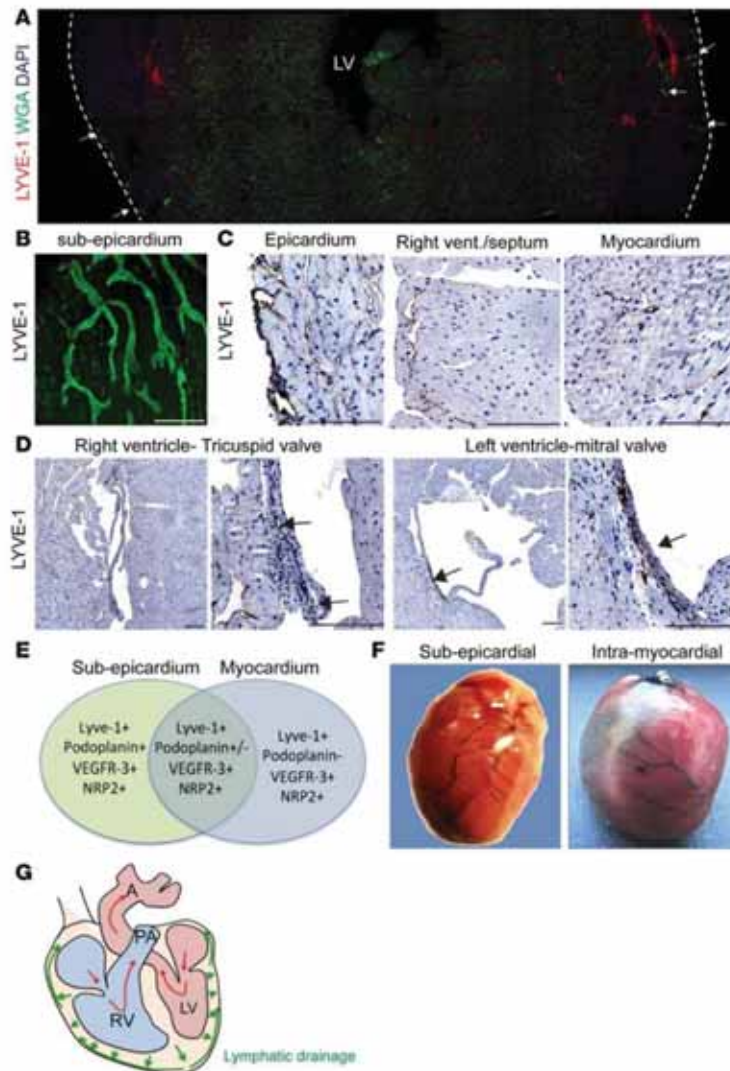
Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

Figure 1. Characterization of lymphatic vasculature in adult heart. (A) Immunostaining of a transversal cross-section through the left ventricle (LV) to examine the localization of lymphatic vessels in heart with LYVE-1 antibody (green) and the lectin wheat germ agglutinin (WGA, red). Arrows show LYVE-1-positive lymphatic vessels. (B) Whole-mount imaging of LYVE-1-positive lymphatic vessels at the epicardial surface of the heart. (C and D) Localization of capillaries and collecting lymphatic vessels with LYVE-1 antibody on paraffin cross-sections. Small lymphatic capillaries are observed in the myocardium, whereas larger vessels are located on the right ventricular side of the interventricular septum and on the subepicardial surface of the heart. Interestingly, we found the presence of lymphatic vessels at the base of mitral valve and in the tricuspid valve leaflets. (E) Identification of markers used to determine the cardiac lymphatic endothelium. NRP2, neuropilin 2; VEGFR3, vascular endothelial growth factor receptor 3; LYVE-1, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1. Capillaries in the myocardium are defined positive for all markers except podoplanin. Larger lymphatic vessels in the septum expressed podoplanin only in the superior part of the heart. (F) Drainage of lymphatic vasculature visualized by Evans blue dye. Evans blue was injected either at the subepicardial surface of the apex or intramyocardium. (G) Schematic representation of the heart lymphatic drainage. Scale bars: 250 μ m (B) and 100 μ m (C and D).

vessels associated with disorganized collagen fibers (Figure 2B). This information is in line with a dysfunctional drainage of lymphatic vessels previously reported in rat model of myocardial infarction (2). To further characterize the remodeling of post-MI lymphatic vessels, we performed immunodetection of the lymphatic vessels on heart cryosections after ischemia. We observed an increase of enlarged lymphatic vessels in the edge of the infarct zone 2 weeks after MI that developed through the right and left periventricular zones at 6 weeks after MI (Figure 2C and

Supplemental Figure 2A). We remarkably found that the developing lymphatic vasculature, positive for VEGFR3 and podoplanin, exhibited a dilated morphology in the infarct and noninfarct zone (Supplemental Figure 2, B–D and Figure 2C). We found that the cardiac lymphangiogenesis mainly occurred in the epicardium and rarely in the septum (Figure 2D). Importantly, this dilated morphology was maintained up to 6 weeks after MI (Figure 2, E and F), suggesting that long-term heart tissue injury generates the incapacity of lymphatic vessels to return to physiological morphology.

We next studied isolated cardiac LECs from mouse heart to define the molecular signature of lymphatic endothelium associated with cardiac remodeling. The entire heart, except for the atrium, was taken for analysis. We defined LECs in WT adult heart as CD45⁺CD31⁺LYVE-1⁺ by cytometric analysis. LECs represented 3.2% of the CD45⁺CD31⁺ population, whereas 96.7% were blood endothelial cells (BECs) (Figure 2G). We confirmed the identity of cardiac LECs by the expression of the lymphatic markers *Lyve-1*, *Prox-1*, *Pdpn* (podoplanin), as well as *Vegef3* by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) compared with BECs (Figure 2H). Gene expression analysis was next performed in isolated LECs from ischemic

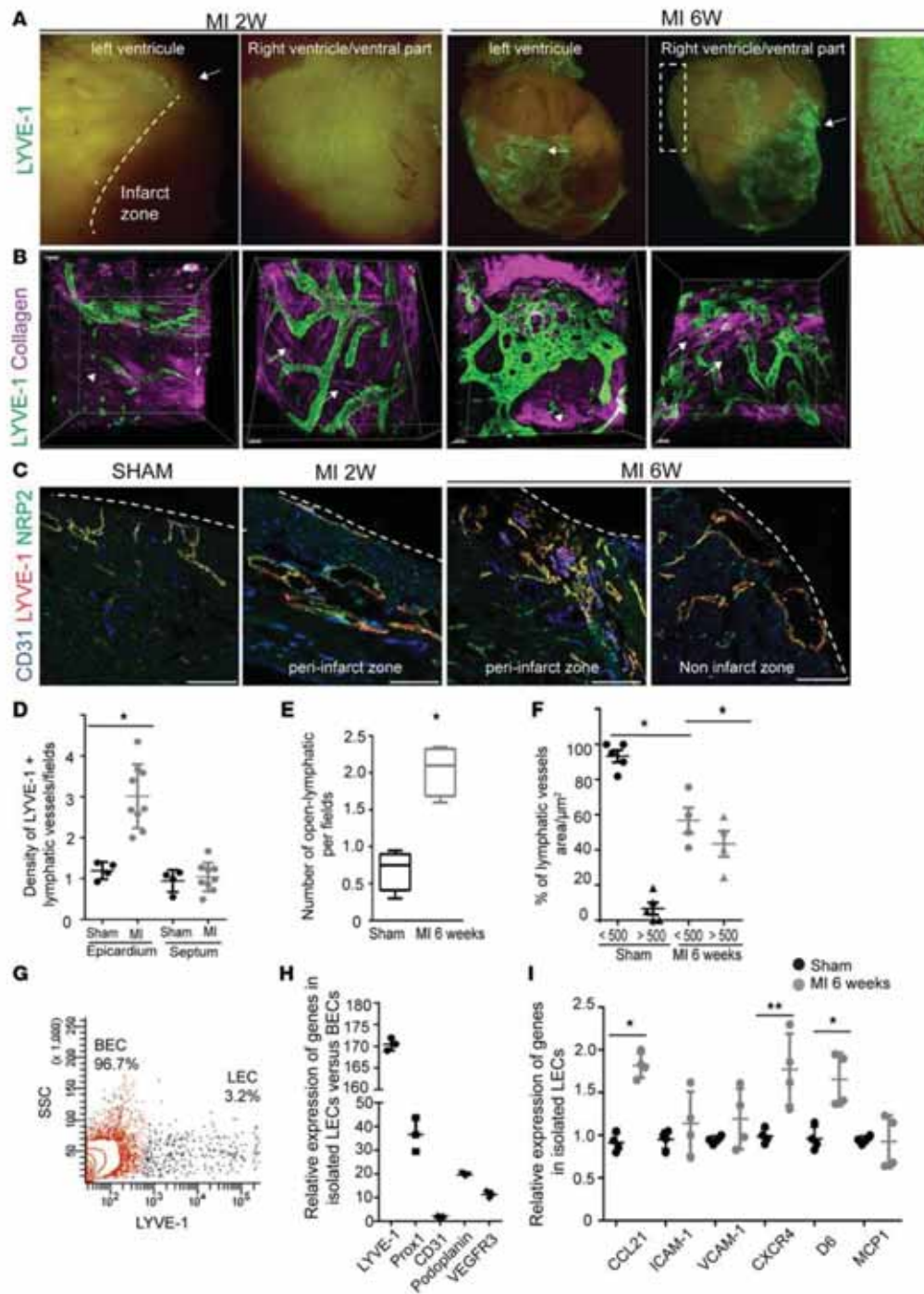


Figure 2. Chronic myocardial ischemia induces pathological remodeling of lymphatic vasculature. (A) Visualization of epicardial lymphatic vasculature by whole-mount heart immunostaining with LYVE-1 antibody 2 weeks or 6 weeks after myocardial infarction (MI). Dotted line indicates the limit of infarcted zone. Note the important remodeling of lymphatic vasculature that extends beyond the infarcted zone. Arrows indicate the position of the ligation. (B) Two-photon microscopic analysis of epicardial lymphatic vessels with LYVE-1 antibody. Two weeks after MI, the lymphatic network is disrupted

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

and associated with disordered collagen fibers (arrowheads) close to the infarcted zone, while the lymphatic network on the ventral part is not affected. Note the presence of well-organized collagen fibers (arrows). Six weeks after MI, a strong, disorganized, and hyperplastic lymphatic network near the infarct zone that propagates to the opposite side of the MI can be seen. (C) Representative images of heart cross-section stained for LYVE-1, NRP2, and CD31 showing the remodeling of lymphatic vasculature after MI. Enlarged lymphatic vessels appear at the infarct border zone at 2 weeks after MI. Note that at 6 weeks after MI, dilated vessels are also present at a distance in the noninfarct zone. (D) LYVE-1-positive vessel density in the subepicardium and septum ($n = 4-9$, 20 fields were counted per condition). $^*P < 0.004$. (E) Number of open lymphatic vessels located at the subepicardial surface of the heart in sham and 6 weeks after MI ($n = 4-9$, 20 fields were counted per condition). $^*P < 0.0001$. (F) Area of lymphatic vessels expressed as percentage of vessels less than or greater than $500 \mu\text{m}^2$ ($n = 4-5$, 40 vessels were counted per condition). $^*P < 0.0017$. (G) Representative panel showing the endothelial cell (EC) populations defined as CD45⁺ and CD31⁺. The LYVE-1 marker allows us to differentiate the lymphatic ECs (LECs) that represent only 3.2%, while blood ECs (BECs) represent 96.7% in healthy heart. (H) Expression of known lymphatic markers in isolated cardiac LECs compared with BECs in normal heart. Nine or 10 hearts were pooled together to sort ECs; data represent mean $\pm$ SD, $n = 3$. (I) Gene expression in cardiac-isolated LECs from sham mice or 6 weeks after MI. Note the expression of prolymphangiogenic receptor CXCR4 and the expression of inflammatory mediators such as CCL21 and D6. Nine or 10 hearts were pooled together to sort ECs; data represent mean $\pm$ SD, $n = 4$. $^*P < 0.001$, $^{**}P < 0.0005$. Statistical analysis was done with Student's *t* test (D and E) or 1-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test (F and I). Scale bars: $50 \mu\text{m}$ (B and C).

heart compared with sham mouse heart. The lymphangiogenic receptor *Cxcr4* was upregulated, indicating an activation of the lymphangiogenesis process at 6 weeks after MI. Interestingly, the inflammatory markers *Icam-1*, *Vcam-1*, and *Mcp-1* were not upregulated; however, we noted the expression of the chemokine *Ccl21* and the chemokine-scavenging receptor *D6* (Figure 2I), suggesting an important role of lymphatic vasculature in modulating immune cell responses during cardiac remodeling.

Activated cardiac LECs express apelin and its receptor APJ. Despite a well-established role of apelin in the regulation of cardiac contractility and angiogenesis (18–20), its role in cardiac lymphatic endothelium has to the best of our knowledge never been explored. To address this issue, we first analyzed by RT-qPCR the expression of *Apln* (apelin) as well as its receptor *APJ* in the ischemic area 2 days, 1 week, and 1 month after MI (Figure 3, A and B). In parallel, we measured the expression of lymphangiogenic factors *Vegf-C* and *Vegf-D* and their receptor *Vegfr3* (Figure 3C). We noted a striking expression of *Apln* 2 days after MI, whereas the long-term post-MI level of the receptor *APJ* increased, as previously reported (21), suggesting an activation of the apelin/APJ signaling in early days through the reparative phase of MI. As expected, *Vegf-C* and *Vegf-D* expression was not induced 2 days after MI but progressively increased from 1 week to 4 weeks after MI, suggesting the stimulation of lymphangiogenesis at a later stage of MI (Figure 3C). The increase of *Vegfr3* at 2 days after MI may correlate with its critical role in adaptive and innate immunity.

To investigate the role of apelin/APJ signaling in lymphatic endothelium, we next evaluated the localization of apelin and APJ expression in cardiac LECs by immunohistochemistry. Although neither protein was detected on quiescent cardiac lymphatic vessels (Figure 3D) or in early post-MI days (data not shown), we visualized the localization of the receptor APJ on activated lymphatic vessels 6 weeks after MI (Figure 3D). Similarly, apelin expression was partially associated with cardiac lymphatic vessels in post-MI heart (Figure 3D). Importantly, APJ was only observed in the growing lymphatic vessels within the infarct zone, suggesting a specific requirement of apelin/APJ signaling in a pathological microenvironment. We observed consistent heterogeneity in APJ expression on lymphatic endothelium where only a subset of cells forming lymphatic vessels expressed APJ. Therefore, we conclude that the receptor APJ is strongly regulated spatially and temporally in activated lymphatic endothelium. Taken together, our data document a role for apelin/APJ signaling in newly formed lymphatic vessels that undergo ischemic stress.

Abnormalities of lymphatic vasculature in apelin-KO mice are associated with a proinflammatory condition. To determine whether apelin regulates lymphatic vessel development, we initially analyzed the lymphatic vasculature in apelin-deficient mice. In agreement with the literature (15), the density of lymphatic vasculature at the subepicardial surface of the heart was similar in apelin-deficient mice and control mice. However, a prominent enlargement of lymphatic vasculature was observed in apelin-KO mice (Figure 4, A and B). Our finding was also confirmed in ear skin and back dermal skin tissue, indicating that the dilation of lymphatic vessels is an overall phenotype in apelin-KO mice and not organ specific (Supplemental Figure 3, A–D). The lack of apelin had no effect on the lymphatic vessel branching and density compared with control, whereas we noted an increase in the diameter of lymphatic vessels (Supplemental Figure 3, B and C). The presence of highly dilated lymphatic vessels in apelin-deficient mice suggests a disrupted lymphatic drainage leading to overloaded vessels (Supplemental Figure 3D). To evaluate whether changes in lymphatic morphology correlate with compromised lymphatic drainage, we performed skin lymphography by injecting FITC-dextran into mouse footpads. We observed prominent leakage of the lymphatic system associated with a dermal backflow of the dye in apelin-KO mice (Supplemental Figure 3E).

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

JCI INSIGHT

RESEARCH ARTICLE

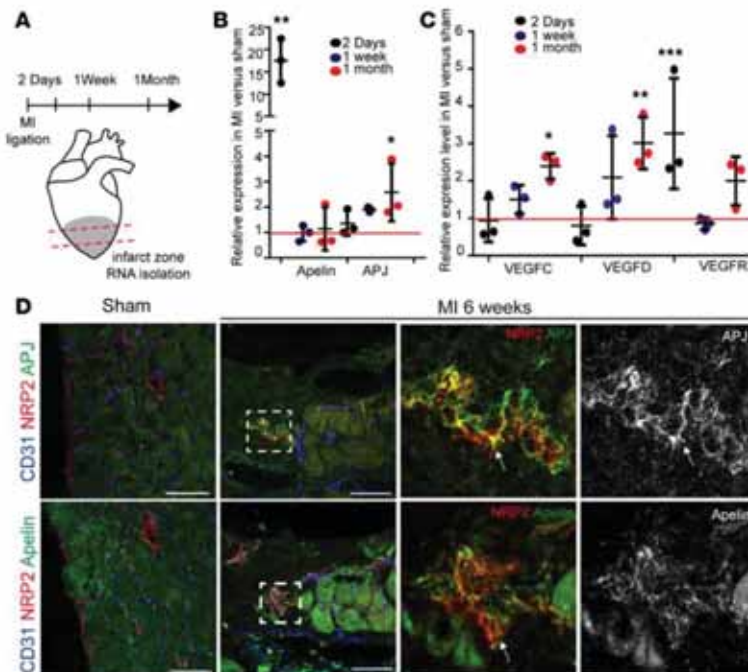


Figure 3. APJ is expressed on activated lymphatic endothelium in the ischemic zone. (A) Schematic representative of RNA isolation at the infarcted zone at different time points. (B) Relative expression of *Apelin* (apelin) and the receptor *APJ* after myocardial infarction (MI) analyzed by RT-qPCR. Data represent mean $\pm$ SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$. (C) Relative expression of lymphangiogenic factors *Vegf-C* and *Vegf-D* and the receptor *Vegfr-3* after MI. Data represent mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.003$, *** $P < 0.001$. (D) Localization of apelin and its receptor APJ on lymphatic endothelium in sham mice or 6 weeks after MI. Note the partial colocalization between apelin-positive and NRP2-positive lymphatic vessels, suggesting a paracrine action in lymphatic endothelium. Statistical analysis was done with 1-way ANOVA with Bonferroni post-hoc multiple comparison test. Scale bars: 50 μ m (D).

The lymphatic vasculature provides local information by facilitating the trafficking of immune cells from tissues to the lymph nodes. Hyperpermeability and enlarged lymphatic vessels suggest the development of basal tissue inflammation in apelin-deficient mice. Therefore, we analyzed the lymphatic vasculature in apelin-KO mice lymph nodes. Interestingly, apelin-KO mice have an expanded lymphatic network within inguinal and mesenteric lymph nodes, thus indicating the presence of a proinflammatory status (Supplemental Figure 4). We next used flow cytometric analysis to assess the distribution of immune cell populations in the heart of apelin-KO mice compared with control mice. Although we did not observe any change in the ratio of CD3-positive T lymphocytes, we found a consistent increase in the amount of CD19-positive B lymphocytes in apelin-KO ($27.3\% \pm 3.4\%$) compared with control mice ($15.9\% \pm 1.4\%$) (Figure 4, C and D). In addition, the ratio of CD45⁺CD11b⁺CD206⁺ macrophages was reduced in correlation with an increase of the CD45⁺CD11b⁺CD206⁺ M1-like macrophage subset in apelin-KO mice (Figure 4, E and F). Our data indicate a change in the macrophage population towards an M1-like proinflammatory phenotype in apelin-KO mice. Interestingly, the macrophage population positive for CD45, CD11b, and LYVE-1 decreased in apelin-KO mice to $33.9\% \pm 3.2\%$ compared with $46.7\% \pm 3.8\%$ for control (Figure 4, E and F). LYVE-1⁺ macrophages often located close to the lymphatic vasculature have been shown to play an important role in the morphogenesis and remodeling of the lymphatic vasculature (22). Taken together, these data reveal a previously undescribed remodeling of lymphatic vasculature in adult apelin-KO mice and support the idea of an important role of apelin in the maintenance of antiinflammatory status. Conversely, an imbalance of apelin level may favor the development of a proinflammatory condition associated with an enlarged and dysfunctional lymphatic network.

The lack of apelin exacerbates a proinflammatory response and worsens abnormalities of lymphatic vasculature in MI. Infiltration of immune cells and edema are hallmarks of early-stage MI. Therefore, we investigated the phenotype of lymphatic vasculature by immunostaining using LYVE-1 and CD31 antibodies 4 days after MI. Remarkably, we observed the presence of enlarged and hyperplastic lymphatic vessels in the subepicardium close to the peri-infarct or within the infarct zone (Figure 5A). In contrast, lymphatic density was not modified, suggesting a sudden adaptation of lymphatic vessels to edema in response to heart injury (data not shown). We have previously demonstrated that apelin is crucial in the maintenance of a functional lymphatic vasculature. We found that cardiac lymphatic vessels in apelin-deficient mice 4 days after MI

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

JCI insight

RESEARCH ARTICLE

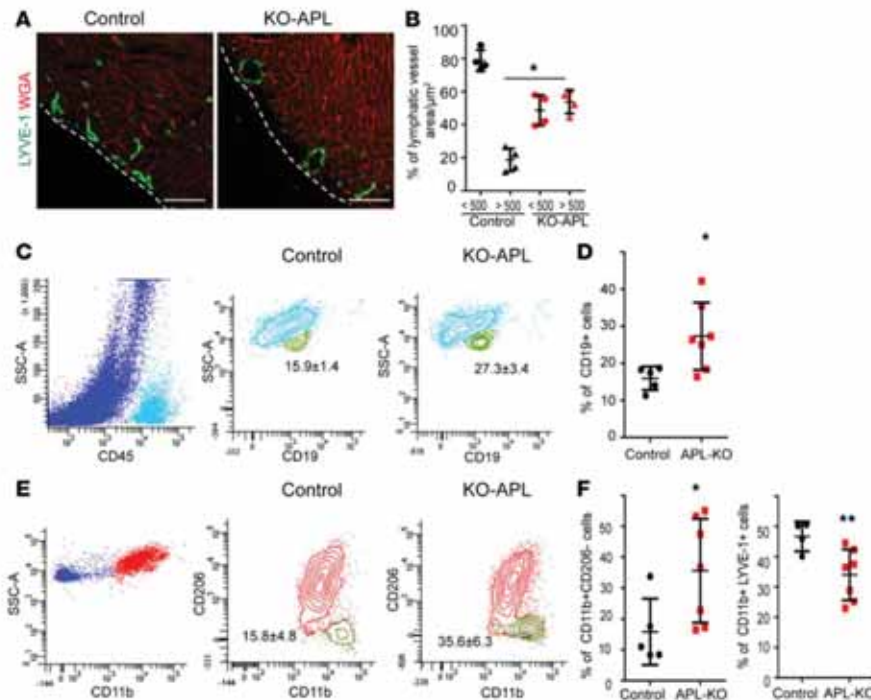


Figure 4. Apelin-KO mice develop abnormal lymphatic vasculature and a proinflammatory status. (A) Visualization of cardiac lymphatic vasculature (LYVE-1, green) and cardiomyocytes (wheat germ agglutinin [WGA], red) in apelin-KO versus control mice. Dilated lymphatic vessels were found in the subepicardial surface of the heart of adult apelin-KO mice. (B) Quantification of the area of lymphatic vessels in control and apelin-KO mice. The area of all lymphatic vessels located at the subepicardial surface was measured ($n = 4$ per group; values are percentage $\pm$ SD). $*P < 0.004$. (C) Representative panels of flow cytometric analysis of heart tissue showing the CD45⁺CD19⁺ population in apelin-KO mice compared with control. (D) Percentage of CD19⁺ in control and apelin-deficient mice. Note the increase in CD19⁺ B lymphocytes in apelin-KO mice ($n = 6-8$ per group, percentage CD45-positive cells $\pm$ SEM). $*P < 0.02$. (E) Representative flow cytometric analysis of heart showing the increase in CD11b⁺CD206⁺ in apelin-KO mice versus control. (F) Percentage of CD11b⁺CD206⁺ and CD11b⁺LYVE-1⁺ ($n = 6-8$ per group, percentage of CD11b-positive cells $\pm$ SEM). $*P < 0.04$, $**P < 0.02$. Statistical analysis was done with Student's t test. Scale bars: 100 μ m (A). APL, apelin.

exhibited dilated morphology as observed in control mice, which is probably due to the maximum capacity of lymphatic vessels reached in apelin-KO mice (Supplemental Figure 5). Remarkably, the infiltration of CD68⁺ macrophages and the expression of the proinflammatory cytokine TNF- α were greatly increased in apelin-KO mice after acute MI (Figure 5, B and C). In agreement with these results, we found that apelin-deficient mice displayed a 6-fold increase in CCL21 expression and a 2-fold increase in the expression of the lymphangiogenic factors VEGF-C and VEGF-D compared with control mice (Figure 5D). These results correlated with an increase in lymphatic vessel density 6 weeks after MI (Figure 5E). Taken together, our data indicate that the lack of apelin potentiates a proinflammatory response in the acute phase of MI.

Apelin regulates lymphatic vessel maturation and cardiac homeostasis. We next aimed to clarify a potential beneficial role of apelin after MI and generated an apelin-overexpressing lentivector to transduce the myocardium. In our model, long-term overexpression of apelin was not sufficient to significantly improve cardiac function, yet we measured a consistent decrease in cardiac fibrosis (Figure 6, A and B, and Supplemental Figure 6, A and B). To further decipher the molecular mechanisms underlying apelin's role in cardiac ischemia, we performed gene expression analysis related to cardiac hypertrophy, matrix remodeling, and inflammation. Atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) expression are upregulated in conditions of heart failure, cardiac hypertrophy, and fibrosis (23). We found that apelin limits the post-MI expression of ANP, suggesting a protective role of apelin in cardiac homeostasis (Figure 6C). Apelin also exerts its cardioprotective action by limiting cardiac fibroblast activation through sphingosine kinase 1 inhibition (24). Consistent with this report, we showed that apelin has a beneficial

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

JCI INSIGHT

RESEARCH ARTICLE

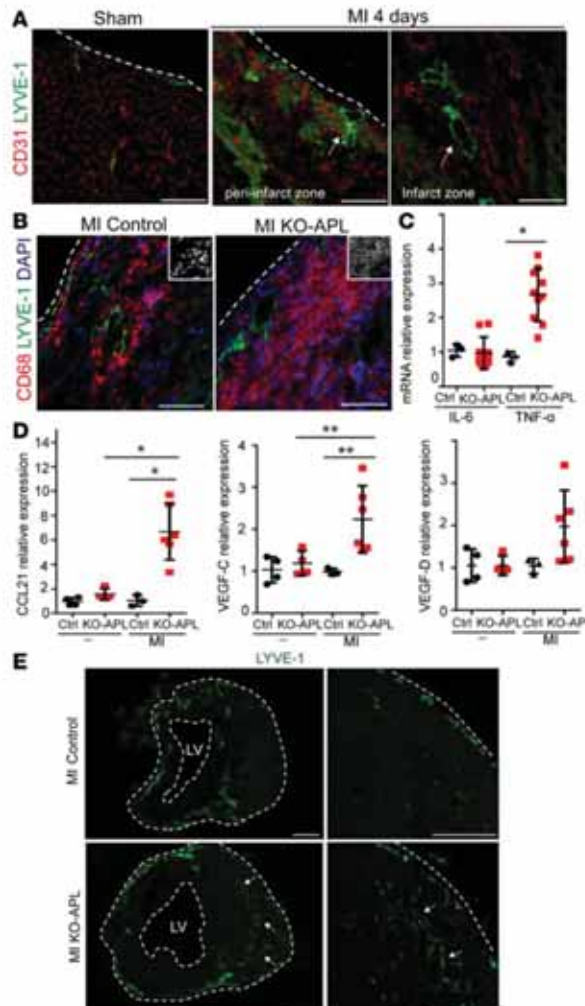


Figure 5. Apelin-KO mice exhibit strong inflammatory and pro-lymphangiogenic responses after myocardial infarction. (A) Lymphatic remodeling in WT mice 4 days after myocardial infarction (MI) examined by LYVE-1 and CD31 immunostaining. Note the presence of highly dilated and hyperplastic lymphatic vessels in the peri-infarcted and infarcted zone. (B) Visualization of lymphatic vessels (LYVE-1⁺) and macrophages (CD68⁺) in the infarct border zone 4 days after MI in apelin-KO versus control mice. Higher magnification is shown in the upper boxes. For scale, the dimensions of the higher-magnification boxes are 60 × 60 μm. (C) Expression of inflammatory cytokines *IL-6* and *Tnfα* 2 days after MI (*n* = 4 per group; horizontal bars represent the mean ± SD). **P* < 0.0002. (D) Expression of the chemokine *Ccl21* and prolymphangiogenic factors *Vegf-C* and *Vegf-D* in apelin-KO mice 2 days after MI in apelin-KO mice versus control mice (*n* = 4 per group; horizontal bars represent the mean ± SD). **P* < 0.0003, ***P* < 0.002. (E) Tile scan analysis by confocal microscopy of whole heart showing LYVE-1-positive lymphatic vessels. Dotted lines delimit the heart and the left ventricle (LV). Lymphangiogenesis is further amplified in apelin-deficient mice 6 weeks after MI compared with control. Arrows show the localization of lymphatic vessels in the right ventricle. Statistical analysis was done with 1-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. Scale bars: 100 μm (A and B) and 500 μm (E). APL, apelin.

effect on collagen, metalloproteases, hyaluronan synthase 1, and sphingosine kinase 1 expression (Figure 6D). Of note, the proinflammatory mediators *TNFα* and *IL1β* were also reduced in the presence of apelin (Figure 6E). These data correlate with a diminution in CD68⁺ macrophage infiltration in the ischemic heart in the presence of apelin (Figure 6, F and G). Importantly, lymphatic vessels acquired a regular morphology and well-shaped organization (Figure 6H). Interestingly, the number and the dilation of lymphatic vessels were remarkably decreased, suggesting that apelin/APJ signaling promotes the maturation of developing lymphatic vasculature after cardiac ischemia (Figure 6, I–K). Taken together, our data highlight a beneficial role of apelin in the cardiac microenvironment associated with functional lymphatic vascular repair after MI.

Apelin regulates SIP secretion and cell-cell junction integrity in LECs. Apelin expression is strongly induced by hypoxic stress (25). We next deciphered the molecular mechanism by which apelin controls lymphatic vessel maturation by performing an

in vitro study in LECs. First, we measured the effect of hypoxia on the expression of apelin in LECs. As expected, we found an upregulation of apelin (26) and the prolymphangiogenic receptor *CXCR4* (27) under hypoxic conditions versus normoxia (Supplemental Figure 7A). Apelin expression was induced after 8 hours under hypoxia in LECs (Supplemental Figure 7B), and the apelin peptide was detected at the LEC membranes at 24 hours by immunostaining (Supplemental Figure 7, C and D). As the integrity of the lymphatic endothelium is crucial to its function, we next investigated the consequence of hypoxic stress on the organization of lymphatic cell-cell junctions in vitro. Interestingly, hypoxia significantly decreased the abundance of VE-cadherin at cellular junctions, which is associated with cortical actin cytoskeleton disassembly (Figure 7, A and B). Therefore, we wondered whether apelin could modulate the barrier integrity of LECs in vitro under hypoxic conditions. To test this, LECs were transduced either with GFP- or apelin-lentiviral vector and then cultured under hypoxic conditions. Apelin expression was first confirmed in transduced LECs (Figure 7C). The presence of apelin prevented the loss of VE-cadherin expression in cell-cell junctions under hypoxic conditions (Figure 7, D and E). A similar finding was also observed in LECs in coculture with myoblast H9C2 cells transduced with apelin (Supplemental Figure 7E). Because VE-cadherin is the main regulator of vascular permeability, we validated that apelin prevents the permeability induced by hypoxia (Figure 7F). Altogether, our in vitro data demonstrate a beneficial role of apelin

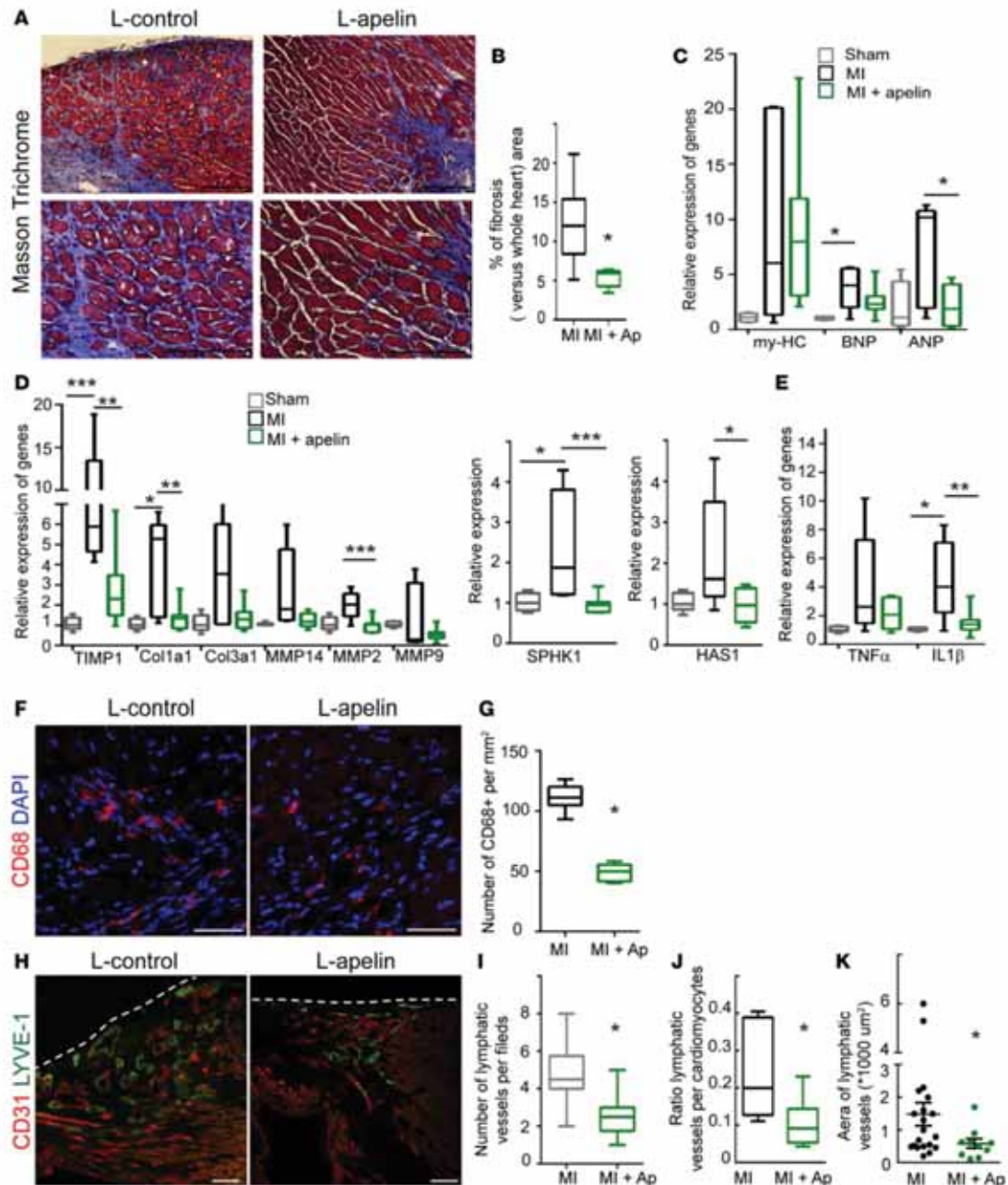


Figure 6. Apelin prevents fibrosis, inflammation, and pathological remodeling of lymphatic vasculature in chronic myocardial infarction. (A) Masson's trichrome staining in heart expressing control lentivector (L-control) or apelin lentivector (L-apelin). (B) Quantification of fibrosis ($n = 5-10$). * $P < 0.01$. (C-E) Gene expression analysis related to cardiac hypertrophy (C), matrix remodeling (D), and inflammatory mediators (E) in heart of sham mice, or 6 weeks after myocardial infarction (MI) with or without treatment with the therapeutic L-apelin ($n = 5-7$). * $P < 0.04$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$. (F) Visualization of CD68⁺ macrophages at the infarct border zone in heart transduced with L-apelin compared with control. (G) Quantification of CD68⁺ macrophages in the infarct border zone. * $P < 0.05$. (H) Visualization of lymphatic vasculature 6 weeks after MI with or without treatment with the therapeutic L-apelin. Note the absence of hyperplastic and highly dilated lymphatic vessels observed in mice treated with L-apelin. (I) Lymphatic vessel density at the infarct border zone treated with L-apelin or L-control (values are the mean $\pm$ SD). * $P < 0.01$. (J) Ratio of the number of lymphatic vessels per cardiomyocytes ($n = 6-10$). * $P < 0.05$. (K) Area of lymphatic vessels at the border of the infarct zone (values are the mean $\pm$ SD). * $P < 0.05$.

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

RESEARCH ARTICLE

are the mean $\pm$ SD). * $P < 0.05$. Ap, apelin; my-HC, myosin heavy chain; BNP, brain natriuretic peptide; ANP, atrial natriuretic peptide; TIMP1, TIMP metalloproteinase inhibitor 1; Col1a1, collagen I; Col3a1, collagen III; MMP, metalloproteinase; SPHK1, sphingosine kinase 1; HAS1, hyaluronidase synthase 1. Statistical analysis was done with 1-way ANOVA with Bonferroni post-hoc multiple comparison test (C–E) or Student's *t* test (B, G, I, J, and K). Scale bars: 100 μ m (A and H) and 50 μ m (F).

in the maintenance of barrier integrity of the lymphatic endothelium. Recent studies reported an important role of S1P in vascular and lymphatic junction maturation (10, 28). Therefore, we next wondered whether apelin in LECs could regulate the level of S1P to maintain the stability of lymphatic endothelium. S1P is generated intracellularly by the action of sphingosine kinase that phosphorylates sphingosine and is exported out of the cells by the S1P-specific transporter SPNS2 to exert an autocrine or paracrine action (29, 30). Interestingly, apelin induces the expression of the sphingosine kinase 2 and SPNS2 on LECs (Figure 7G). We validated our result in LECs constitutively expressing apelin and noted a 5-fold increase in gene expression (Figure 7H) and a significant elevation of S1P quantity in conditioned media (Figure 7I). Taken together, our results reveal a possible mechanism by which apelin modulates S1P secretion in LECs and maintains the barrier integrity of the lymphatic endothelium.

Discussion

Improving lymphatic network integrity has recently emerged as a crucial target for cardiovascular disorders. The principal challenge related to improvement of lymphatic function is to identify bioactive molecules possessing an inherent reparative ability. It has been clearly established that VEGF-C/VEGFR3 signaling contributes to cardiac lymphatic development (3, 31). Nevertheless, VEGF-C alone is not sufficient to restore the integrity of the post-MI lymphatic endothelium (2). Here, we found that apelin controls the functional stability of lymphatic endothelium in cardiac ischemia. In particular, our study highlights a potentially novel mechanistic insight into apelin-induced S1P secretion in LECs.

The heart contains a comprehensive lymphatic network mainly composed of blunted-end capillaries in the myocardium and larger collecting vessels located at the subepicardial surface of the heart. We demonstrated that those larger collecting vessels in adult heart are VEGFR3^{hi}CD31^{hi}podoplanin^{hi}NRP2^{hi}, while intramyocardial lymphatic capillaries are negative for podoplanin. A lack of podoplanin in adult mice reduces dendritic cell migration to lymph nodes (32). The presence of podoplanin in cardiac collecting lymphatic vessels emphasizes the potential role of lymphatic vessels in facilitating the trafficking of immune cells in response to inflammation-related cardiovascular diseases. Intriguingly, the majority of lymphatic vessels in rat heart are intramyocardial lymphatic capillaries that drain fluid centrifugally towards the epicardium (2). We show in mouse heart a low level of intramyocardial lymphatic vessels compared with an abundant lymphatic network located at the subepicardial surface of the heart, suggesting anatomical differences in the lymphatic network between species. Interestingly, we and others (33, 34) observed an important network of lymphatic vessels in heart valves, suggesting that lymphatic vessels may contribute to resolving inflammation and fibrosis in valvular pathologies. Indeed, recent studies have reported a strong remodeling of lymphatic vasculature in various cardiovascular diseases (35), yet the molecular mechanisms underlying the maintenance of a functional lymphatic network in cardiac diseases are still poorly described. Our study reveals that the dilation of lymphatic vasculature occurs early after MI and correlates with edema and immune cell infiltration. Although the lymphatic vasculature is a key player in the immune response, its role in the acute phase of MI remains to be elucidated. Remodeling of the lymphatic system has been recently proposed to participate in edema and tissue fibrosis in MI (2, 36). We provide evidence that the lymphangiogenic process occurs in the periphery of the ischemic zone 2 weeks after MI and extends to the right ventricle 6 weeks after MI. However, this newly formed lymphatic network associated with disrupted collagen fibers in the ischemic area is highly disorganized, tortuous, and dilated. This anarchic growth of lymphatic vessels correlates with the development of dysfunctional vessels (2). Therefore, we examined the mechanisms underlying a functional recovery of lymphatic vasculature. Apelin plays a critical role in protecting the cardiac microenvironment, regulating the behavior of extravascular cells (immune cells, fibroblasts) and blood vasculature. The observation that improvement of the post-MI cardiac lymphatic network requires apelin was first derived from the finding that the presence of the receptor APJ was only detected on activated lymphatic endothelium in ischemic heart, whereas no expression was found on quiescent vessels. Although apelin/APJ is not required during embryonic lymphatic development (15), our results highlight a restrictive role of apelin/APJ during pathological lymphangiogenesis after MI, suggesting that apelin/

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

JCI insight

RESEARCH ARTICLE

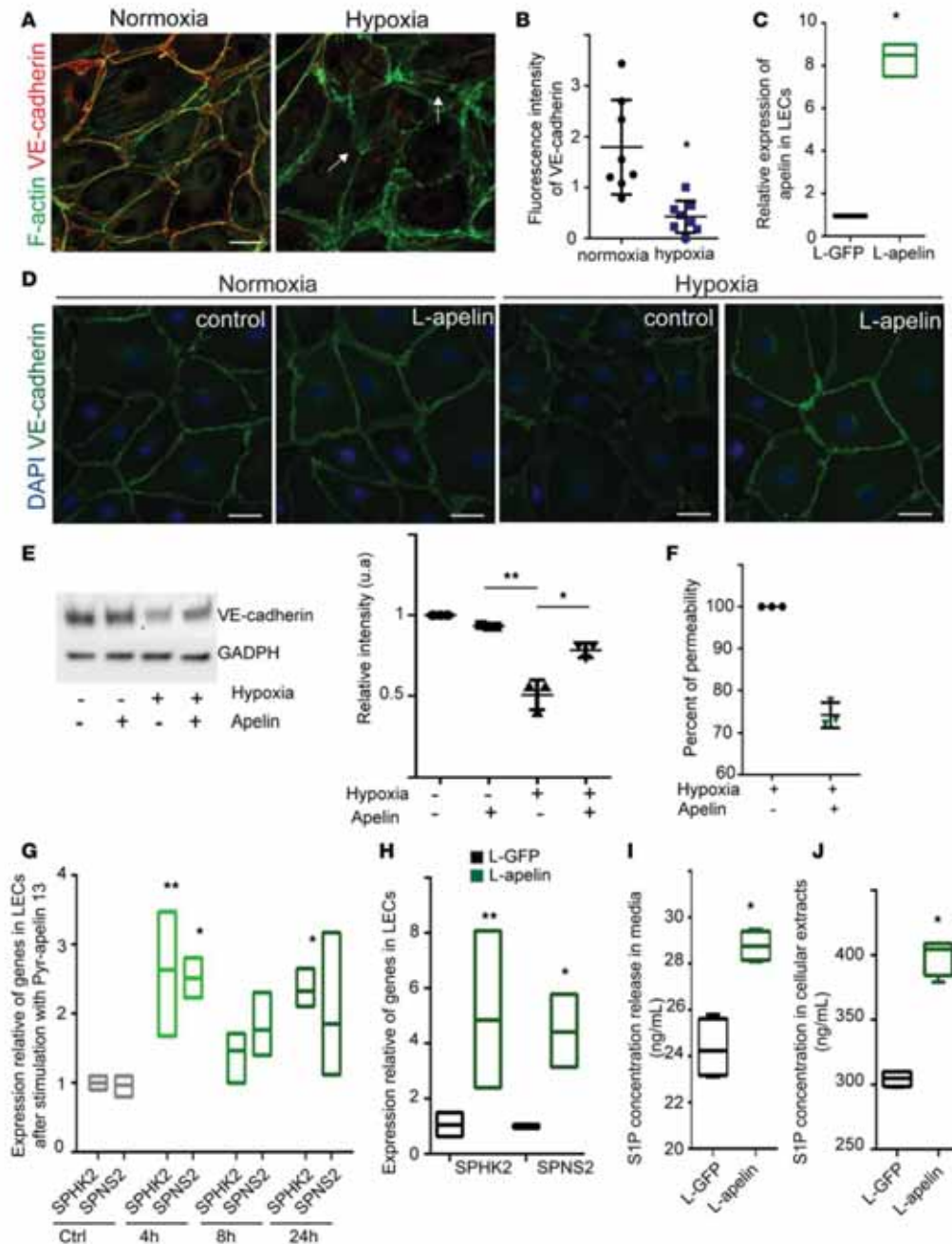


Figure 7. Apelin regulates S1P secretion and participates in the barrier integrity of the lymphatic endothelium in vitro. (A) Subconfluent lymphatic endothelial cells (LECs) were exposed to hypoxia or normoxia overnight. Note the reduction in VE-cadherin expression and loss of cortical actin cytoskeleton on newly formed cell-cell junctions between LECs under hypoxic conditions. (B) Quantification of VE-cadherin immunostaining from representative images shown in A ($n = 3$ independent experiments, data represent the mean $\pm$ SD). $*P < 0.05$. (C) Expression of apelin on LECs transduced by lentiviral vector GFP or apelin ($n = 3$ independent experiments). $*P < 0.05$. (D) VE-cadherin immunostaining in LECs transduced by lentivector GFP or apelin cultured under hypoxic or normoxic conditions. Note the maintenance of VE-cadherin at cell-cell junctions in presence of apelin in hypoxic conditions. (E) Western blot analysis of VE-cadherin in different conditions ($n = 3$ independent experiments). $*P < 0.02$, $**P < 0.009$. (F) Permeability assay with LECs under hypoxic conditions transduced with GFP or apelin. (G) Expression of sphingosine kinase 2 (SPHK2) and the transporter spinster homolog 2 (SPNS2) by

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

RESEARCH ARTICLE

RT-qPCR in LECs stimulated by the peptide apelin ($n = 3$ independent experiments, data represent the mean $\pm$ SD). * $P < 0.04$, ** $P < 0.01$. (H) Expression *SPHK2* and *SPNS2* in LECs transduced with GFP or apelin lentivector ($n = 3$ independent experiments). ** $P < 0.01$. (I and J) Sphingosine-1-P (S1P) secretion in media (I) and cellular extracts (J) of LECs ($n = 3$ independent experiments). * $P < 0.05$. Statistical analysis was done with 1-way ANOVA with Bonferroni post-hoc multiple comparison test (G and H) or Student's *t* test (B, C, E, F, I, and J). Scale bars: 20 μ m (A and D).

APJ signaling may favor metabolic adaptation of LECs in the ischemic zone. Previous studies highlighted a strict spatiotemporal regulation of apelin/APJ during blood development. In the retina, apelin is strongly upregulated in the tip cells of developing blood vessels, while the expression of the receptor APJ is mainly observed in stalk cells during vessel remodeling (37, 38). Here, we frequently observed heterogeneous expression of APJ on activated LECs, indicating that APJ is tightly regulated during lymphatic growth. In light of the literature, we hypothesize that APJ is required on activated lymphatic endothelium, whereas its expression may be downregulated on stabilized lymphatic endothelium.

Remarkably, adult apelin-deficient mice exhibit baseline abnormalities of lymphatic vasculature associated with functional defects. Enlarged and hyperplastic lymphatic vessels in apelin-deficient mice were mainly observed at the subepicardial surface of the heart. This finding points out the clinical importance of this superficial lymphatic network in limiting cardiac interstitial edema, inflammatory cells, and tissue metabolites from the myocardium to maintain heart function. In addition, this alteration of lymphatic vasculature in apelin-KO mice was accompanied by a polarization of macrophages towards the M1 proinflammatory phenotype, suggesting a defect in the lymphatic barrier in protecting from edema and immune cell trafficking. These observations are in accordance with previous literature showing that apelin has an anti-inflammatory action (39). Here, our data further indicate that the alteration of lymphatic vessels may account for the development of the proinflammatory condition. In line with these findings, we observe that the lack of apelin induces a deleterious microenvironment characterized by an increase in inflammatory mediators and immune cell infiltration after MI. Although apelin-deficient mice have normal cardiac function, these mice exhibit a susceptibility to heart failure and reduced heart contractility in aging mice (40, 41). Lymphatic vessel dysfunction associated with the accumulation of immune cells in cardiac tissue could in part explain the increase of susceptibility to MI in apelin-deficient mice. Despite the vascular (40) and lymphatic defects observed in apelin-deficient mice, we detected an increase in lymphatic vessels in these mice that overcomes the critical phase of acute MI. This observation is in line with the hypothesis that the activation of lymphatic vessels in early-phase MI may have a beneficial role in stimulating lymphangiogenic growth in the chronic phase of MI. Apelin has a pleiotropic action, facilitating cardiomyocyte contractility (19, 42) and angiogenesis (21, 43), but also limiting inflammation (39) and lowering blood pressure (18, 44). Although the expression of APJ argues for a direct role of apelin in lymphatic endothelium, all of these effects of apelin on the cardiac microenvironment may indirectly influence the lymphatic function. It would be of interest to investigate the function of APJ specifically in lymphatic endothelium by generating a lymph-specific APJ-KO mouse model. Taken together, using *in vivo* loss- or gain-of-function mouse models, our studies argue for a role of apelin in the stabilization of lymphatic vasculature in pathological settings.

Hypoxia induces strong expression of apelin in cardiomyocytes *in vivo* and *in vitro* (25). Although LECs are capable of producing apelin under hypoxic conditions *in vitro*, we cannot exclude the importance of cardiomyocytes as a potent source of apelin in the heart, arguing for a paracrine effect of apelin on lymphatic endothelium. Hypoxia is a driving force of tumor lymphangiogenesis (45). In that context, developing lymphatic vessels are more permeable and unstable, which is an aggravating factor in tumor metastasis. Hypoxia-induced angiogenesis and lymphangiogenesis is crucial to improve the healing of the infarcted zone. Of interest, hypoxia alters the stability of LEC junctions *in vitro*, indicating defective junctional and mechanical properties under hypoxic stress. Importantly, we observed a beneficial role of apelin in lymphatic barrier integrity. Furthermore, apelin limits VEGF-mediated hyperpermeability of BECs (12), indicating an important role of apelin in cell-cell junction stabilization.

The barrier integrity of lymphatic endothelium is crucial to limiting persistent edema and inflammation after MI. Among the few factors described to improve vascular function, the bioactive sphingolipid S1P is well known to control the integrity of the blood vasculature by enhancing adherens and tight junction formation (46–48). Recent work has shown that S1P also regulates the maturation of lymphatic cell-cell junctions *in vivo* (10). As lymphatic function is highly dependent on the junctional organization of lymphatic endothelium, we next wondered whether apelin could regulate S1P levels in LECs. LECs are the major source of S1P in lymph (10, 30). The concentration of S1P in lymph is dependent on the

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

RESEARCH ARTICLE

action of sphingosine kinase intracellularly and its export into the extracellular space. SPNS2 has recently been shown to specifically regulate SIP secretion into lymph by LECs (30). Here, we provide evidence that apelin regulates the expression of sphingosine kinase 2 and the transporter SPNS2 that results in the elevation of SIP. We have identified a potentially novel mechanism through which the biopeptide apelin regulates SIP secretion. SIP gradients have emerged as key regulators of the trafficking of many types of immune cells. Intriguingly, apelin-deficient mice display a proinflammatory status in heart tissue. Although we could not exclude a direct role of apelin in immune cells, an imbalance of the SIP gradient in vascular and/or lymphatic vasculature may explain this phenotype. It thus remains to be determined whether the level of SIP in lymph promotes lymphatic maturation and the trafficking of immune cells in mice following cardiac ischemia.

In conclusion, the present study highlights that apelin contributes to lymphatic vessel function, and thus cardiac homeostasis. It is particularly interesting to note that half of patients with heart failure have a preserved cardiovascular function but have multiple cardiac abnormalities such as ventricular and vascular stiffness. In that context, restoration of lymphatic function based on lentivector-associated lymphangiogenic therapy may be an interesting strategy to preserve a healthy cardiac microenvironment. In regard to these observations, we could propose a combination of VEGF-C and apelin as a lymphangiogenic therapy in ischemic disorders.

Methods

Details for materials and methods are available in the Supplemental Data.

Mouse strains. WT mice on the C57BL/6 background were provided by Janvier. Apelin-deficient mice have been previously described (41). Animal experiments were conducted in accordance with recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimentation. All animal experiments were performed according to the INSERM IACUC guidelines for laboratory animals' husbandry and have been approved by the local branch Inserm Ranguel-Purpan of the Midi-Pyrénées ethics committee. Apelin-KO mice were obtained from Philippe Valet. WT mice on the C57BL/6 background (provided by Janvier) were used as controls. All mice were from 8 to 10 weeks old. A complete description of the experimental procedure regarding MI is described in the Supplemental Data.

Flow cytometry and cardiac LEC isolation. Hearts cut into small pieces were dissociated with Liberase enzyme (Roche) for 10 minutes at 37°C. Supernatants were filtered through a 100- μ m cell strainer into a 50-ml tube on ice. After lysis of erythrocytes (RBC Lysis Buffer, eBiosciences), cells were filtered through a 40- μ m cell strainer. Cells were incubated with Fc blocking antibody CD16/CD32 (eBiosciences, catalog 16-0161) for 30 minutes, and then stained with the following antibodies on ice for 30 minutes: APC-CD31 (catalog 561814) and BB515-CD45 (catalog 564590) (both BD Pharmingen), LYVE-1-PE (R&D Systems, catalog 223322), CD19-PercP-vio700 (catalog 130-102-237), CD3-PE-vio770 (catalog, 130-109-881), CD11b-PE-vio770 (catalog, 130-109-365) (all 3 from Miltenyi Biotec), and PercP/Cy5.5 CD206 (Biolegend, catalog 141715). Dead cells were excluded from analysis using Live/Dead Violet staining (Invitrogen). Flow cytometry was performed using a BD Fortessa cytometer and FACSDiva software analysis.

For cardiac LEC isolation, 9–10 hearts from WT mice were pooled to isolate cardiac LECs. We performed the same experiment for sham mice and post-MI mice. LECs from hearts were dissociated as described previously using LYVE-1-PE, CD45-BB515, and CD31-APC antibodies. LECs (LYVE-1⁺CD31⁺CD45⁻) and BECs (LYVE-1⁻CD31⁺CD45⁻) were separated using a BD influx cell sorter. Isolated cells from all experiments were used immediately for RNA preparation.

RNA isolation and RT-qPCR analysis. Total RNA from in vivo-isolated cells and in vitro LECs were extracted with an RNAqueous-Micro Kit (Ambion). cDNA synthesis was carried out using superscript Vilo enzyme (Invitrogen). For primary LECs, we used High-Capacity cDNA reverse transcriptase (Applied Biosystems). RNA isolation from ischemic heart was carried out with TRIzol reagent (Ambion). RT-qPCR reactions were carried out on an ABI StepOne (Applied Biosystems).

Immunohistochemistry and image analysis. Cardiac lymphangiogenesis was determined from paraformaldehyde-fixed (PFA-fixed) paraffin or cryostat sections. Sections were numbered from the apex to the AV region in order to have a consistent and reproducible analysis: each slide was separated by 60 μ m with a gap of 250 μ m every 10 slides. Analysis on paraffin sections was done with anti-LYVE-1 antibody followed by secondary antibody (Impress reagent kit, Vector labs) and DAB (Vector labs). Immunofluorescence on

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

RESEARCH ARTICLE

cryosections was performed using the following antibodies: anti-mouse LYVE-1 (Rockland, 70R-LR005), neuropilin-2 (R&D Systems, AF567), VEGFR3 (R&D Systems, AF743), CD31 (BD, 553370), collagen I (Serotec, 2150-1410), and podoplanin (Developmental Studies Hybridoma Bank, 8.1.1).

Apelin and APJ antibodies have been previously described (49). Images were acquired using an LSM780 laser scanning confocal microscope (Zeiss) or Nanozoomer (Hamamatsu) for slide section imaging. Image analysis (vessel area, length, or number of branch points) was done with ImageJ software (NIH).

For whole-mount imaging, hearts were fixed with 4% PFA for 6 hours and then washed with PBS for 2 days. Permeabilization was performed in 0.3% Triton-PBS solution for 2 days before adding anti-LYVE-1 antibody. After several washes, hearts were incubated with secondary antibody conjugated to Alexa-Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch) for 1 day. Post-staining fixation in 2% PFA was performed. Whole-heart imaging was done using a Macrofluor microscope (Leica). Hearts were sectioned in 2 parts (ventral versus dorsal part) to image lymphatic vessels and collagen fibers under the multi-photon 7MP (Zeiss).

Cell culture. LECs (HDLECs, Promocell) were cultured in endothelial growth medium (EGM-MV2, Promocell) according to the manufacturer's instructions and maintained in culture for experiments up to passage 4. For hypoxia experiments, cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere under hypoxic (1% O₂) using a hypoxia chamber (Biospherix) or normoxic (21% O₂) conditions at indicated times in the figure legends. Cells were cultured at 80% confluence and reached full confluence under hypoxic conditions. Cells were fixed with 4% PFA and antibody staining was performed for VE-cadherin (Santa Cruz, sc-6458). Actin cytoskeleton was visualized by phalloidin-488 (Cytoskeleton). Quantification of fluorescence intensity was performed with ImageJ software. All images were taken with the same gain and laser intensity. For the permeability assay, LECs were cultured under confluence for 2 days on cell culture inserts (0.4 µm, Millicell) and then incubated for 24 hours under hypoxic or normoxic conditions as indicated in the figure legends. FITC-dextran, 70 kDa (1 mg/ml) was added and fluorescence intensity was measured 2 hours later in the lower chamber using a Tecan Infinite 500.

Statistics. Experiments are representative of at least 3 independent experiments, unless otherwise noted. Results are reported as mean ± SD or mean ± SEM as indicated in the figure legends. Graphs are presented either as dot plots, box-and-whisker plots, or boxes with minimum and maximum values. Statistical analyses were performed with Prism V6.0 (GraphPad Software) using 1-way ANOVA or unpaired 2-tailed Student's *t* test, as described in the figure legends.

Author contributions

FT designed the research, performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. ERG performed experiments and analyzed the data. BM and PV provided the apelin-KO mice and antibodies against apelin and APJ. FH, ACG, FP, and FM participated in the research. DC performed surgery on mice. FV performed SIP dosage. ACP participated in the research and wrote the manuscript. BGS designed the research and wrote the manuscript.

Acknowledgments

Our thanks go to the Inserm US006 platform ANEXPLO Genotoul (Toulouse, France), Victorine Douin for help and advice on flow cytometry, Christiane Pecher and Alexia Zakaroff-Girard for the cytometry platform (TRI-genotoul, Toulouse), Madjid Zanoun and Danièle Daviaud from Imagery platform (TRI-genotoul, Toulouse), J.J. Maoret and F. Martins from GeT platform Genotoul (Toulouse), and MetaToul-Lipidomique Core Facility (I2MC, Inserm 1048, Toulouse, France), MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010.

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Région Midi-Pyrénées, AFM-Telethon. F.T. had a fellowship from ARC and from the Fondation Lefoulon-Delalande. E.R.G. had a fellowship from AFM-Telethon. F.H. had fellowships from the Région Midi-Pyrénées and from the Ligue Nationale Contre le Cancer, A.C.G. from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

Address correspondence to: Florence Tatin, I2MC INSERM UMR 1048, Toulouse Cedex, France. Phone: 33.561.323.818; Email: florence.tatin@inserm.fr.

FM's present address is: Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA-Cancer, Liège, Belgium.

1. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med*. 2011;17(11):1371–1380.
2. Henri O, et al. Selective stimulation of cardiac lymphangiogenesis reduces myocardial edema and fibrosis leading to improved cardiac function following myocardial infarction. *Circulation*. 2016;133(15):1484–1497.
3. Klotz L, et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*. 2015;522(7554):62–67.
4. Losordo DW, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98(25):2800–2804.
5. Kastrup J, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(7):982–988.
6. Tammela T, et al. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med*. 2007;13(12):1458–1466.
7. D'Alessio S, et al. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3863–3878.
8. Cui Y, et al. Therapeutic lymphangiogenesis ameliorates established acute lung allograft rejection. *J Clin Invest*. 2015;125(11):4255–4268.
9. Yanagida K, Hla T. Vascular and immunobiology of the circulatory sphingosine 1-phosphate gradient. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:67–91.
10. Pham TH, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med*. 2010;207(1):17–27.
11. Yang P, Maguire JJ, Davenport AP. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(9):560–567.
12. Kidoya H, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*. 2008;27(3):522–534.
13. Kidoya H, Naito H, Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood*. 2010;115(15):3166–3174.
14. Kim JD, et al. Essential role of Apelin signaling during lymphatic development in zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(2):338–345.
15. Kidoya H, et al. APJ regulates parallel alignment of arteries and veins in the skin. *Dev Cell*. 2015;33(3):247–259.
16. Berta J, et al. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget*. 2014;5(12):4426–4437.
17. Sawane M, Kajiji K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes*. 2013;62(6):1970–1980.
18. Sato T, et al. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5203–5211.
19. Scimia MC, et al. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature*. 2012;488(7411):394–398.
20. Masri B, van den Berghe L, Sorfi C, Knibbiehler B, Audigier Y. [Apelin signalisation and vascular physiopathology]. *J Soc Biol*. 2009;203(2):171–179.
21. Tempel D, et al. Apelin enhances cardiac neovascularization after myocardial infarction by recruiting apelin⁺ circulating cells. *Circ Res*. 2012;111(5):585–598.
22. Gordon EJ, Rao S, Pollard JW, Nutt SL, Lang RA, Harvey NL. Macrophages define dermal lymphatic vessel calibre during development by regulating lymphatic endothelial cell proliferation. *Development*. 2010;137(22):3899–3910.
23. Sergeeva IA, Christoffels VM. Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2403–2413.
24. Pchejetski D, et al. Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J*. 2012;33(18):2360–2369.
25. Ronkainen VP, et al. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J*. 2007;21(8):1821–1830.
26. Eyries M, et al. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*. 2008;103(4):432–440.
27. Schioppa T, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198(9):1391–1402.
28. Camerer E, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1871–1879.
29. Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*. 2014;510(7503):58–67.
30. Mendoza A, et al. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Rep*. 2012;2(5):1104–1110.
31. Mäkinen T, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*. 2001;7(2):199–205.
32. Bianchi R, et al. Postnatal deletion of podoplanin in lymphatic endothelium results in blood filling of the lymphatic system and impairs dendritic cell migration to lymph nodes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(1):108–117.
33. Kholová I, et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(5):487–497.
34. Niimäki E, Mennander AA, Paavonen T, Kholová I. Lymphangiogenesis is increased in heart valve endocarditis. *Int J Cardiol*. 2016;219:317–321.
35. Vuorio T, Tirronen A, Ylä-Herttuala S. Cardiac lymphatics - a new avenue for therapeutics? *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(4):285–296.
36. Loukas M, Abel N, Tibbs RS, Grabska J, Birungi J, Anderson RH. The cardiac lymphatic system. *Clin Anat*. 2011;24(6):684–691.
37. Saint-Geniez M, Masri B, Malecize F, Knibbiehler B, Audigier Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev*. 2002;110(1–2):183–186.
38. Papangelis I, et al. MicroRNA 139-5p coordinates APLNR-CXCR4 crosstalk during vascular maturation. *Nat Commun*. 2016;7:11268.

Downloaded from <http://insight.jci.org> on June 15, 2017. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93887>

JCI INSIGHT

RESEARCH ARTICLE

39. Sawane M, Kidoya H, Muramatsu F, Takakura N, Kajiya K. Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. *Am J Pathol*. 2011;179(6):2691–2697.
40. Wang W, et al. Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(4):e000249.
41. Kuba K, et al. Impaired heart contractility in apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res*. 2007;101(4):e32–e42.
42. Szokodi I, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*. 2002;91(5):434–440.
43. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol*. 2006;296(1):177–189.
44. Ishida J, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(25):26274–26279.
45. Morfioisse F, et al. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep*. 2014;6(1):155–167.
46. Lee MJ, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. 1999;99(3):301–312.
47. Lee JF, et al. Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J Biol Chem*. 2006;281(39):29190–29200.
48. Liu Y, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*. 2000;106(8):951–961.
49. Picault FX, Chaves-Almagro C, Progetti F, Prats H, Masri B, Audigier Y. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur J Cancer*. 2014;50(3):663–674.

Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema

Florent Morfioisse,* Florence Tatin,* Benoit Chaput, Nicole Therville, Charlotte Vaysse, Raphael Métivier, Julie Malloizel-Delaunay, Françoise Pujol, Anne-Claire Godet, Fabienne De Toni, Frédéric Boudou, Katia Grenier, David Dubuc, Eric Lacazette, Anne-Catherine Prats, Julie Guillermet-Guibert, Françoise Lenfant, Barbara Garmy-Susini

Objective—Estrogens exert beneficial effect on the blood vascular system. However, their role on the lymphatic system has been poorly investigated. We studied the protective effect of the 17 β estradiol—the most potent endogenous estrogen—in lymphedema—a lymphatic dysfunction, which results in a massive fluid and fat accumulation in the limb.

Approach and Results—Screening of DNA motifs able to mobilize ERs (estrogen receptors) and quantitative real-time polymerase chain reaction analysis revealed that estradiol promotes transcriptional activation of lymphangiogenesis-related gene expression including VEGF (vascular endothelial growth factor)-D, VEGFR (VEGF receptor)-3, lyve-1, and HASs (hyaluronan synthases). Using an original model of secondary lymphedema, we observed a protective effect of estradiol on lymphedema by reducing dermal backflow—a representative feature of the pathology. Blocking ER α by tamoxifen—the selective estrogen modulator—led to a remodeling of the lymphatic network associated with a strong lymphatic leakage. Moreover, the protection of lymphedema by estradiol treatment was abrogated by the endothelial deletion of the receptor ER α in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice, which exhibit dilated lymphatic vessels. This remodeling correlated with a decrease in lymphangiogenic gene expression. In vitro, blocking ER α by tamoxifen in lymphatic endothelial cells decreased cell–cell junctions, inhibited migration and sprouting, and resulted in an inhibition of Erk but not of Akt phosphorylation.

Conclusions—Estradiol protection from developing lymphedema is mediated by an activation of its receptor ER α and is antagonized by tamoxifen. These findings reveal a new facet of the estrogen influence in the management of the lymphatic system and provide more evidence that secondary lymphedema is worsened by hormone therapy.

Visual Overview—An online visual overview is available for this article. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:1346-1357. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.310997.)

Key Words: animals ■ endothelial cells ■ lymphatic vessels ■ lymphedema ■ mice

The hormonal control of lymphatic tissue is an important issue for decades but remains largely unexplored. The role of estrogens, particularly the 17 β -estradiol, is clearly established for development of sexual characters, reproduction, and in many physiological processes, including cardiovascular function.^{1–4} The biological effects of estradiol are initiated after binding to the ERs (estrogen receptors) α and β , belonging to a nuclear receptor subfamily of ligand-inducible transcription factors.^{5,6} The endothelial function of estradiol is mediated by the receptor ER α .^{7,8} Estradiol induces ER dimerization to promote gene expression regulation by binding directly to DNA sequences called estrogen response elements (EREs)⁹ or indirectly through protein–protein interactions with other DNA-binding transcription factors.^{10,11} ER α has also been localized at the plasma membrane and mediates nongenomic signaling pathway leading to ERK and Akt phosphorylation.^{12,13}

Despite an abundant literature demonstrating the beneficial effect of estradiol on blood vessels, nothing is known about its effects on lymphatic endothelium. Estradiol influences subcutaneous tissue and morphology by controlling hyaluronic acid synthesis¹⁴—a major extracellular matrix ligand for the lymphatic endothelial cell (LEC) receptor Lyve-1¹⁵—suggesting an indirect effect on lymphatic homeostasis. A defect in estrogens has been associated with cardiovascular diseases because women develop 2 to 3 $\times$ less cardiovascular diseases before menopause.¹⁶ Importantly, hormonal status has been associated with lymphatic disorders, such as lymphedema—a disorder of the lymphatic vascular system characterized by impaired lymphatic return and swelling of the extremities and an accumulation of fat and fibrosis in the arm or the leg.¹⁷ Whereas primary lymphedema—a rare disease—is sex linked with an average ratio of 1 male for 3 females,

Received on: October 31, 2017; final version accepted on: March 19, 2018.

From the Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases of Toulouse, Université de Toulouse (F.M., F.T., F.P., A.C.G., F.D.T., F.B., E.L., A.C.P., F.L., B.G.-S.) and Unité Mixte de Recherche 1037-Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (N.T., J.G.-G.), Inserm, Université Paul Sabatier, France; Department of Plastic Surgery (B.C.) and Department of Vascular Medicine (J.M.-D.), Centre Hospitalo-Universitaire Rangueil, Toulouse, France; Department of Gynecology Surgery, IUCT-Onco-pole, Toulouse, France (C.V.); Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6290, Rennes, France (R.M.); and Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes, Toulouse, France (K.G., D.D.).

*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.118.310997/-/DC1>.

Correspondence to: B. Garmy-Susini, PhD, INSERM U1048, 1 Ave Jean Poulhès, 31432 Toulouse, France. E-mail barbara.garmy-susini@inserm.fr

© 2018 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.310997

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen response element
HAS	hyaluronan synthase
HOLEC	human dermal lymphatic endothelial cell
LEC	lymphatic endothelial cell
OVX	ovariectomized
PCR	polymerase chain reaction
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

the role of hormones, in particular estrogens, has never been investigated in secondary lymphedema.^{18,19} Secondary lymphedema occurs after cancer treatment or filarial infection.^{20–22} Although it is a common disabling disease causing significant morbidity, treatment of lymphedema remains limited and largely ineffective, mainly consisting in compression bandaging. In Western countries, 10% to 15% of women develop lymphedema after breast cancer treatment.^{23–25} Despite the recent improvement of surgical techniques, lymphedema remains a frequent concern of cancer surgery. An issue to study secondary lymphedema has been hampered by the lack of experimental model. However, mouse-induced lymphedema has been described after a circumferential incision made through the dermis close to the tail base to sever the dermal lymphatic vessels.²⁶ In parallel, a primary lymphedema has been generated by heterozygous inactivating missense mutations of the gene encoding VEGF (vascular endothelial growth factor)-C/D receptor (VEGFR [VEGF receptor]-3).²⁷ In this study, we developed a novel model of secondary lymphedema mimicking human pathogenesis of secondary lymphedema to explore the effect of estradiol on lymphatic endothelium. We found that ER α directly regulates lymphangiogenic genes to promote LEC migration and sprouting. We determined that blocking ER α using a selective estrogen modulator, such as the tamoxifen, has a detrimental effect on lymphatic drainage and function, increasing the risk of developing secondary lymphedema. Importantly, the endothelial inactivation of ER α in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{loxP/loxP}}$ mice showed enlarged and abnormal lymphatic vessels associated with a loss of estradiol-protective effect on lymphedema. Mechanistically, estradiol targeted both gene expression and cell morphology to activate LEC Erk signaling suggesting that both nuclear and membrane ER α are expressed in LEC.

Altogether, this study suggests the crucial role of estradiol—the most predominant estrogen—in restoring a functional lymphatic endothelium after healing. Our work not only deciphers the mechanism of the role of estradiol on the LEC but involves medical aspects of quality of life of patients with breast cancer because no treatment is currently proposed to women who developed secondary lymphedema.

Materials and Methods

The authors declare that all supporting data are available within the article.

Reagents

Rabbit anti-mouse lyve-1 antibody (RDI-103PA50) was from Research Diagnostics, Inc (Concord, MA). Donkey anti-rabbit and rat IgGs conjugated with alexa 488, 594 were from TebuBio (TebuBio,

Le Perray en Yvelines, France). Anti-pSer473Akt, anti-Akt, and anti-pThr202/Tyr204 Erk1/2 are from Cell Signaling Technology. Anti-phalloidin was from Cytoskeleton (acti-stain phalloidin 488, cat PHDG1). Anti-phospho-VEGFR-3 is from Cell Applications, Inc. Masson trichrome and Red oil were from Sigma-Aldrich, France. Alcian Blue was from Sigma-Aldrich. Matrigel was from BD. Tamoxifen and 17 β estradiol are from Sigma-Aldrich. MEK inhibitor (PD098059) was from Invivogen.

Mouse Model of Lymphedema

Animal experiments were conducted in accordance with recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation. All animal experiments were performed according to the INSERM IACUC guidelines for laboratory animal husbandry and have been approved by the local branch Inserm Ranguieu-Purpan of the Midi-Pyrénées ethics committee. Mice model will be restricted to female mice because this article is focusing on the effect of estrogen and women breast cancer-associated hormone therapy. Lymphedema was established in the left upper limbs of 6-week-old C57Bl/6 female mice. Bilateral ovariectomy were performed on 4-week-old C57Bl/6 followed by implantation of 60-day time release 17 β estradiol pellets (0.1 mg estradiol, releasing 80 g/kg per day, Innovative Research of America, FL) or tamoxifen (5 mg pellet Innovative Research of America, FL) subcutaneously into the back of the animals using a sterile trocar or with placebo-releasing pellets. Two weeks after ovariectomy, lymphedema surgical procedure is performed. A partial mastectomy of the second mammary gland is associated with axillary and brachial lymphadenectomy. Limb size was measured in the axillary and distal regions using caliper. Mice sustained reproducible edema for a period of >2 weeks.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total cellular RNA was isolated from mouse skin and subcutaneous adipose tissue using a TissueLyser (Ultrathurax; IKA, Staufen, Germany) in Trizol solution according to manufacturer instructions. A total of 1 μ g RNA was used to synthesize cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). The expression of human and murine VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3, Lyve-1, HAS1, HAS2, and HAS3 was investigated by SYBR Green real-time reverse-transcribed polymerase chain reaction (PCR) using the AB 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Each reaction was run with 18S as a reference gene, and all data were normalized based on the expression levels of 18S.

Primers

VEGF-C (F): 5'-AGGGAAGAAGTCCACCATCA-3'; VEGF-C (R): 5'-ACAATGCTTCAGTCGATTCGC-3'; VEGF-D (F): 5'-CCTATTGACATGCTGTGGGAT-3'; VEGF-D (R): 5'-GTGGGTTCCTGGAGGTAAGAG-3'; VEGFR-3 (F): 5'-TTTATGTCCACCCCCACTAC-3'; VEGFR-3 (R): 5'-GGCTGAGCTACAAGGCAATCG-3'; HAS1 (F): 5'-TAACTACGTCCCGTGTTCG-3'; HAS1 (R): 5'-CAGCAAGGTGGTAGGCTTCA-3'; HAS2 (F): 5'-CACTGCTGCTGGGACTTGAA-3'; HAS2 (R): 5'-AGACATCATCCCACGTCCT-3'; HAS3 (F): 5'-AAGGACCGATCTGAAACGCA-3'; HAS3 (R): 5'-TACAAGCCCATCTGCCCAAT-3'; 18S (F): 5'-CAACTAAGAACGGCCATGCA-3'; 18S (R): 5'-AGCCTGCGGCTTAA TTTGAC-3'; Lyve-1 (F): 5'-CAGCACACTAGCCTGGTGTGA-3'; Lyve-1 (R): 5'-CGCCCATGATTCTGCATGTAGA-3'; sh RNA ERA (TRCN000003300) is from Sigma-Aldrich.

LEC Isolation

Mice were injected twice with a 2-week interval with incomplete Freund adjuvant to develop lymphangioma on diaphragm and liver surface. After 4 weeks, tumors are harvested before digestion in liberase TM enzyme (Roche) for 10 minutes at 37°C. Supernatants were filtered through a 100- μ m cell strainer into a 50-mL tube on ice. After lysis of erythrocytes (RBC lysis buffer; eBioscience), cells were filtered through a 40- μ m cell strainer. Cells were incubated with Fc-blocking antibody CD16/CD32 for 30 minutes and then stained for the following antibodies on ice for 30 minutes: APC-CD31,

CD45-BB515 (BD Pharmingen), and LYVE-1-PE (RD Systems). Dead cells were excluded from analysis using live dead violet staining (Invitrogen).

LEC isolation: Lymphangioma from Tie2-cre; ER $\alpha^{tm/m}$ mice and control littermates were pooled to isolate LEC. LECs were then dissociated as described previously using LYVE-1-PE (RD Systems:223322), CD45-BB515 (BD Pharmingen:564590), and CD31-APC (BD Pharmingen:561814) antibody. LECs (LYVE-1+ CD31+ CD45-) were separated using a BD influx cell sorter.

Flow Cytometry Analysis

Lymph nodes from normal, OVX (ovariectomized), estradiol, and tamoxifen-treated mice were removed at the time of the lymphedema surgery and compared with lymph nodes from the same mice, which developed lymphedema 4 weeks after surgery. Lymph nodes were dissociated with liberase TM enzyme (Roche) for 10 minutes at 37°C. Supernatants were filtered through a 100- μ m cell strainer into a 50-mL tube on ice. After lysis of erythrocytes (RBC lysis buffer; eBioscience), cells were filtered through a 40- μ m cell strainer. Cells were incubated with Fe-blocking antibody CD16/CD32 (Affymetrix, eBioscience) for 30 minutes and then stained for the following antibodies on ice for 30 minutes: BB515-CD45 (BD Pharmingen), CD11b-PEvio770 (Miltenyi Biotec 130-109-365), CD206 PerCP/Cy5.5 (BioLegend, 141715), and F4/80 (BioLegend, clone BM8). Dead cells were excluded from analysis using live dead violet staining (Invitrogen). Experiment controls were performed using the appropriate control antibodies (APC-IgG2a, 400511; BB515-IgG2b, 564421; REA control PEvio770, 130-104-616, PerCP/Cy5.5,400531). Flow cytometry was performed using a BD Fortessa cytometer and FACS Diva software analysis.

Intralymphatic FITC-Dextran Injections

Mice were anesthetized with a subcutaneous injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and the integrity of the lymphatic vasculature of the skin was examined by fluorescence microlymphangiography. A fluorescently labeled macromolecule (70000 kDa fluorescein isothiocyanate-dextran-conjugated dextran, 2 mg/mL; Sigma-Aldrich, France) was injected into the footpad of the edematous and control leg. Because of its large size, the tracer was taken up by the lymphatics but was excluded from the blood vasculature. As the lymphatic vessels transported fluorescent tracer, it was clearly visible within dermal lymphatic capillaries and collecting vessels, thus providing a clear visualization of lymphatic functionality. The integrity of the lymphatic vasculature was monitored with a Leica Dmi8 (Leica Microsystems, France). Score quantification of the leakage has been established: score 1 corresponds to no leakage, score 2 corresponds to 1 to 50 m leakage, and score 3 corresponds to >50 m leakage.

Whole-Mount Immunostaining

For whole-mount immunostaining, samples were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 2 hours on ice. After washing twice in PBS, samples were permeabilized in PBS 0.1% TritonX-100 (PBST) and saturated for 2 hours in PBS containing 0.1% TritonX-100 and 3% milk (PBSMT) at RT. After washing twice in PBS, samples were incubated with primary antibodies: anti-mouse podoplanin from Developmental Studies Hybridoma Bank at 0.3 μ g/mL; rabbit anti-mouse Lyve-1 (Interchim 70R-LR005) at 2 μ g/mL, and rat anti-mouse CD31 (BD 553370) at 2.5 μ g/mL in PBST overnight at 4°C with gentle agitation. Samples were washed every 15 minutes during 3 hours in PBST and incubated overnight at 4°C with secondary antibodies in PBST. Samples were then washed as described for the primary antibodies and mounted in Mowiol (Mowiol 4-88; Hoechst) supplemented with 2.5% antibleaching agent DABCO (Sigma-Aldrich, France). Images were recorded using an LSM780 laser scanning confocal microscope (Zeiss). Negative controls were performed with no primary antibody.

Dermis Size Quantification

Dermis size quantification was performed using 10 measurements of the length between epidermis and hypodermis per field, 6 tissue sections per mice, and 5 mice per group.

Transcription Factor Motif Identifications

Annotation of the promoter regions of *Figf*, *Flt4*, *Has1*, *Has2*, and *Lyve1* genes was performed under the gene search algorithm included in the motifmap webservice (<http://motifmap.ics.uci.edu/>).²⁸ We analyzed the DNA sequences (mm9 genome annotation) corresponding to the -5000/+1000-bp region surrounding the transcription starting site of each gene to search for transcription factor-binding sites. To ensure statistical significance, we retained as putative binding sites only those determined with a Z score >2 and an FDR threshold <0.5. The DNA sequence corresponding to motifs resembling to ER-binding sites (binding sequences for Hnf4 α and other nuclear receptors) was retrieved from the UCSC browser (<http://genome.ucsc.edu/>)²⁹ and additionally visually inspected for its correspondence with known ER motifs.

Cell Culture

Human dermal LECs (HDLECs; Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured in endothelial growth medium MV2 containing 5% FBS (Promocell). Twenty-four hours before the experiments, culture media was replaced by endothelial growth medium MV2 phenol red free. Survival assay was performed using 1 nM 17 β estradiol and 1 M tamoxifen. Proliferation, migration, and branching assays were performed as described previously.³⁰ Positive control consists in 5% FBS and negative control consists in 0.5% serum with ethanol (1/1000).

Microwave Sensor

Mice were anesthetized with a subcutaneous injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and 5 measures were performed on 5 different locations to cover the entire edematous area. For each of them, a pulse of microwaves from 0 to 1.5 GHz frequency, the incident wave, was applied to skin. Skin components, including fluids and ions, will thus either absorb or reflect a part of these waves to induce a reflected wave. Reflected wave reflection, absorption, and delay were analyzed on each measure to determine the reflection coefficient phase of the skin. This coefficient directly correlates with the quantity of tissue fluids.

Permeability Assay

LEC were cultured under confluence for 3 days on cell culture inserts (0.4 μ m, Millicell) and then treated overnight with estradiol or Tamoxifen in 0.5% serum phenol-free medium as indicated in the figures. FITC-dextran 70 KD (1 mg/mL) was added and fluorescence intensity was measured at 30 minutes or 1 hour after in lower chamber by Tecan Infinite 500.

Western Blot Analysis

Cells were harvested on ice, washed twice with cold PBS, collected, and frozen at -80°C. Dry pellets of cells were lysed in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100 (X100; Sigma) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (sodium orthovanadate [S6508; Sigma], 1 mmol/L DTT, 2 mmol/L NaF [S1504; Sigma], and complete Mini Protease Inhibitor Cocktail [ROCHE]). Protein concentration was measured using BCA Protein Assay Kit (Interchim), and equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (BioTraceNT, Pall Corp). Membranes were washed in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20 and then saturated in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20 with 5% nonfat dry milk, incubated overnight with primary antibodies in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20 with 5% BSA, washed and revealed according to Cell Signaling Technology protocol. Western blotting was conducted using standard methods with the following antibodies: p-Akt S473 (cat No. 4060, 1:2000; Cell Signaling Technology), pan-Akt (cat No. 4691S, 1:1000; Cell Signaling Technology), p-ERK1/2 (cat No. 4370, 1:1000; Cell Signaling Technology), GAPDH (6C5; cat No. sc-32233, 0.1 μ g/mL; Santa Cruz Biotechnology), and ER α clone 60C (N-term; cat No. 04-820, 1:2000; Millipore).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using either a 2-tailed Student *t* test for analyses of 2 groups or 1-way ANOVA for analyses

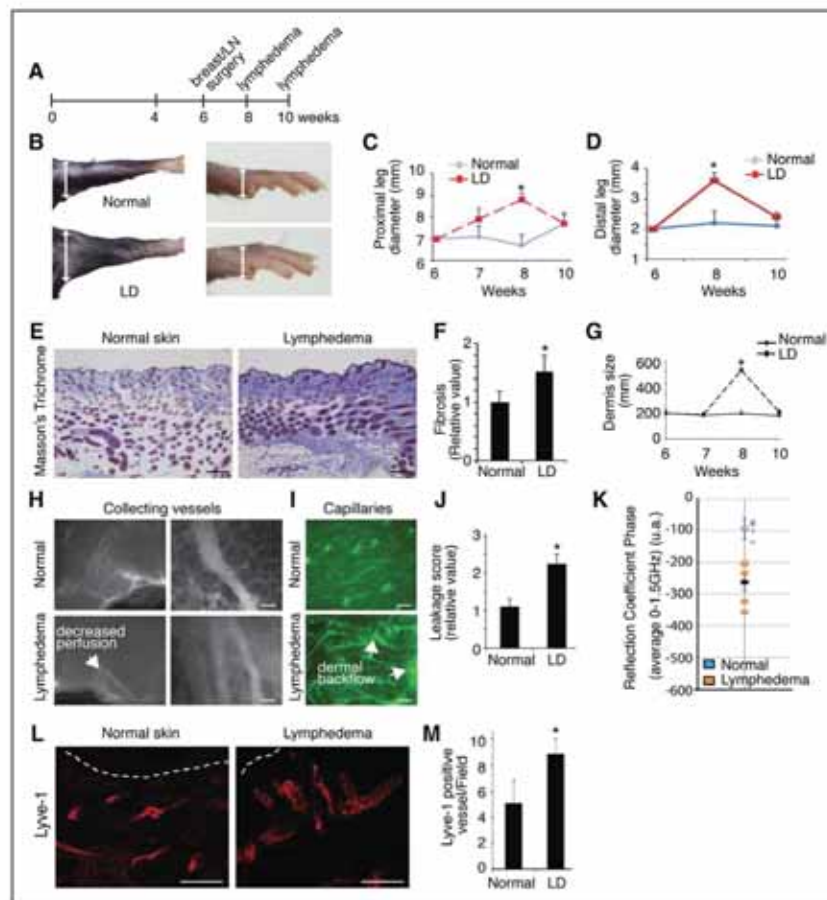


Figure 1. Mice experimental model of surgery-induced secondary lymphedema. **A**, Schematic representation of the experimental procedure. Mastectomy and lymphadenectomy are performed in 6-wk-old mice. **B**, Swelling develops 2 wk after surgery in proximal (left) and distal (right) part of the leg. **C**, Quantification of the proximal leg swelling revealing lymphedema 2 wk after surgery ($n=10$). $^{*}P<0.01$. **D**, Quantification of the distal leg swelling. $^{*}P<0.01$. **E**, Masson trichrome staining of the skin from mice with lymphedema (scale bar=50 μ m). **F**, Fibrosis quantification (blue pixels) normalized to normal skin. $^{*}P<0.01$. **G**, Mouse lymphedema exhibits increase of dermis size 2 wk after surgery. $^{*}P<0.001$. **H**, Fluorescence microlymphangiography revealed an altered lymphatic drainage in lymphedema (left) that is not associated with collecting vessel disruption (right; scale bar=25 μ m). **I**, Footpad FITC-dextran injection shows capillary dermal backflow in lymphedema (scale bar=50 μ m). **J**, Relative quantification of dermal leakage in lymphedema. $^{*}P<0.001$. **K**, Electric properties of lymphedematous skin exhibit strong frequency dispersion in microwave bands, which translate into a specific signature as consequent of microwave radiation reflection and absorption. Lymphedematous leg exhibits delay in microwave reflection coefficient phase ($n=5$). **L**, Skin immunodetection of the lymphatic vessels in lymphedema (scale bar=50 μ m). **M**, Quantification of lymphatic vessel density in lymphedema. $^{*}P<0.01$.

of ≥ 3 groups. One-way ANOVA was followed by post hoc test of Bonferroni (Figures 1C, 1D, 2B, and 3A). All experiments were performed 3 $\times$, where the quantification is reported as the average $\pm$ SEM of 3 separate animal experiments, $^{*}P<0.01$, $^{**}P<0.001$.

Results

ER α Targets Lymphangogenic Genes

To determine whether the receptor ER α could control lymphatic-related genes, we first screened the sequences of the promoter regions of *VEGF-D*, *VEGF-C*, *VEGFR-3*, *Lyve-1*, and *HAS* to identify potential DNA motifs able to mobilize ER (full or half-ERE and AP1; Figure 4A). We found ERE or

half-ERE in all genes except for *VEGF-C* (Figure 4A; Table 1 in the online-only Data Supplement). *VEGF-D* and *VEGFR-3* both contain a putative binding site for ER in their first intron. Hyaluronan receptor *Lyve-1* and *HAS-1* and *HAS-2* were identified as containing AP1 and ERE/half-ERE sequences, respectively (Figure 4A). These data suggested a putative gene regulation by the ER. To confirm the regulation, we studied gene expression in vivo in estradiol-treated mice. Mice were ovariectomized at 4 weeks of age and implanted either with 17 β estradiol pellets (80 μ g/kg per day) or with placebo-releasing pellets. Treatment was validated by the increase in uterine weight in estradiol-treated ovariectomized animals

(Figure 1A and 1B in the online-only Data Supplement), and quantitative real-time PCR was performed on skin mRNA (Figure 4B through 4E). As expected, we found an upregulation of *VEGF-D* (Figure 4B), *VEGFR-3* (Figure 4C), *Lyve-1* (Figure 4D), and *HASs* (Figure 4E) in estradiol-treated animals. This upregulation was associated with an increase in skin lymphangiogenesis (Figure 4F and 4G). To confirm that estradiol could modify lymphatic-related genes in the lymphatic endothelium, we investigated the expression of LYVE-1 and VEGFR-3 in LECs in vitro. We first confirmed by quantitative real-time PCR and Western blot that HDLECs express only the receptor ER α , but not ER β , suggesting a selective effect of this receptor in lymphatic endothelium (Figure 1C and 1D in the online-only Data Supplement). As HDLECs are isolated from male foreskin, we wondered whether sex gender could influence the ER α expression in tissues to eliminate bias related to gender cell origins (Figure 1E in the online-only Data Supplement). As expected, we could not find any tissue-specific variation between male and female. Interestingly, we found an activation of Lyve-1 and VEGFR-3 mRNA expression in estradiol-stimulated HDLEC (Figure 4H and 4I). To further demonstrate that the effect of estradiol is mediated by ER α , ER α was knocked down using shRNA in HDLECs (Figure 4J). The depletion of ER α using shRNA abolished the induction of the ER α -targeted gene VEGF-A induced by estradiol (Figure 4F in the online-only Data Supplement). Also, the increase of VEGFR-3 and LYVE-1 expression induced by estrogen treatment was abolished in shER α -transfected cells confirming that ER α mediates lymphatic gene expression in LECs in response to estradiol (Figure 4K and 4L).

Mice Model of Secondary Lymphedema

To study whether estrogen level may influence lymphatic function in secondary lymphedema, we established an original mouse model of lymphedema induced by second mammary gland mastectomy associated with axillary and brachial lymphadenectomy on 6-week-old C57Bl/6 female mice (Figure 1A; Figure 1IA in the online-only Data Supplement). In this model, mice sustained reproducible edema for a period of >2 weeks as limb volume measurements systematically peaked 2 weeks after the surgery procedure with a volume increase of 20% to 25% in proximal (axillary) and distal (foot) part of the leg (Figure 1B). Then, resolution of edema consistently occurred after 4 weeks (Figure 1C and 1D). Using Masson trichrome coloration, we observed clinical signs occurring in lymphedema, including skin fibrosis (Figure 1E and 1F) and increased dermis thickness (Figure 1G). Lymphatic circulation was next investigated in collecting vessels and in capillaries using intralymphatic injection of dextran-FITC. The overall lymphatic perfusion was decreased in lymphedematous limb without any effect on collecting vessel shape (Figure 1H). In contrast, we observed an important lymphatic leakage (dermal backflow) in superficial capillary network (Figure 1I) as shown by the lymphatic leakage score (Figure 1J). Early detection of lymphedema is a major challenge in the patient health care. For this purpose, we developed an original device based on microwave reflection analysis to detect early swelling (Figure 1K; Figure 1IB in the online-only Data Supplement). Microwave relies on the

specific electric properties of living tissues, such as skin, muscle, fat, and many others, which are different from those of gases (air) or other solid and nonbiological material (glass or plastic). We observed a shift in reflection coefficient phase relative to limb edema (Figure 1K). This alteration of lymphatic function in our mice model of lymphedema was accompanied by an increase of lymphatic vessel density in skin (Figure 1L and 1M) indicating a strong activation of lymphangiogenesis during the onset of lymphedema.

Secondary Lymphedema Is Prevented by Estrogens but Is Aggravated by Tamoxifen Treatment

Deciphering whether estrogen could play a role in lymphatic function remains a crucial challenge for breast cancer-related lymphedema because for decades, selective ER modulators, such as tamoxifen, are used in first line of hormone therapy for women who develop breast cancer. Toward this aim, mastectomy and lymph node dissection were performed on OVX mice implanted with estradiol, tamoxifen, or placebo pellets 2 weeks before surgery (Figure 2A). Remarkably, edema was observed in OVX group and was exacerbated by blocking ER α using tamoxifen. Notably, the protective effect of estradiol on lymphedema was abolished by tamoxifen, and lymphedema was maintained 4 weeks after surgery (Figure 2B). Estradiol and tamoxifen did not induce modifications of the basal lymphatic network architecture in ear skin (Figure 1II in the online-only Data Supplement). In contrast, in the context of lymphedema, we observed an induction of skin lymphangiogenesis in both estradiol and tamoxifen-treated groups (Figure 2C and 2D). Despite an absence of modification in lymphatic vessel density between estradiol and tamoxifen treatment, we observed an important lymphatic leakage (arrows) in superficial capillaries network in OVX mice that was prevented by estradiol treatment showing a protective effect of estradiol on the endothelial barrier (Figure 2E). On the opposite, tamoxifen aggravated the dermal backflow that was, in part, reduced by estradiol (Figure 2E and 2F). Interestingly, deeper lymphatic collecting vessels were not affected by tamoxifen confirming an impact restricted to the capillary network (Figure 2G). This effect was associated with changes in water and ion contents as assessed using microwave sensor showing a shift between estradiol and tamoxifen (Figure 2H).

Estrogens are potent anti-inflammatory regulators of cutaneous healing.³¹ To evaluate whether estradiol and tamoxifen could have an effect on the inflammatory status, immune response was analyzed by flow cytometry in brachial and axillary lymph nodes to evaluate the systemic inflammation (Figure 2I and 2J). Estradiol partially decreased F4/80-positive macrophages, and this effect was not abolished by tamoxifen (Figure 2I). Lymphatic injury increased the number of macrophages and favored M2 differentiation as observed previously in the mouse tail model of lymphedema.³² Our findings suggest that macrophages home to lymphedematous tissues and differentiate into the M2 phenotype. Surprisingly, tamoxifen had no major effect compared with estradiol on the inflammatory process in our model (Figure 2J). As we previously demonstrated the role of estradiol on controlling lymphangiogenic genes expression, we wondered whether tamoxifen

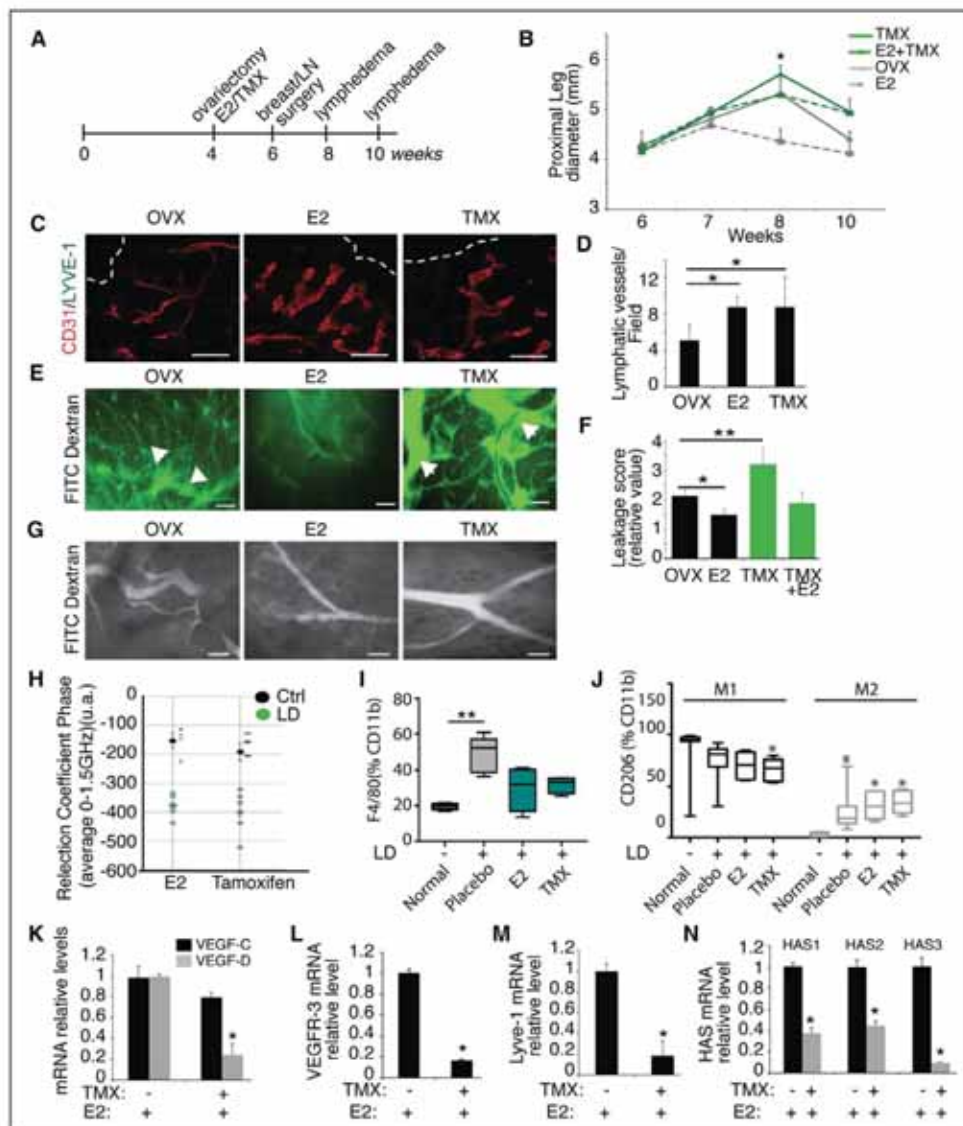


Figure 2. Tamoxifen (TMX) inhibits beneficial effect of estrogen on lymphatic endothelium. **A**, Schematic representation of the experimental procedure. Sixty-day released estradiol (E2) or TMX subcutaneous pellets are implanted 2 wk before lymphedema surgery. **B**, Mice proximal leg diameter measurement shows that TMX aggravates swelling and inhibits the reduction of edema 4 wk after surgery (n=10). **C**, Skin immunodetection of the lymphatic vessels in E2 or TMX-treated lymphedematous leg (scale bar=50 μ m). **D**, Quantification of lymphatic vessel density. **E**, FITC-dextran intralymphatic injections revealed leaky lymphatic capillaries in edematous skin in that is reduced by E2 and aggravated by TMX (scale bar=50 μ m). **F**, Relative quantification of the leakage shows that E2-improved lymphatic drainage is antagonized by TMX. **G**, FITC-dextran intralymphatic injections revealed that TMX did not induce collecting vessels leakage. **H**, The deleterious effect of TMX is characterized by a delay in microwave reflection. **I** and **J**, Flow cytometry analysis of the F4/80-positive (**I**) and M1/M2 macrophages (**J**) in E2- or TMX-treated mice with 4-wk lymphedema. **K**, Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) shows that TMX inhibits E2-induced VEGF (vascular endothelial growth factor)-D but not VEGF-C expressions. **L–N**, Quantitative RT-PCR shows that TMX inhibits E2-induced VEGFR-3 (**L**), Lyve-1 (**M**), and HAS (hyaluronan synthase)-1, 2, and 3 (**N**) mRNA expression in skin. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

could abolish the effect of estradiol on lymphedematous skin. Mechanistically, we found that tamoxifen blocked estradiol-induced VEGF-D (Figure 2K), VEGFR-3 (Figure 2L), Lyve-1 (Figure 2M), and HAS (hyaluronan synthases)-1, HAS2,

and HAS3 (Figure 2N) gene expression. Taken together, our results highlight that estrogen plays a protective role on lymphatic endothelium during the pathological condition of lymphedema.

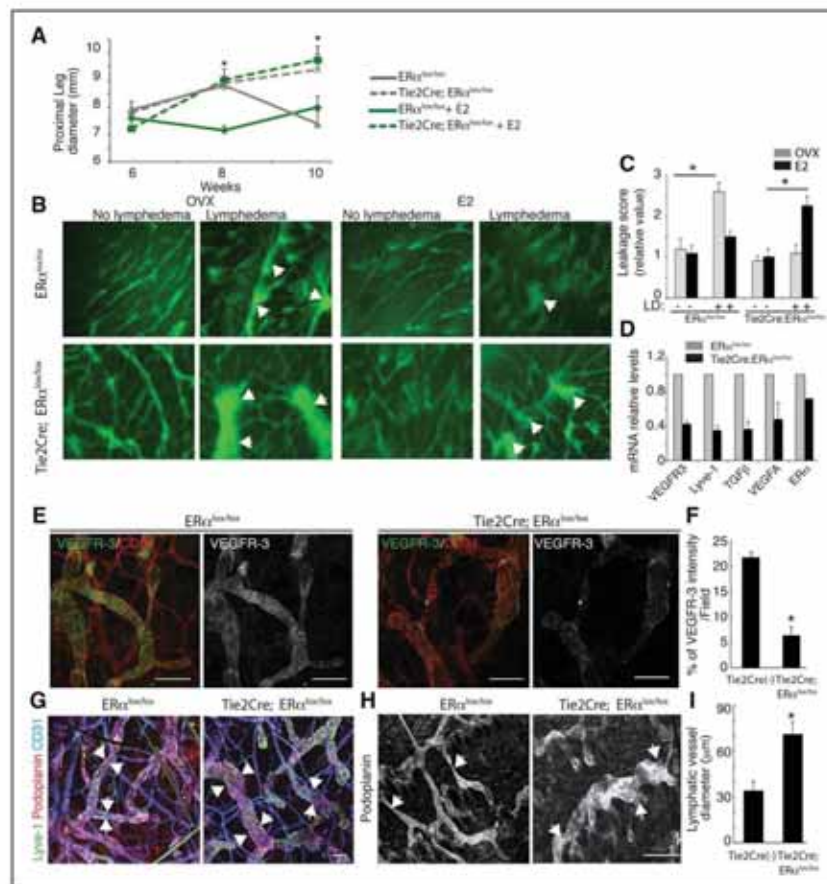


Figure 3. Estrogen-protective effect on lymphatic endothelium is mediated by the estrogen receptor (ER) α . **A**, Leg measurement shows an inhibition of estradiol (E2)-protective effect on lymphedema in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice. **B**, Footpad FITC-dextran injection shows dermal backflow in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice lymphedema treated with E2. **C**, Leakage score quantification Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice. **D**, Quantitative real-time polymerase chain reaction on Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mRNAs from sorted lymphatic endothelial cells (LECs) show an inhibition of VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor)-3, Lyve-1, TGF β , VEGF-A, and ER α expression compared with ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ LECs. **E**, Immunostaining for CD31 and VEGFR-3 shows a decrease of VEGFR-3 expression on lymphatic capillaries in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice (scale bar=200 μ m). **F**, Quantification of VEGFR-3 immunodetection on lymphatic vessels. **G**, Immunostaining for Lyve-1 (green), podoplanin (red), and CD31 (blue) in control skin revealed dilated lymphatic vessels in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice compared with control ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice (scale bar=200 μ m). **H**, Immunostaining for podoplanin in lymphedematous skin shows dilated lymphatic vessels in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice (scale bar=200 μ m). **I**, Quantification of the lymphatic vessel diameter in lymphedematous skin. * $P < 0.01$.

Protective Effect of Estrogens on Lymphatic Endothelium Is Mediated by ER α

To better understand the role of ER α on the lymphatic system, we performed experiments in mice deleted for ER α in the endothelium using the Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice model.^{33,34} The deletion of ER α in the lymphatic endothelium was validated in Tie2-Cre; mTmG mice (Figure IV in the online-only Data Supplement). No significant difference in VE-cadherin button-like junctions was observed in lymphatic capillaries from Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice compared with control ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice (Figure VA in the online-only Data Supplement). In parallel, the KI-67 immunodetection did not reveal major modification in skin vessel proliferation in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice compared with control (Figure

VB in the online-only Data Supplement). In lymphedema model, we observed an inhibition of the protective effect of estradiol in estradiol-treated Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice because the edema is induced 2 weeks after surgery, despite the estrogen treatment (Figure 3A). As observed with tamoxifen, the edema was maintained after 4 weeks, whereas it was resolved in ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ estradiol-treated mice (Figure 3A). The inhibition of the protective effect of estradiol on lymphatic endothelium was confirmed by intralymphatic dye injection showing an important dermal backflow in Tie2-Cre; ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ mice compared with ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$ (Figure 3B and 3C). As we previously showed that estradiol regulates VEGFR-3 and LYVE-1 gene expression in vivo and in vitro (Figure 4), we first analyzed expression of these genes by quantitative real-time

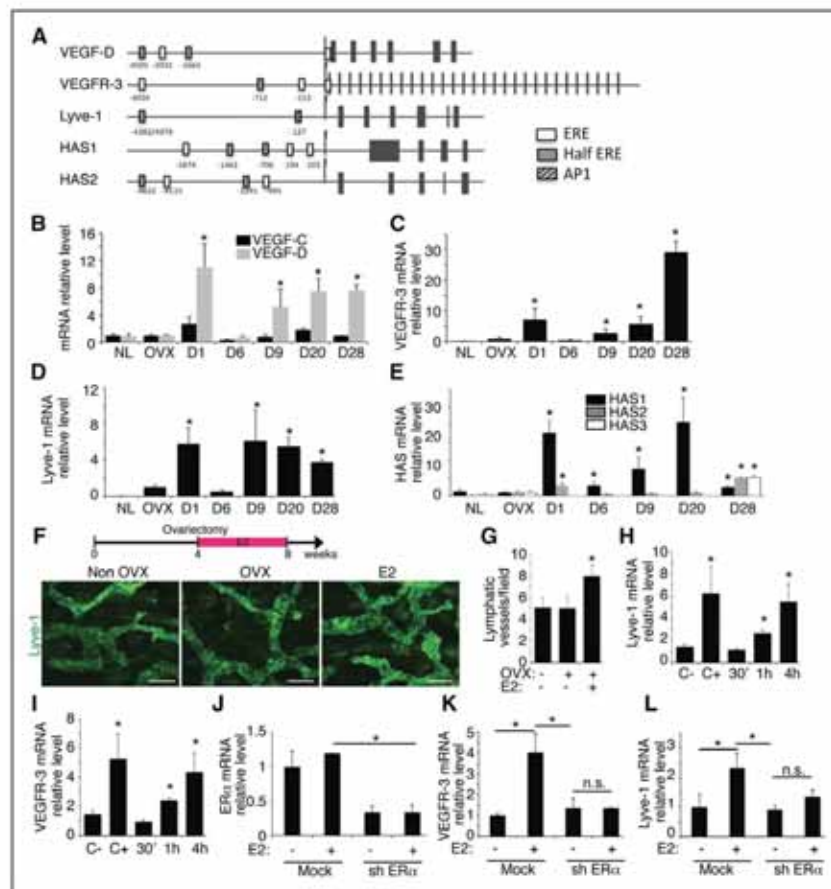


Figure 4. ER (estrogen receptor)- α targets lymphangogenic genes. **A**, Schematic representation of ER-binding sites (estrogen response element [ERE] and AP1) on VEGF (vascular endothelial growth factor)-D, VEGFR-3, Lyve-1, HAS (hyaluronan synthase) 1, and HAS2 on $\sim 5000/+1000$ -bp region surrounding the transcription starting site. **B–E**, Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) of VEGF-C and VEGF-D (**B**), VEGFR-3 (**C**), Lyve-1 (**D**), and HAS1, 2, and 3 (**E**) mRNAs in skin from mice treated with estradiol (E2) during 28 d and compared with control (NL) or OVX (ovariectomized) mice. **F**, Skin immunodetection of the lymphatic vessels in E2-treated mice (4-wk treatment) compared with OVX and non-OVX mice (scale bar=100 mm). **G**, Quantification of lymphatic vessel density in the skin from E2-treated mice compared with OVX and non-OVX. **H** and **I**, Quantitative RT-PCR of Lyve-1 (**H**) and VEGFR-3 (**I**) mRNAs in E2-stimulated human dermal lymphatic endothelial cells (HDLECs) compared with 0.5% SVF (C-) or 5% SVF (C+). **J**, Quantitative RT-PCR of ER α mRNA in HDLEC after ER α shRNA transfection. **K**, Quantitative RT-PCR of VEGFR-3 mRNA in HDLEC after ER α shRNA transfection. **L**, Quantitative RT-PCR of Lyve-1 mRNA in HDLEC after ER α shRNA transfection. * $P<0.01$.

PCR in isolated LECs from *Tie2-Cre; ER $\alpha^{lox/lox}$* mice. LEC sorted from these mice exhibited a decrease in VEGFR-3 and Lyve-1 mRNA, as well as ER-targeted genes, such as TGF β and VEGF-A, and ER α expression (Figure 3D). In addition, decrease of VEGFR-3 expression was confirmed at protein level by whole-mount immunostaining on *Tie2-Cre; ER $\alpha^{lox/lox}$* mice compared with *ER $\alpha^{lox/lox}$* mice (Figure 3E and 3F). Interestingly, the absence of ER α revealed enlarged and dilated vessels suggesting a higher permeability of the lymphatic endothelium (Figure 3G). Consequently, the loss of proper function of the lymphatic vessel observed in *Tie2-Cre; ER $\alpha^{lox/lox}$* mice was aggravated in lymphedematous skin with the presence of enlarged and tortuous lymphatic vessels (Figure 3H and 3I).

Estradiol-Induced LEC Function In Vitro Is Mediated by Erk Pathway

Because dilated and permeable lymphatic vessels observed in the absence of ER α signaling (Figure 3) or on tamoxifen treatment (Figure 2) may relate to an alteration in the junctional organization of lymphatic vessels, we first wondered whether estradiol could modulate LEC cell-cell junctions in vitro (Figure 5A). Intriguingly, estradiol preserves LEC junctions at a comparable level to serum treatment (Ctrl+). In contrast, tamoxifen down-regulates VE-cadherin at membrane level, and this effect correlated with a decrease in cortical actin fibers (Figure 5A). In the context of lymphedema, we previously showed that estrogen signaling is required to repair a functional lymphatic network. Therefore, we next investigated the role of estradiol on LEC

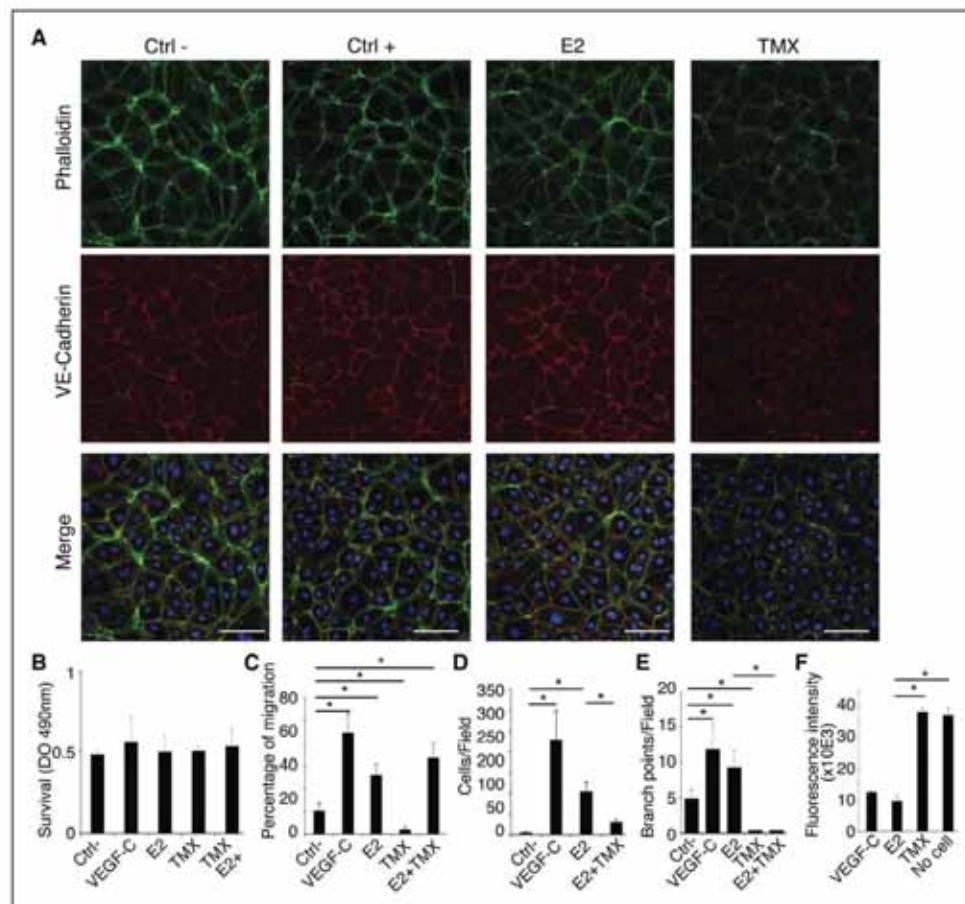


Figure 5. Tamoxifen (TMX) inhibits lymphatic endothelial cell function in vitro. **A**, Phalloidin (green) and VE-cadherin (red) immunostaining on human dermal lymphatic endothelial cell (HDLEC) unstimulated (Ctrl: 0.5% SVF) or stimulated by VEGF (vascular endothelial growth factor)-C (Ctrl+: 30 ng/mL), estradiol (E2; 1 nM), and TMX (1 mmol/L) shows a slight increase of VE-cadherin expression with E2. TMX induces a downregulation of VE-cadherin expression associated to an alteration of cortical actin organization at cellular junctions (scale bar=50 μ m). **B**, E2 and TMX have no effect on HDLEC survival. **C**, Quantification of the percentage of HDLEC migration using scratch wound healing assay shows an inhibition of E2-induced migration by TMX. **D**, Quantification of the percentage of HDLEC migration using Boyden chamber shows an inhibition of E2-induced migration by TMX. **E**, TMX antagonizes E2-induced HDLEC branching in matrigel. **F**, HDLEC monolayer exhibits higher transendothelial permeability in the presence of TMX. * $P < 0.01$.

functions in vitro by performing survival, migration, branching, and permeability assays (Figure 5B through 5F).³⁵ Blocking ER α with tamoxifen did not alter cell survival (Figure 5B). We found that tamoxifen inhibited estradiol-induced LEC migration both in scratch (Figure 5C) and transwell (Figure 5D) migration assays. The role of estradiol on LEC sprouting in matrigel was further evaluated (Figure 5E). Estradiol promoted an induction of LEC branching in vitro that was inhibited by tamoxifen (Figure 5E). In contrast, estradiol did not induce LEC monolayer permeability, whereas tamoxifen strongly promoted the transendothelial diffusion of FITC-Dextran (Figure 5F).

Plasma Membrane ER α

There are 2 subcellular localizations of the ER: a nuclear localization that mediates its transcriptional activity and a

plasma membrane localization that promotes activation of nongenomic signaling pathway (Figure 6A). To identify this nongenomic estradiol-induced signaling in LECs, we studied Akt and Erk phosphorylation in vitro (Figure 6B through 6D). Immunoblot analysis of PS473-Akt and P-Erk on LEC showed a strong and rapid stimulation of the phosphorylation induced by estradiol after 30 minutes (Figure 6B). Surprisingly, tamoxifen did not antagonize estradiol-induced PS473-Akt phosphorylation (Figure 6C). In the opposite, tamoxifen inhibited estradiol-induced Erk phosphorylation, suggesting a pivotal role of Erk pathway in the beneficial effect of estradiol on lymphatic endothelium (Figure 6D). To confirm this hypothesis, LEC migration assays were performed in presence of MEK inhibitor. We observed an inhibition of LEC migration in scratch (Figure 6E) and transwell

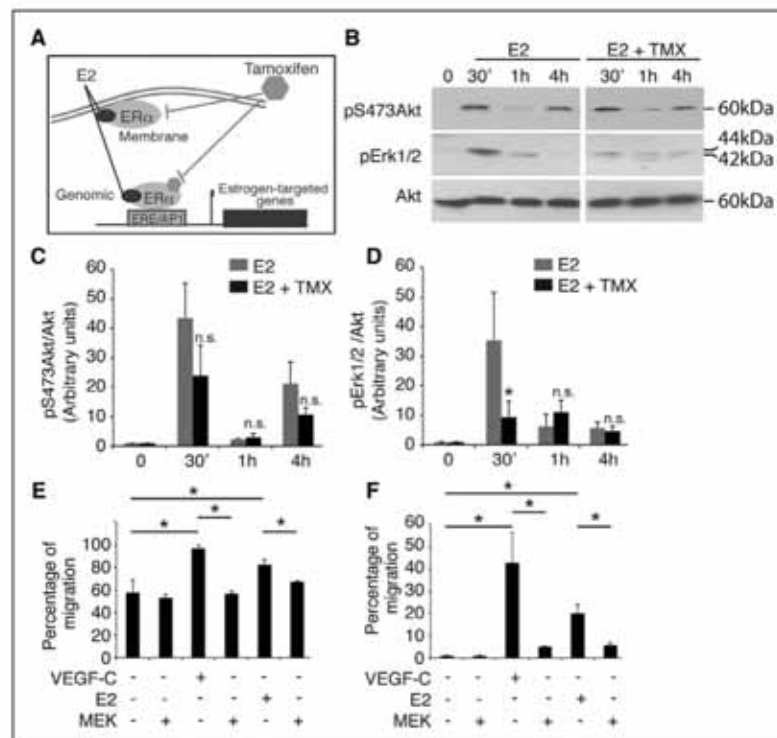


Figure 6. Tamoxifen (TMX) inhibits estradiol (E2)-induced ERK signaling. **A**, Schematic representation of TMX action on nuclear- and membrane-initiated effect of ER (estrogen receptor). **B**, Immunoblot of pS473-Akt, pErk1/2, and Akt in human dermal lymphatic endothelial cells (HDLECs) stimulated by E2 and E2+TMX. **C** and **D**, Relative levels of phosphorylated S473Akt (**C**) and Erk1/2 (**D**) normalized to total Akt. **E**, Quantification of the percentage of E2-induced HDLEC migration using scratch wound healing assay shows an inhibition by MEK inhibitor. **F**, Quantification of the percentage of E2-induced HDLEC migration using Boyden chamber shows an inhibition by MEK inhibitor. * $P < 0.01$.

(Figure 6F) migration assays demonstrating the crucial role of Erk pathway in nongenomic estradiol-induced LEC activation. These data suggested that estrogens mobilize activation of 2 pools of ER α in LEC, both the canonical nuclear transcriptional activity and the plasma membrane-induced signaling cascade (Figure 6).

Discussion

Despite the large body of evidence showing that sex hormones, in particular estrogens, influence lymphatic function, surprisingly little is known about the mechanisms of estrogen regulation on lymphatic endothelium. In this study, we identified a crucial role of estrogens in protecting lymphatic endothelium during secondary lymphedema. Then, we studied the impact of a selective ER modulator, tamoxifen, on lymphedema incidence. Estradiol is ubiquitous hormone generally thought to be a female hormone but is also produced in male and targets the organism in a same extent as estradiol response is observed in postmenopausal women, as well as in transgender men. This response is associated with the expression of the receptor ER α that is similar in male and female. Here, we determined that the expression of ER α in LEC is restricted to the isoform α , which is a major difference with blood EC that

express both ER α and β .³⁶ Using genome analysis, we found that estradiol targets *VEGFR-3*, *VEGF-D*, *Lyve-1*, and *HAS* gene expression. Therefore, we postulated that blocking estrogen function might have a direct impact on lymphatic function and then in lymphedema. Estrogens have been known for decades to have beneficial effects on the skin because they represent critical regulators of dermal hyaluronan.³⁷ Hyaluronan plays a key role in regulating lymphangiogenesis by providing the fundamental matrix for LEC function.³⁸ To better dissect molecular mechanism involved in secondary lymphedema, we developed an original mouse model of unilateral secondary lymphedema. As we postulated that lymphedema is not only a side effect of surgery, we hypothesized that edema will worsen by hormone treatment. We found that estradiol prevents lymphedema development. This effect seems to be restricted to lymphatic capillaries because deeper collecting vessels are not affected by estrogen treatment. These observations are in opposite with the effect on blood microvascular vessels in which estradiol induces a rapid increase of permeability because of the stimulation of *VEGF-A* gene expression.^{39–41} In fact, secondary lymphedema leakage is associated with a blockade of the lymph flow from the tissue to the lymphatic vessels leading to an accumulation of fluids into

tissues. In that context, estrogens ameliorate lymphatic function and significantly reduce the dermal backflow.

Secondary lymphedema mostly occurs after breast cancer. Women with early-stage breast cancer receive ≤ 5 years of adjuvant treatment with tamoxifen—an inhibitor of ER. We found that blocking ER α using tamoxifen is an aggravating factor for lymphedema because swelling is not resolved compared with OVX or estradiol-treated mice. This deleterious effect of blocking ER α was confirmed using *TieCre; ER $\alpha^{lox/lox}$* mice that exhibit long-term swelling. These mice show a strong dermal lymphatic backflow associated with hyperplastic and dilated vessels representative of fluid stasis. Mechanistically, we found that loss of ER α reduces lymphangiogenic gene expression VEGFR-3 and LYVE-1 in vivo and in vitro. Therefore, it will be particularly interesting to further investigate the function of ER α in lymphatic endothelium by generating ER α lymphatic-specific KO mice models to discriminate the lymphatic-specific effect of estradiol and its role on extracellular matrix remodeling. The selective inhibition of ER α in LEC by tamoxifen did not affect survival or proliferation demonstrating a major discordance with mammary epithelial cells in which tamoxifen induces apoptosis.⁴² Traditionally, estrogen signaling is thought to be mediated through genomic pathways. However, estrogen stimulation of cells leads to rapid nongenomic effects, including Akt and Erk phosphorylation. Here, we demonstrated that estradiol-induced Erk, but not Akt phosphorylation, is inhibited by tamoxifen in LECs. One of the main consequences of estrogen inhibition in vitro is to inhibit LEC migration and tube formation.

Altogether, these observations suggest that hormone therapy interferes with lymphatic vasculature stability, more than lymphatic growth. These data are in accordance with human secondary lymphedema that develop months, sometimes years, after surgery demonstrating a preexisting, even dysfunctional, lymphatic system. Hormone therapy could thus increase the lymphatic dysfunction more than lymphatic regeneration immediately after surgery. This deleterious effect is aggravated by a stimulus years after surgery that induces a disruption of this damaged endothelium to induce a massive leakage. Our study establishes the pivotal role of hormones, in particular estrogens, in the healing of the lymphatic endothelium. It will provide significant knowledge to better anticipate and understand the pathology to improve the medical aspects of patient care.

Acknowledgments

We thank Jean-François Arnal for his scientific support, Jean-José Maoret for his technical support, and Y. Barreira from the platform Anexplo Genotoul (Inserm US006, Toulouse, France) for his outstanding technical assistance. We thank the imaging platform of Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases of Toulouse (I2MC) for its scientific and technical support. We thank Dr Masri for providing the ERK inhibitor and Cathrin Briskén for the ER (estrogen receptor)- α shRNA. These studies were conducted using molecular biology-shared resources from the I2MC.

Sources of Funding

This work has been supported by the Ligue Régionale Contre le Cancer (RPT15002BBA), the foundation ARC pour la Recherche sur le Cancer (RAC15003BBA), IDEX Paul Sabatier Federal University

(RGE14001BBA), and the Toulouse Cancer Santé Fondation. We thank Lefoulon Delalande fundation and Region Occitanie.

Disclosures

None.

References

1. Arnal JF, Gourd P, Elhage R, Garmy-Susini B, Delmas E, Brouchet L, Castano C, Barreira Y, Couloumiers JC, Prats H, Prats AC, Bayard F. Estrogens and atherosclerosis. *Eur J Endocrinol*. 2004;150:113–117.
2. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev*. 2002;23:665–686. doi: 10.1210/er.2001-0045.
3. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308:1583–1587. doi: 10.1126/science.1112062.
4. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005;19:1951–1959. doi: 10.1210/me.2004-0390.
5. Thornton JW, Need E, Crews D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science*. 2003;301:1714–1717. doi: 10.1126/science.1086185.
6. Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J*. 1986;5:891–897.
7. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor- α but not estrogen receptor- β . *Circulation*. 2001;103:423–428.
8. Arnal JF, Fontaine C, Abot A, Valera MC, Laurell H, Gourd P, Lenfant F. Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor α in vivo. *Steroids*. 2013;78:576–582. doi: 10.1016/j.steroids.2012.11.011.
9. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2905–2919.
10. Li C, Briggs MR, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J. Requirement of Sp1 and estrogen receptor α interaction in 17 β -estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology*. 2001;142:1546–1553. doi: 10.1210/endo.142.4.8096.
11. Stossi F, Likhite VS, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J Biol Chem*. 2006;281:16272–16278. doi: 10.1074/jbc.M513405200.
12. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem*. 2003;278:2701–2712. doi: 10.1074/jbc.M205692200.
13. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*. 2002;67:471–475.
14. Shu YY, Maibach HI. Estrogen and skin: therapeutic options. *Am J Clin Dermatol*. 2011;12:297–311. doi: 10.2165/11589180-000000000-00000.
15. Jackson DG. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol Rev*. 2009;230:216–231. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00803.x.
16. Schrott HG, Bittner V, Vittinghoff E, Herrington DM, Hulley S. Adherence to National Cholesterol Education Program Treatment goals in postmenopausal women with heart disease. The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). The HERS Research Group. *JAMA*. 1997;277:1281–1286.
17. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438:946–953. doi: 10.1038/nature04480.
18. Greene R, Fowler R. Physical therapy management of primary lymphedema in the lower extremities: a case report. *Physiother Theory Pract*. 2010;26:62–68. doi: 10.3109/09593980802667854.
19. Smeltzer DM, Stickler GB, Schirger A. Primary lymphedema in children and adolescents: a follow-up study and review. *Pediatrics*. 1985;76:206–218.
20. Sener SF, Winchester DJ, Martz CH, Feldman JL, Cavanaugh JA, Winchester DP, Weigel B, Bonnefoi K, Kirby K, Morehead C. Lymphedema after sentinel lymphadenectomy for breast carcinoma. *Cancer*. 2001;92:748–752.
21. Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaszki D, Mortimer P, Ylä-Herttuala S, Miura N, Alitalo K. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*. 2004;10:974–981. doi: 10.1038/nm1094.

22. Slavin SA, Van den Abbeele AD, Losken A, Swartz MA, Jain RK. Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. *Ann Surg.* 1999;229:421–427.
23. Specht MC, Miller CL, Skolny MN, Jammallo LS, O'Toole J, Horick N, Isakoff SJ, Smith BL, Taghian AG. Residual lymph node disease after neoadjuvant chemotherapy predicts an increased risk of lymphedema in node-positive breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:2835–2841. doi: 10.1245/s10434-012-2828-y.
24. Swaroop MN, Ferguson CM, Horick NK, Skolny MN, Miller CL, Jammallo LS, Brunelle CL, O'Toole JA, Isakoff SJ, Specht MC, Taghian AG. Impact of adjuvant taxane-based chemotherapy on development of breast cancer-related lymphedema: results from a large prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151:393–403. doi: 10.1007/s10549-015-3408-1.
25. Warren LE, Miller CL, Horick N, Skolny MN, Jammallo LS, Sadek BT, Shenouda MN, O'Toole JA, MacDonald SM, Specht MC, Taghian AG. The impact of radiation therapy on the risk of lymphedema after treatment for breast cancer: a prospective cohort study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88:565–571. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.11.232.
26. Rutkowski JM, Moya M, Johannes J, Goldman J, Swartz MA. Secondary lymphedema in the mouse tail: lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. *Micronvasc Res.* 2006;72:161–171. doi: 10.1016/j.mvr.2006.05.009.
27. Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Yla-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:12677–12682.
28. Daily K, Patel VR, Rigor P, Xie X, Baldi P. MotifMap: integrative genome-wide maps of regulatory motif sites for model species. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:495. doi: 10.1186/1471-2105-12-495.
29. Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D670–D681. doi: 10.1093/nar/gku1177.
30. Prats AC, Van den Bergh L, Rayssac A, Ainaoui N, Morfoisse F, Pujol F, Legomides S, Bikfalvi A, Prats H, Pyronnet S, Garmy-Susini B. CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Micronvasc Res.* 2013;89:25–33. doi: 10.1016/j.mvr.2013.05.005.
31. Campbell L, Emmerson E, Williams H, Saville CR, Krust A, Chambon P, Mace KA, Hardman MJ. Estrogen receptor- α promotes alternative macrophage activation during cutaneous repair. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2447–2457. doi: 10.1038/jid.2014.175.
32. Ghanta S, Cuzzone DA, Torrisi JS, Albano NJ, Joseph WJ, Savetsky IL, Gardenier JC, Chang D, Zampell JC, Mehrara BJ. Regulation of inflammation and fibrosis by macrophages in lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308:H1065–H1077.
33. Billon-Gales A, Fontaine C, Douin-Echinard V, Delpy L, Berges H, Calippe B, Lenfant F, Laurell H, Guery JC, Gourdy P, Arnal JF. Endothelial estrogen receptor- α plays a crucial role in the atheroprotective action of 17 β -estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2009;120:2567–2576.
34. Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellis LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresi D, Ginsberg M, Varner JA. Integrin α 5 β 1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Res.* 2010;70:3042–3051. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3761.
35. Zheng W, Aspelund A, Alitalo K. Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest.* 2014;124:878–887. doi: 10.1172/JCI71603.
36. Evans MJ, Harris HA, Miller CP, Karathanasis SK, Adelman SJ. Estrogen receptors α and β have similar activities in multiple endothelial cell pathways. *Endocrinology.* 2002;143:3785–3795. doi: 10.1210/en.2002-220356.
37. Röck K, Meusch M, Fuchs N, Tigges J, Zipper P, Fritsche E, Krutmann J, Homey B, Reifemberger J, Fischer JW. Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of epidermal growth factor from keratinocytes. *J Biol Chem.* 2012;287:20056–20069. doi: 10.1074/jbc.M112.353151.
38. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol.* 2006;4:83–100. doi: 10.1089/lrb.2006.4.83.
39. Hervé MA, Meduri G, Petit FG, Donnet TS, Lazennec G, Mourah S, Perrot-Appianat M. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J Endocrinol.* 2006;188:91–99. doi: 10.1677/joe.1.06184.
40. Garmy-Susini B, Delmas E, Gourdly P, Zhou M, Bossard C, Bugler B, Bayard F, Krust A, Prats AC, Doetschman T, Prats H, Arnal JF. Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation. *Circ Res.* 2004;94:1301–1309. doi: 10.1161/01.RES.0000127719.13255.81.
41. Arnal JF, Gourdly P, Garmy-Susini B, Delmas E, Bayard F. [Usefulness of experimental models to understand the vascular effects of estrogens]. *Med Sci (Paris).* 2003;19:1226–1232. doi: 10.1051/medsci/200319121226.
42. Dietze EC, Troch MM, Bean GR, Heffner JB, Bowie ML, Rosenberg P, Ratliff B, Seewaldt VL. Tamoxifen and tamoxifen ethyl bromide induce apoptosis in acutely damaged mammary epithelial cells through modulation of AKT activity. *Oncogene.* 2004;23:3851–3862. doi: 10.1038/sj.onc.1207480.

Highlights

- Estrogens play a crucial role in lymphatic vessel function.
- Estrogens protect from lymphedema through its receptor ER (estrogen receptor)- α .
- Chronic long-term delivery of tamoxifen has a deleterious impact on lymphatic vessels.
- Tamoxifen affects both lymphatic endothelial cell gene expression and microenvironment.

Mise au point d'une méthode de vérification de l'intégrité du rapporteur bicistronique

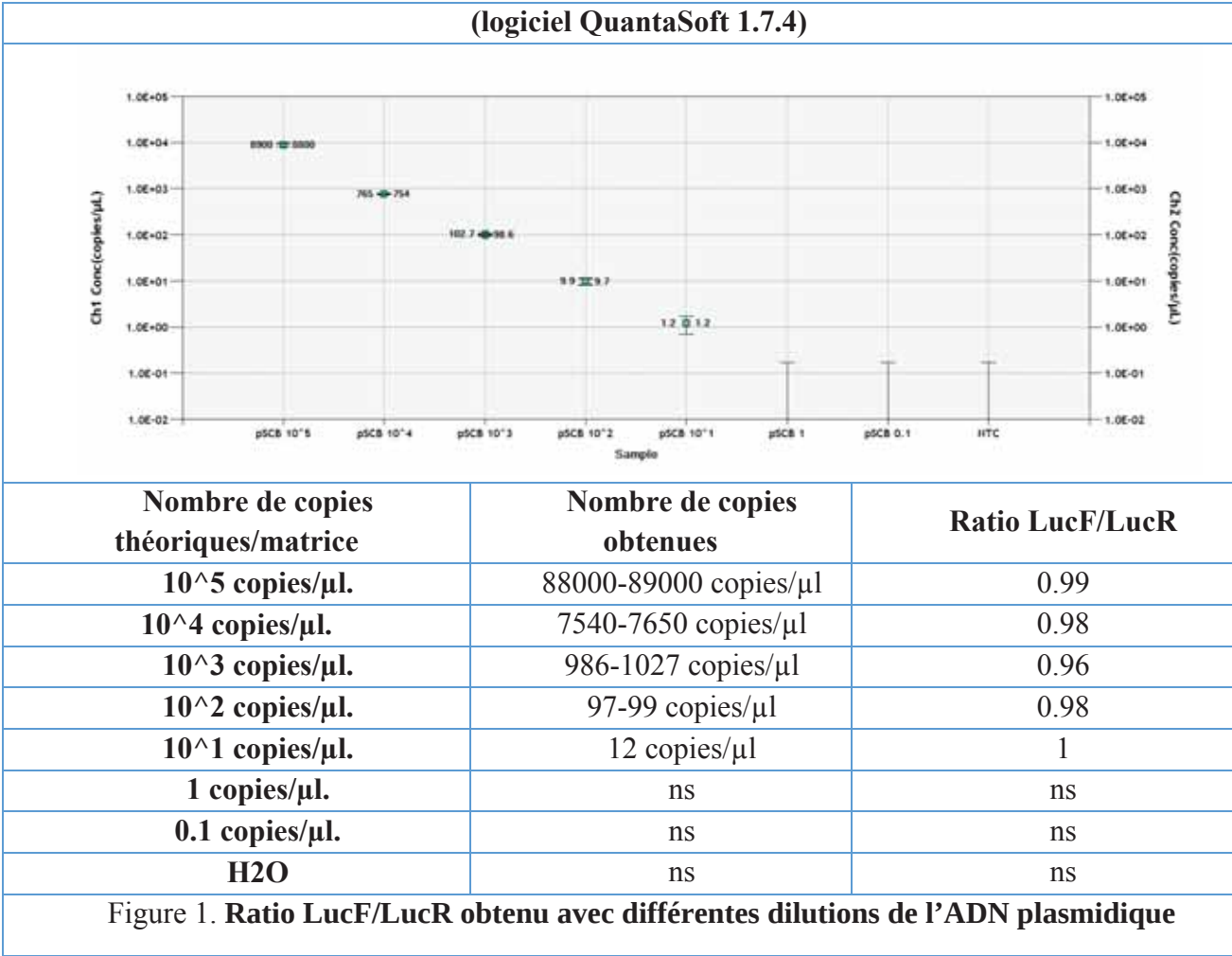
Objectif : Une des méthodes utilisées pour vérifier l'absence de promoteur cryptique ou de site d'épissage dans une construction bicistronique est de réaliser une RT-qPCR sur chacun des cistrons (LucF et LucR dans notre cas) par comparaison avec un bicistronique comportant un IRES "contrôle" (EMCV est souvent utilisé car son intégrité a déjà été vérifiée), et de faire un ratio. Celui-ci doit être proche de 1 pour prouver l'intégrité du transcrit. Cependant, cette méthode est limitée par l'efficacité des sondes et le manque de précision de la qPCR qui ne permet pas une quantification absolue. Enfin, le dosage est effectué dans des puits séparés la plupart du temps (EvaGreen). Nous cherchons donc à utiliser la ddPCR (droplet digital PCR) permettant de doser de transcrits rares en isolant les molécules dans des milliers de gouttelettes dans lesquelles ont lieu les réactions de PCR. La loi de Poisson permet de prédire le nombre de copie absolue par échantillon à partir de la fréquence de distribution observée.

Méthode : tester le duplexage FAM/HEX ciblant LucR (FAM) et Luc+ (HEX) sur le plasmide d'origine, puis sur des ADNc issus de l'ARN transcrit in vitro, enfin sur des ADNc d'un échantillon de cellules exprimant le rapporteur bicistronique.

Nb : si pas spécifié, l'IRES étudié est le FGF1.

Mise au point du duplexage en ddPCR sur plasmide de la séquence bicistronique

- L'expérience de ddPCR a été effectuée sur le plasmide pSCB-CRF1AL+ portant une cassette bicistronique LuR-i-LucF (LucF est en fait Luc+), l'IRES étant celui du FGF1.
- Dilution du plasmide avec calcul du nombre de copies théoriques attendues en fonction de sa taille, de 10^5 copies à 0,1 copie/ μ L pour déterminer la sensibilité de la technique et pour voir la linéarité (Fig. 1).
- Les primers Luc+_1_F et Luc+_1_R à 100 μ M sont dilués à 9 μ M. La sonde Luc+_1_probe HEX à 100 μ M est diluée à 2,5 μ M. Les primers LucR_0_F et LucR_0_R à 100 μ M sont dilués à 9 μ M. La sonde LucR_probe FAM à 100 μ M est diluée à 2.5 μ M.



On observe un ratio LucF/LucR égal à 1 quelle que soit la dilution de l'échantillon, ce qui valide la ddPCR en terme de dosage précis de deux gènes différents

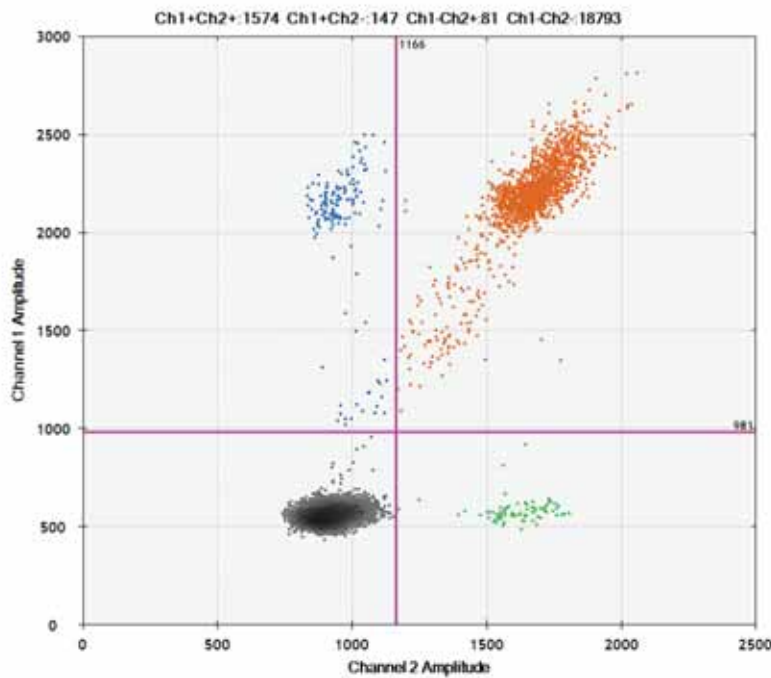


Figure 2. Nuage des gouttelettes positives ou négatives en fonction des canaux FAM/HEX (channel 1: LucR, channel 2 : Luc+)

La répartition des gouttelettes dans les puits a été analysée pour chaque fluorochrome. On devrait avoir théoriquement 100% des gouttelettes doublement fluorescentes car la matrice est un plasmide bicistronique. Cependant sur 1721 gouttelettes positives 228 (147+81) ont une seule fluo (soit 13%), (10^3 copies), et sur 172 gouttelettes positives 35 (19+15) ont une seule fluo (soit 20%) (10^2 copies). Cela indique que même avec un ADN 100% bicistronique la PCR ne fonctionne pas avec une efficacité de 100% dans tous les puits. Il semblerait qu'une partie des molécules présentes dans les puits n'aient pas été détectées par les deux couples. Cela pourrait être dû à une compétition entre les couples d'amorce. Le ratio égal à 1 indique cependant une efficacité similaire des couples d'amorces.

Mise au point du duplexage en ddPCR sur les ADNc issu de transcription in vitro du plasmide bicistronique

- Nous avons effectué une transcription in vitro de LucR-i-LucF et du monocistronique LucF, puis digéré la matrice ADN, purifié et rétro-transcrit ces ARN en ADNc (kit High capacity cDNA RT de Applied biosystems). L'efficacité de la RT est calculée par rapport au nombre de copies théoriquement obtenues.
- LucF (Luc+) : 1750 pb, 726 ng d'ARN dans 20 μ l de RT Soit 36,3 ng/ μ l de cDNAs dans 18 μ L, soit $2,03 \times 10^{10}$ copies/ μ l.
- Bicistronique LucR-i-LucF (RF1AL+) : 3550 pb, 691,2 ng d'ARN dans 20 μ l de RT soit 34,56 ng/ μ l de cDNAs dans 18 μ L, soit $9,52 \times 10^9$ copies/ μ l.

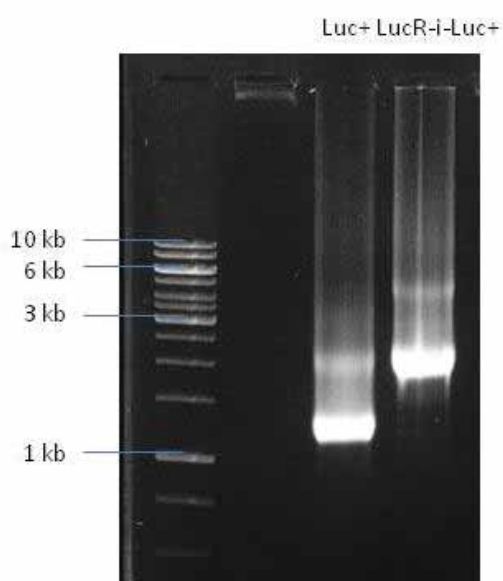


Figure 3. Analyse des ARN obtenus après transcription in vitro de la matrice pSCB-LucF et pSCB-LucR-i-LucF.

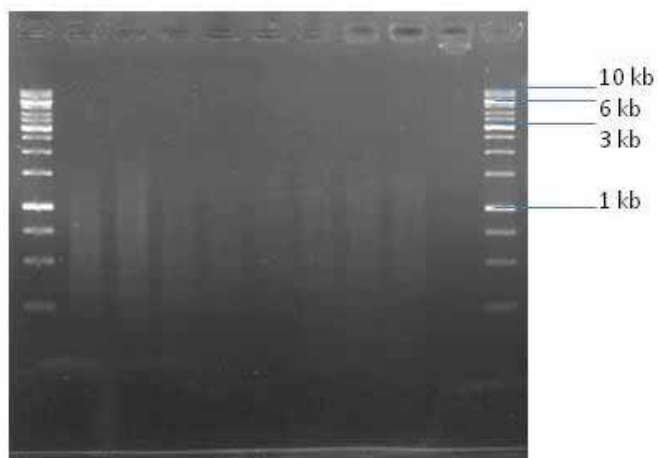


Figure 4. Gel des ADNc obtenus après rétrotranscription des ARN transcrits in vitro. On obtient un smear aux alentours de 1000 pb.

Nombre de Copies théoriques/matrice	Nombre de Copies obtenues LucR	Nombre de Copies obtenues LucF	Ratio ou efficacité RT
LucF 10 ⁴ copies/μl	0,2 copie/μl	2070 copies/μl	20,7%
LucR-i-LucF 5x10 ³ copies/μl	6440 copies/μl	4050 copies/μl	128,8% (LucR) 81% (LucF) Ratio LucF/LucR : 0,63
Figure 5. Ratio LucF/LucR et efficacité de RT mesurée avec de l'ARN mono et bicistronique			

Les ARNs mono- et bicistroniques ont bien la taille attendues (la bande supérieure de chaque piste correspondant à une dimérisation). En dépit du fait qu'il y a un seul ARN qui est rétrotranscrit dans chaque condition, les ADNc apparaissent comme un « smear », les tailles les plus abondantes se situant aux alentours de 1000 nt.

Le nombre de copies théorique a été calculé à partir de la quantité d'ARN transcrit *in vitro*. La ddPCR réalisée pour quantifier ces ADNc a donné, curieusement, une efficacité différente pour chaque gène. La LucF dans le monocistronique n'a donné que 20,7% du nombre de copies prédit, alors que le pourcentage est plus proche de 100% pour le bicistronique, mais avec une différence entre le gène LucF et LucR. Seulement 63% de copies LucF ont été détectée comparé à LucR.

La RT- nous donne des concentrations entre 0-0,45 copies/μl, il n'y a donc pas de contamination par de l'ADN plasmidique en l'occurrence, qui a bien été digéré après transcription *in vitro*.

- La RT étant peu efficace pour le monocistronique LucF (20%), nous décidons de tester différentes conditions de rétrotranscription :
 - RT à différentes concentrations d'ARN (400 ng, 200 ng, 100 ng ou RT400/RT200/RT100) pour vérifier la capacité de la reverse transcriptase.
 - RT avec des amorces spécifiques (LucR_0_rev ou Luc+_1_Rev) pour comparer avec les amorces random hexamer et voir si on améliore l'efficacité de RT.

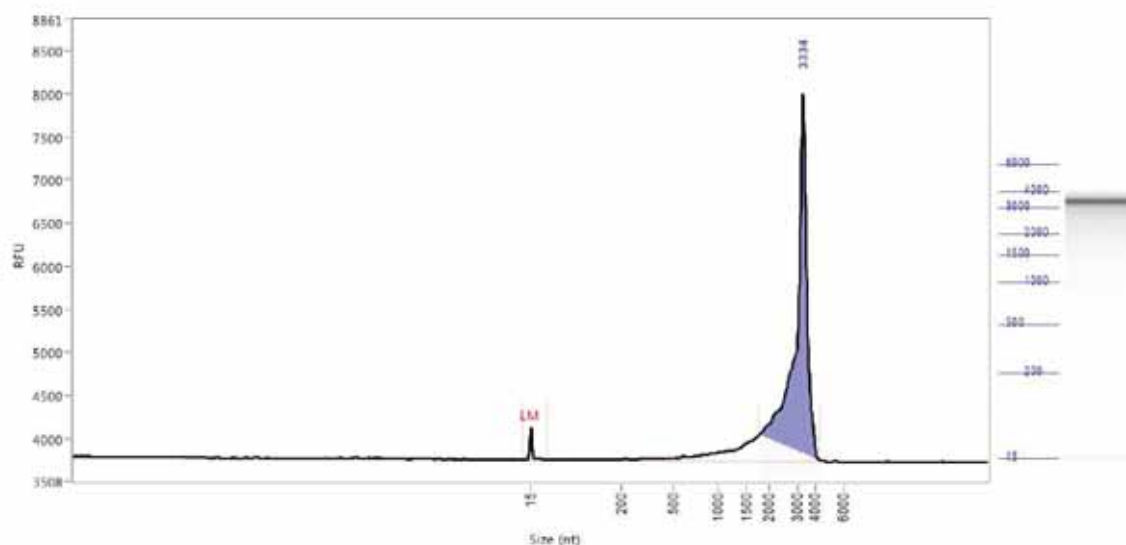
Nombre de copies théoriques/matrice	Nombre de copies obtenues LucR	Nombre de copies obtenues LucF	Ratio ou efficacité RT
LucF 10⁴ copies/μl	0 copie/μl	1760 copies/μl	18%
LucR-i-LucF 10⁴ copies/μl	11085	7080 copies/μl	0,64 /100%
LucF 10⁴ copies/μl RT400	0,2 copie/μl	1915 copies/μl	19%
LucF 10⁴ copies/μl RT200	0 copie/μl	2155 copies/μl	19%
LucF 10⁴ copies/μl RT100	0 copie/μl	1860 copies/μl	19%
LucR-i-LucF 10⁴ copies/μl Luc+_1_Rev	52 copies/μl	461 copies/μl	5%
LucR-i-LucF 10⁴ copies/μl LucR_0_Rev	1715 copies/μl	163,5 copies/μl	20%
LucR-i-LucF 10⁴ copies/μl Luc+_1_Rev et LucR_0_Rev	1795 copies/μl	419,5 copies/μl	20%
Figure 6. Ratio LucF/LucR et efficacité de RT mesurée avec de l'ARN mono et bicistronique et différents types d'amorces de rétrotranscription			

- Confirmation de l'efficacité pour LucF = 20% quelque soit la quantité d'ARN (100 à 750ng) et LucR-i-LucF autour de 100%, alors que l'efficacité de rétrotranscription de LucF dans le bicistronique n'est que de 64%.
- RT primers spécifiques 5 fois moins efficaces qu'avec les randoms hexamères :
Dans le cas LucR-i-LucF LucR_0_Rev (amorce spécifique LucR), l'efficacité de la RT est de 20%.
On ne devrait pas avoir de signal pour LucF ! Appariement de l'amorce de façon aspécifique dû à la T°C de RT à 37°C ?

La vérification de l'intégrité des ARN transcrits in vitro a été réalisée avec l'analyseur de fragments : Fig 7.

- LucF : 264 ng/μl, 1785 bases (1781 bases théorique, différence 4 bases, 0,2 % de différence seulement) : L'amorce antisens est à 10 bases du 3' seulement d'où le manque d'efficacité observé !
- LucR-i-LucF : 283ng/μl, 3334 bases (3534 bases théorique, différence 200 bases, 5,6 %)

Sample: ARN bicistronique av denat 70
Well Location: E1
Created: Monday, March 12, 2018 11:56:51 AM



Sample: ARN LucF av denat 70
Well Location: E2
Created: Monday, March 12, 2018 11:56:51 AM

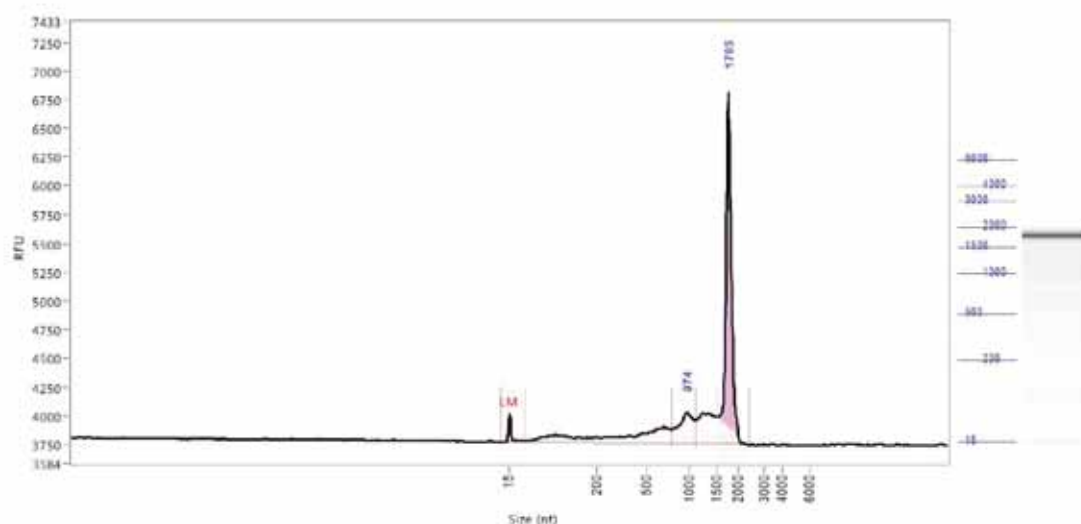


Figure 7. Vérification de l'intégrité des ARN in vitro au fragment analyzer
(haut bicistronique, bas Luc+)

- Le T_m (temperature of melting, indiquant la stabilité du duplex ADN-primers) des sondes a également été testée: Programme « Probe » FAM/HEX, T_m = gradient 55-65°C, 2h40 sur T100 (Fig 8).

A : 65°C, B : 64.3°C, C : 63°C, D : 61.1°C, E : 58.8°C, F : 56.9°C, G : 55.7°C, H : 55°C

- Cela fonctionne de 55 à 65°C. Pour les T°C hautes (65°C) les nuages sont plus proches mais c'est plus "propre" entre les 4 nuages. Cela signifie que l'amplitude entre gouttelettes positives et négatives est plus petites. Pour les T°C basses (55°C) les nuages sont mieux séparés mais il y a plus de gouttelettes entre les 4 nuages.

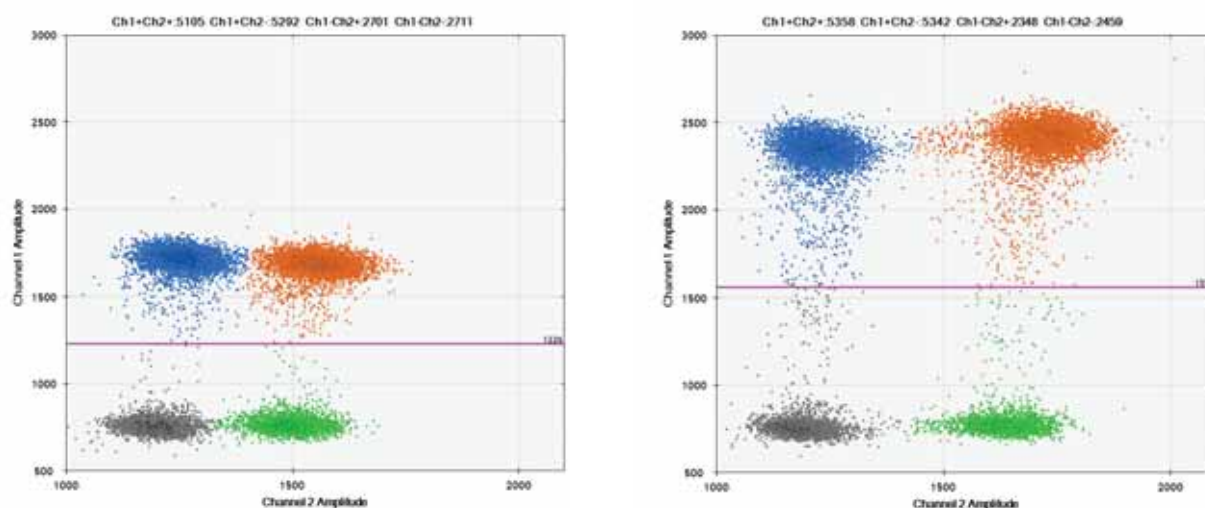


Figure 8. Test de le Tm des sondes par gradient de PCR, à gauche 65°C et à droite 55°C

- Le Tm utilisée pour les sondes est optimal, donc pour la suite de l'expérience on reste à 60°C.

Mise au point du choix du kit de transcription inverse des ADNc

- Trois kits de RT ont été testés : 2 kits High capacity cDNA RT (HC) et Superscript VILO, ainsi que One-step (OS) RT (RT et PCR en suivant avec le même kit).
- La rétrotranscription a été réalisée avec 750 ng de chaque ARN avec (av denat) et sans dénaturation (70°C, 2 min) (Fig 9).

Nombre de copies théoriques/matrice	Kit utilisé	Dénaturation ?	Nombre de copies obtenues LucR	Nombre de copies obtenues LucF	Ratio ou efficacité RT
LucF 10 ⁴ copies/μl	HC	non	0 copie/μl	1965 copies/μl	19%
LucR-i-LucF 10 ⁴ copies/μl	HC	non	11915	7775 copies/μl	0,65
LucF 10 ⁴ copies/μl	HC	oui	0 copie/μl	1680 copies/μl	17%
LucR-i-LucF 10 ⁴ copies/μl	HC	oui	11410 copie/μl	7110 copies/μl	0,63
LucF 10 ⁴ copies/μl	VILO	non	0 copie/μl	1205 copies/μl	12%
LucR-i-LucF 10 ⁴ copies/μl	VILO	non	8505 copie/μl	4350 copies/μl	0,51

LucF 10⁴ copies/μl	OS	non	0 copie/μl	0 copies/μl	ns
LucF 10³ copies/μl	OS	non	0 copie/μl	0 copies/μl	ns
LucR-i-LucF 10⁴ copies/μl	OS	non	6630 copies/μl	0 copies/μl	ns
LucR-i-LucF 10⁴ copies/μl	OS	non	580 copies/μl	0 copies/μl	ns
Figure 10. Ratio LucF/LucR et efficacité de RT mesurée avec de l'ARN mono et bicistronique et différents types de kit de RT					

- La dénaturation de l'ARN 2 min à 70°C n'a rien changé, il ne s'agit donc pas d'un problème de structure.
- La LucF provenant du monocistronique est rétrotranscrite moins efficacement avec le kit VILO (12%) qu'avec le kit HC (17-19%), et pas du tout avec le kit ONE STEP (OS).
- La LucR est rétrotranscrite à 85% avec le kit VILO, et à 66% ou moins avec le kit OS.
- Le ratio LucF/LucR reste aux alentours de 0.63-0.65. avec les deux kits de RT classiques. Le kit OneStep est totalement inefficace pour LucF !

Clairement, l'efficacité est toujours inférieure pour LucF que pour LucR alors qu'on attendait un rapport de 1. Comme le rapport était égal à 1 avec l'ADN plasmidique, on peut conclure que la différence d'efficacité est due à la reverse transcriptase et pas à l'efficacité des amorces PCR. Le rapport d'efficacité étant toujours le même, on devrait pouvoir s'en servir comme facteur de correction pour mesurer le ratio LucF/LucR des ARN bicistroniques dans les cellules.

Mise au point du duplexage en ddPCR sur les ADNc issu d'un échantillon d'ARN de cellules exprimant le rapporteur bicistronique

- Les ARN bicistroniques ont été quantifiés à partir de cellules transduites par deux constructions :
 - LucR-i-LucF : bicistronique portant l'IRES FGF1, d'une taille de 3770 nt
 - LucR-hp-LucF : bicistronique portant une hairpin, d'une taille de 3415nts
- Les ARN totaux purifiés ont été dosés :
 - 381,9 ng/μL pour le bicistronique LucR-i-LucF
 - 415,9 ng/μL pour le bicistronique LucR-hp-LucF.
- L'intégrité des ARN a été vérifiée par l'analyseur de fragments : ils sont d'excellente qualité (Fig 11).

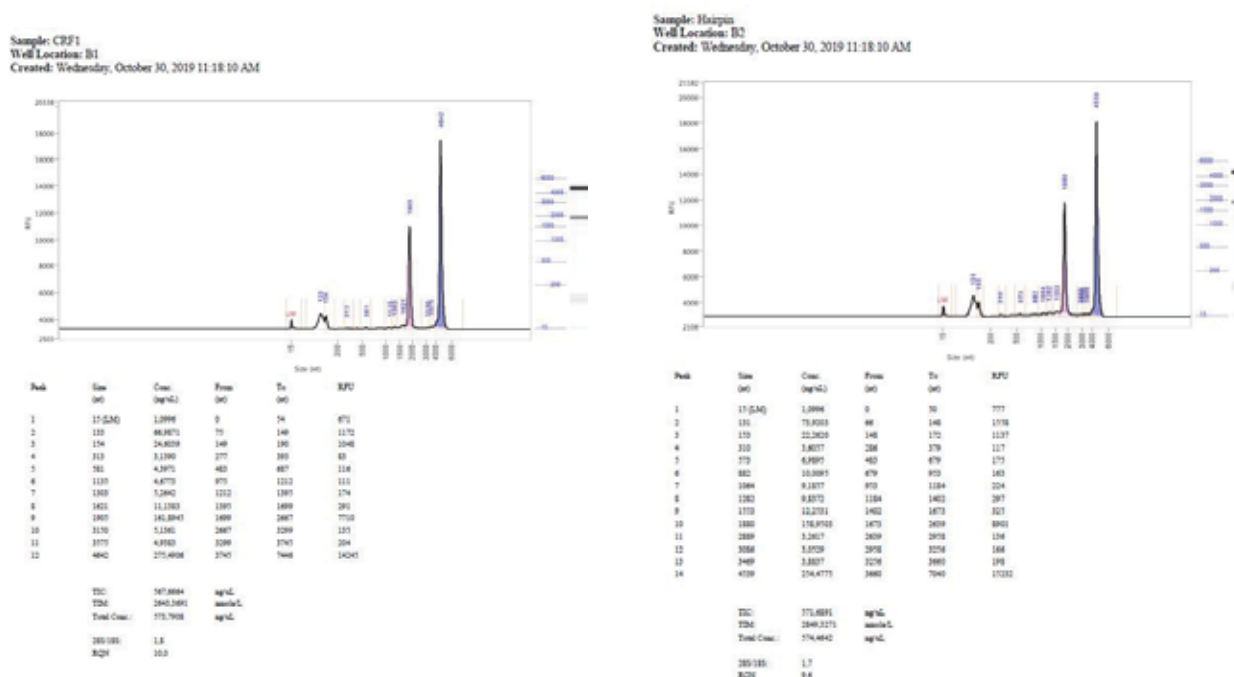


Figure 11. Vérification de l'intégrité et de la qualité des ARN au Fragment Analyzer (à gauche, bicistronique avec LucR-i-LucF, à droite, LucR-hp-LucF)

Nombre de copies théoriques/matrice	Quantité d'ADNc	Nombre de copies LucR obtenues	Nombre de copies LucF obtenues	Ratio ou efficacité RT
LucR-i-LucF	2,2µl	28,7 copies/µl	22,4 copies/µl	0,78
LucR-hp-LucF	4,4µl	53,4 copies/µl	42,6 copies/µl	0,8
merged	0,79 +/- 0,12 copies/µl			
LucR-hp-LucF	2,2µl	46,2 copies/µl	34,4 copies/µl	0.75
LucR-hairpin-LucF	4,4µl	87 copies/µl	66 copies/µl	0.75
merged	0,75 +/- 0,09 copies/µl			

Figure 12. Ratio LucF/LucR et efficacité de RT mesurée à partir d'ADNc d'échantillons issus de cellules

Deux réplicats de mesure ont été réalisés. Le ratio LucF/LucR se situe entre 0,75 et 0,8. On note qu'il est supérieur au ratio de 0,65 obtenu avec l'ARN transcrit *in vitro*. Cependant le rapport est identique pour les deux constructions. Sachant qu'il n'y a pas de promoteur ni de site d'épissage dans l'hairpin, cela suggère que l'ARN est effectivement bicistronique. La différence par rapport à l'ARN transcrit *in vitro* pourrait provenir de la présence des autres ARN cellulaires qui sont également rétrotranscrit et pourraient engendrer une diminution d'efficacité de rétrotranscription de LucR.

En conclusion, il n'est donc pas si simple de démontrer que l'ARN est bicistronique avec la ddPCR, pour deux raisons :

1) la ddPCR avec deux couples d'amorce ne permet pas d'identifier les deux cistrons LucR et LucF dans chaque gouttelette même si le rapport global LucF/LucR est égal à 1 quand on utilise l'ADN bicistronique comme matrice,

2) La reverse transcriptase présente des différences d'efficacité selon les deux cistrons.

La technique ne pourra donc être utilisée que par comparaison avec un ARN bicistronique contrôle (LucR-hp-LucF par exemple), comme c'était déjà le cas pour la RT qPCR. L'avantage reste cependant que la ddPCR est beaucoup plus précise et reproductible pour un ARN donné.

Bibliographie

1. Mathis, D. J. & Chambon, P. The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription. *Nature* **290**, 310–315 (1981).
2. Serizawa, H., Conaway, R. C. & Conaway, J. W. Multifunctional RNA polymerase II initiation factor delta from rat liver. Relationship between carboxyl-terminal domain kinase, ATPase, and DNA helicase activities. *J. Biol. Chem.* **268**, 17300–17308 (1993).
3. Serizawa, H., Conaway, J. W. & Conaway, R. C. Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* **363**, 371–374 (1993).
4. Gustafsson, M. K. *et al.* Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev.* **16**, 114–126 (2002).
5. Kelleher, R. J., Flanagan, P. M. & Kornberg, R. D. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* **61**, 1209–1215 (1990).
6. Maston, G. A., Evans, S. K. & Green, M. R. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* **7**, 29–59 (2006).
7. Vaissière, T., Sawan, C. & Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.* **659**, 40–48 (2008).
8. IzbanS, M. & LuseO, D. Factor-stimulated RNA Polymerase II Transcribes at Physiological Elongation Rates on Naked DNA but Very Poorly on Chromatin Templates*.
9. McNamara, R. P., Bacon, C. W. & D’Orso, I. Transcription elongation control by the 7SK snRNP complex: Releasing the pause. *Cell Cycle* **15**, 2115–2123 (2016).
10. Michels, A. A. & Bensaude, O. Hexim1, an RNA-controlled protein hub. *Transcription* **9**, 262–271 (2018).
11. Egloff, S., Studniarek, C. & Kiss, T. 7SK small nuclear RNA, a multifunctional transcriptional regulatory RNA with gene-specific features. *Transcription* **9**, 95–101 (2018).
12. Sydow, J. F. & Cramer, P. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 732–739 (2009).
13. Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J. E. & Shenk, T. A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8306–8310 (1987).
14. Buratowski, S. Connections between mRNA 3’ end processing and transcription termination. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 257–261 (2005).
15. Bentley, D. L. Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 251–256 (2005).

16. Wilusz, J. E. *et al.* A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev.* **26**, 2392–2407 (2012).
17. Wintjens, R. & Rooman, M. Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J. Mol. Biol.* **262**, 294–313 (1996).
18. Massari, M. E. & Murre, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429–440 (2000).
19. Vinson, C. *et al.* Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6321–6335 (2002).
20. Nakayama, K. & Kataoka, N. Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
21. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. & Poellinger, L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* **19**, 4298–4309 (2000).
22. Ohh, M. *et al.* Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* **2**, 423–427 (2000).
23. Kamura, T. *et al.* Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10430–10435 (2000).
24. Ivan, M. *et al.* HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464–468 (2001).
25. Lando, D. *et al.* FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**, 1466–1471 (2002).
26. Wenger, R. H. & Gassmann, M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* **378**, 609–616 (1997).
27. Pescador, N. *et al.* Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem. J.* **390**, 189–197 (2005).
28. Dengler, V. L., Galbraith, M. D. & Espinosa, J. M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 1–15 (2014).
29. Befani, C. & Liakos, P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *J. Cell Physiol.* **233**, 9087–9098 (2018).
30. Takeda, N. *et al.* Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ. Res.* **95**, 146–153 (2004).

31. Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B. & Simon, M. C. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9361–9374 (2003).
32. Koh, M. Y., Lemos, R., Liu, X. & Powis, G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* **71**, 4015–4027 (2011).
33. Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
34. Banerjee, A. K. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* **44**, 175–205 (1980).
35. Cowling, V. H. Enhanced mRNA cap methylation increases cyclin D1 expression and promotes cell transformation. *Oncogene* **29**, 930–936 (2010).
36. Lombardi, O., Varshney, D., Phillips, N. M. & Cowling, V. H. c-Myc deregulation induces mRNA capping enzyme dependency. *Oncotarget* **7**, 82273–82288 (2016).
37. Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 291–336 (2003).
38. Wang, Y. *et al.* Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed. Rep.* **3**, 152–158 (2015).
39. Carew, N. T., Nelson, A. M., Liang, Z., Smith, S. M. & Milcarek, C. Linking endoplasmic reticular stress and alternative splicing. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
40. Nelson, A. M., Carew, N. T., Smith, S. M. & Milcarek, C. RNA Splicing in the Transition from B Cells to Antibody-Secreting Cells: The Influences of ELL2, Small Nuclear RNA, and Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Immunol.* **201**, 3073–3083 (2018).
41. Peciuliene, I., Vilys, L., Jakubauskiene, E., Zaliauskiene, L. & Kanopka, A. Hypoxia alters splicing of the cancer associated Fas gene. *Exp. Cell Res.* **380**, 29–35 (2019).
42. Wang, G.-S. & Cooper, T. A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 749–761 (2007).
43. Moon, H. *et al.* Activation of Cryptic 3' Splice-Sites by SRSF2 Contributes to Cassette Exon Skipping. *Cells* **8**, (2019).
44. Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J. & Wirth, B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6307–6311 (1999).
45. Sadek, J., Omer, A., Hall, D., Ashour, K. & Gallouzi, I. E. Alternative polyadenylation and the stress response. *Wiley Interdiscip Rev RNA* e1540 (2019). doi:10.1002/wrna.1540

46. Powell, L. M. *et al.* A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* **50**, 831–840 (1987).
47. Nishikura, K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 321–349 (2010).
48. Hundley, H. A., Krauchuk, A. A. & Bass, B. L. C. elegans and H. sapiens mRNAs with edited 3' UTRs are present on polysomes. *RNA* **14**, 2050–2060 (2008).
49. Licht, K. *et al.* Inosine induces context-dependent recoding and translational stalling. *Nucleic Acids Res.* **47**, 3–14 (2019).
50. Yang, Y., Zhou, X. & Jin, Y. ADAR-mediated RNA editing in non-coding RNA sequences. *Sci China Life Sci* **56**, 944–952 (2013).
51. Wu, X. & Brewer, G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* **500**, 10–21 (2012).
52. Yang, F. *et al.* Polysome-bound endonuclease PMR1 is targeted to stress granules via stress-specific binding to TIA-1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8803–8813 (2006).
53. Yang, F., Peng, Y. & Schoenberg, D. R. Endonuclease-mediated mRNA decay requires tyrosine phosphorylation of polysomal ribonuclease 1 (PMR1) for the targeting and degradation of polyribosome-bound substrate mRNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 48993–49002 (2004).
54. Kedersha, N. *et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871–884 (2005).
55. Oren, Y. S. *et al.* The unfolded protein response affects readthrough of premature termination codons. *EMBO Mol. Med.* **6**, 685–701 (2014).
56. Fernandes, R., Nogueira, G., da Costa, P. J., Pinto, F. & Romão, L. Nonsense-Mediated mRNA Decay in Development, Stress and Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1157**, 41–83 (2019).
57. Wang, D. *et al.* Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3670–3680 (2011).
58. Park, E. & Maquat, L. E. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 423–435 (2013).
59. Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Desbats, M. A., Leishman, C. C. & Boccaccio, G. L. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* **122**, 563–573 (2009).
60. Dykes, I. M. & Emanuelli, C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **15**, 177–186 (2017).
61. Lee, J. T. & Bartolomei, M. S. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* **152**, 1308–1323 (2013).

62. Barbier, J. *et al.* An NF90/NF110-mediated feedback amplification loop regulates dicer expression and controls ovarian carcinoma progression. *Cell Res.* **28**, 556–571 (2018).
63. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–235 (2004).
64. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **9**, 402 (2018).
65. Almeida, M. V., Andrade-Navarro, M. A. & Ketting, R. F. Function and evolution of nematode RNAi pathways. *Noncoding RNA* **5**, (2019).
66. Brennecke, J. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089–1103 (2007).
67. Aravin, A. A. *et al.* A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* **31**, 785–799 (2008).
68. Belicard, T., Jareosettasin, P. & Sarkies, P. The piRNA pathway responds to environmental signals to establish intergenerational adaptation to stress. *BMC Biol.* **16**, 103 (2018).
69. Liu, Y. *et al.* The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Mol. Cancer* **18**, 123 (2019).
70. Diallo, L. H. *et al.* How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms? *Biochimie* (2019). doi:10.1016/j.biochi.2019.06.015
71. Li, Z. *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 256–264 (2015).
72. Hansen, T. B. *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384–388 (2013).
73. Crick, F. H. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* **38**, 367–379 (1968).
74. Kearse, M. G. & Wilusz, J. E. Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.* **31**, 1717–1731 (2017).
75. Ben-Shem, A. *et al.* The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524–1529 (2011).
76. Weisser, M., Voigts-Hoffmann, F., Rabl, J., Leibundgut, M. & Ban, N. The crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with eIF1 and eIF1A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1015–1017 (2013).
77. Merrick, W. C. & Pavitt, G. D. Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).

78. Altmann, M., Müller, P. P., Pelletier, J., Sonenberg, N. & Trachsel, H. A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue in vivo. *J. Biol. Chem.* **264**, 12145–12147 (1989).
79. Pelletier, J. & Sonenberg, N. The organizing principles of eukaryotic ribosome recruitment. *Annu. Rev. Biochem.* **88**, 307–335 (2019).
80. Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S. & Sonenberg, N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* **345**, 544–547 (1990).
81. Feoktistova, K., Tuvshintogs, E., Do, A. & Fraser, C. S. Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 13339–13344 (2013).
82. Kumar, P., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes Dev.* **30**, 1573–1588 (2016).
83. Martin, F. *et al.* Ribosomal 18S rRNA base pairs with mRNA during eukaryotic translation initiation. *Nat. Commun.* **7**, 12622 (2016).
84. Lomakin, I. B. & Steitz, T. A. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. *Nature* **500**, 307–311 (2013).
85. Rodnina, M. V., Beringer, M. & Wintermeyer, W. How ribosomes make peptide bonds. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 20–26 (2007).
86. Chirkova, A. *et al.* The role of the universally conserved A2450-C2063 base pair in the ribosomal peptidyl transferase center. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4844–4855 (2010).
87. Richter, J. D. & Collier, J. Pausing on polyribosomes: make way for elongation in translational control. *Cell* **163**, 292–300 (2015).
88. Dever, T. E. & Green, R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a013706 (2012).
89. Beißel, C. *et al.* Translation termination depends on the sequential ribosomal entry of eRF1 and eRF3. *Nucleic Acids Res.* **47**, 4798–4813 (2019).
90. Halic, M. *et al.* Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* **427**, 808–814 (2004).
91. Yang, Q. *et al.* eRF1 mediates codon usage effects on mRNA translation efficiency through premature termination at rare codons. *Nucleic Acids Res.* **47**, 9243–9258 (2019).
92. Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J. & Sharp, P. A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* **21**, 533–542 (2006).
93. Darnell, J. C. *et al.* FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* **146**, 247–261 (2011).

94. Yu, C.-H. *et al.* Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Mol. Cell* **59**, 744–754 (2015).
95. Liu, B., Han, Y. & Qian, S.-B. Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. *Mol. Cell* **49**, 453–463 (2013).
96. Leprivier, G. *et al.* The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell* **153**, 1064–1079 (2013).
97. Shenton, D. *et al.* Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 29011–29021 (2006).
98. Yang, W. & Hinnebusch, A. G. Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6603–6616 (1996).
99. Pavitt, G. D. Regulation of translation initiation factor eIF2B at the hub of the integrated stress response. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **9**, e1491 (2018).
100. Spriggs, K. A., Bushell, M. & Willis, A. E. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* **40**, 228–237 (2010).
101. Qin, X., Jiang, B. & Zhang, Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle* **15**, 781–786 (2016).
102. Weichhart, T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology* **64**, 127–134 (2018).
103. Mader, S., Lee, H., Pause, A. & Sonenberg, N. 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 (1995).
104. Pende, M. *et al.* S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3112–3124 (2004).
105. Shahbazian, D. *et al.* The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* **25**, 2781–2791 (2006).
106. Harris, T. E. *et al.* mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J.* **25**, 1659–1668 (2006).
107. Advani, V. M. & Ivanov, P. Translational Control under Stress: Reshaping the Translatome. *Bioessays* **41**, e1900009 (2019).
108. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218–223 (2009).

109. Huez, I., Bornes, S., Bresson, D., Créancier, L. & Prats, H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol. Endocrinol.* **15**, 2197–2210 (2001).
110. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 318–327 (2005).
111. Vattem, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11269–11274 (2004).
112. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P. & Anderson, P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol. Cell* **43**, 613–623 (2011).
113. Emara, M. M. *et al.* Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J. Biol. Chem.* **285**, 10959–10968 (2010).
114. Vitali, P. & Kiss, T. Cooperative 2'-O-methylation of the wobble cytidine of human elongator tRNA^{Met}(CAT) by a nucleolar and a Cajal body-specific box C/D RNP. *Genes Dev.* **33**, 741–746 (2019).
115. Gray, N. K. & Hentze, M. W. Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J.* **13**, 3882–3891 (1994).
116. Muckenthaler, M., Gray, N. K. & Hentze, M. W. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol. Cell* **2**, 383–388 (1998).
117. Pelletier, J. & Sonenberg, N. Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eucaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3222–3230 (1985).
118. Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J.-H. & Tsien, R. Y. Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA* **12**, 851–861 (2006).
119. Carrieri, C. *et al.* Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* **491**, 454–457 (2012).
120. Cohen-Chalamish, S. *et al.* Dynamic refolding of IFN-gamma mRNA enables it to function as PKR activator and translation template. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 896–903 (2009).
121. Ben-Asouli, Y., Banai, Y., Pel-Or, Y., Shir, A. & Kaempfer, R. Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell* **108**, 221–232 (2002).
122. Leppek, K., Das, R. & Barna, M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 158–174 (2018).
123. Dominissini, D. *et al.* Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* **485**, 201–206 (2012).

124. Meyer, K. D. *et al.* 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **163**, 999–1010 (2015).
125. Coots, R. A. *et al.* m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. *Mol. Cell* **68**, 504–514.e7 (2017).
126. Wang, X. *et al.* N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* **161**, 1388–1399 (2015).
127. Peer, E., Moshitch-Moshkovitz, S., Rechavi, G. & Dominissini, D. The epitranscriptome in translation regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, (2019).
128. Dominissini, D. *et al.* The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **530**, 441–446 (2016).
129. Belin, S. *et al.* Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* **4**, e7147 (2009).
130. Marcel, V. *et al.* p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* **24**, 318–330 (2013).
131. Xue, S. *et al.* RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* **517**, 33–38 (2015).
132. Genuth, N. R. & Barna, M. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 431–452 (2018).
133. Mailliot, J. & Martin, F. Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **9**, (2018).
134. Godet, A.-C. *et al.* IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
135. Lozano, G. & Martínez-Salas, E. Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr Opin Virol* **12**, 113–120 (2015).
136. Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T. & Rhoads, R. E. 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 (1995).
137. Svitkin, Y. V., Gradi, A., Imataka, H., Morino, S. & Sonenberg, N. Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J. Virol.* **73**, 3467–3472 (1999).
138. Jackson, R. J. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1231–1241 (2005).

139. Yu, Y. *et al.* The mechanism of translation initiation on Aichivirus RNA mediated by a novel type of picornavirus IRES. *EMBO J.* **30**, 4423–4436 (2011).
140. Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A. & Sonenberg, N. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5578–5583 (1996).
141. Mosenkis, J. *et al.* Shutoff of host translation by encephalomyocarditis virus infection does not involve cleavage of the eucaryotic initiation factor 4F polypeptide that accompanies poliovirus infection. *J. Virol.* **54**, 643–645 (1985).
142. Ren, Q. *et al.* Alternative reading frame selection mediated by a tRNA-like domain of an internal ribosome entry site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E630–9 (2012).
143. Hidalgo, L. & Swanson, C. M. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mRNA translation. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 353–364 (2017).
144. Macejak, D. G. & Sarnow, P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353**, 90–94 (1991).
145. Morfoisse, F. *et al.* Nucleolin Promotes Heat Shock-Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer Res.* **76**, 4394–4405 (2016).
146. Nanbru, C. *et al.* Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* **272**, 32061–32066 (1997).
147. Morfoisse, F. *et al.* Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep.* **6**, 155–167 (2014).
148. Huez, I. *et al.* Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6178–6190 (1998).
149. Oh, S. K., Scott, M. P. & Sarnow, P. Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes Dev.* **6**, 1643–1653 (1992).
150. Lacerda, R., Menezes, J. & Romão, L. More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell Mol. Life Sci.* **74**, 1659–1680 (2017).
151. Weingarten-Gabbay, S. *et al.* Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **351**, (2016).
152. Ke, A. & Doudna, J. A. Crystallization of RNA and RNA-protein complexes. *Methods* **34**, 408–414 (2004).
153. Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G. & Holcik, M. Searching for IRES. *RNA* **12**, 1755–1785 (2006).

154. Lozano, G., Francisco-Velilla, R. & Martinez-Salas, E. Ribosome-dependent conformational flexibility changes and RNA dynamics of IRES domains revealed by differential SHAPE. *Sci. Rep.* **8**, 5545 (2018).
155. Kladwang, W., VanLang, C. C., Cordero, P. & Das, R. Understanding the errors of SHAPE-directed RNA structure modeling. *Biochemistry* **50**, 8049–8056 (2011).
156. Martineau, Y. *et al.* Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7622–7635 (2004).
157. Thompson, S. R. So you want to know if your message has an IRES? *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 697–705 (2012).
158. Chen, C. Y. & Sarnow, P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* **268**, 415–417 (1995).
159. Renaud-Gabardos, E. *et al.* Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J Exp Med* **5**, 11–20 (2015).
160. Renaud-Gabardos, E. *et al.* Therapeutic Benefit and Gene Network Regulation by Combined Gene Transfer of Apelin, FGF2, and SERCA2a into Ischemic Heart. *Mol. Ther.* **26**, 902–916 (2018).
161. Rayssac, A. *et al.* IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. *Mol. Ther.* **17**, 2010–2019 (2009).
162. Créancier, 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.* **150**, 275–281 (2000).
163. Gonzalez-Herrera, I. G. *et al.* Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J.* **20**, 476–478 (2006).
164. Audigier, S. *et al.* Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA* **14**, 1852–1864 (2008).
165. Conte, C. *et al.* Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5267–5278 (2009).
166. Pyronnet, S., Pradayrol, L. & Sonenberg, N. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol. Cell* **5**, 607–616 (2000).
167. Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M. & Willis, A. E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol. Cell* **100**, 27–38 (2008).
168. Bornes, S. *et al.* Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ. Res.* **100**, 305–308 (2007).

169. Conte, C. *et al.* FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1 α . *PLoS One* **3**, e3078 (2008).
170. Braunstein, S. *et al.* A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol. Cell* **28**, 501–512 (2007).
171. Holcik, M. Could the eIF2 α -Independent Translation Be the Achilles Heel of Cancer? *Front. Oncol.* **5**, 264 (2015).
172. Thakor, N. & Holcik, M. IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2 α - independent manner during stress. *Nucleic Acids Res.* **40**, 541–552 (2012).
173. Jang, S. K. & Wimmer, E. 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 (1990).
174. Ainaoui, N. *et al.* Promoter-Dependent Translation Controlled by p54nrb and hnRNPM during Myoblast Differentiation. *PLoS One* **10**, e0136466 (2015).
175. Pisarev, A. V., Unbehaun, A., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. in *Translation initiation: reconstituted systems and biophysical methods* **430**, 147–177 (Elsevier, 2007).
176. Dobbryn, H. C. *et al.* Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene* **27**, 1167–1174 (2008).
177. Bonnal, S. *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J. Biol. Chem.* **280**, 4144–4153 (2005).
178. Lewis, S. M. *et al.* Subcellular relocation of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1302–1311 (2007).
179. Cammas, A. *et al.* Cytoplasmic relocation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Mol. Biol. Cell* **18**, 5048–5059 (2007).
180. Henis-Korenblit, S. *et al.* The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5400–5405 (2002).
181. Jo, O. D. *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site function through Akt signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 23274–23287 (2008).
182. Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Coldwell, M. J., Jackson, R. J. & Willis, A. E. 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 (2003).

183. Meng, Z. *et al.* 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 (2008).
184. Yang, Y. *et al.* TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. *Cell Death Dis.* **9**, 886 (2018).
185. Lewis, S. M. & Holcik, M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* **27**, 1033–1035 (2008).
186. Stoneley, M. *et al.* c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1162–1169 (2000).
187. Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A. M., Graveley, B. R. & Blencowe, B. J. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* **152**, 1252–1269 (2013).
188. Lin, J.-C., Hsu, M. & Tarn, W.-Y. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2235–2240 (2007).
189. Liwak, U. *et al.* 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 (2012).
190. Wang, Q. & Yang, H.-S. The role of Pdc4 in tumour suppression and protein translation. *Biol. Cell* (2018). doi:10.1111/boc.201800014
191. Lin, W. *et al.* Loss of PINK1 attenuates HIF-1 α induction by preventing 4E-BP1-dependent switch in protein translation under hypoxia. *J. Neurosci.* **34**, 3079–3089 (2014).
192. Nevins, T. A., Harder, Z. M., Korneluk, R. G. & Holcik, M. Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. *J. Biol. Chem.* **278**, 3572–3579 (2003).
193. Thakor, N. *et al.* Cellular mRNA recruits the ribosome via eIF3-PABP bridge to initiate internal translation. *RNA Biol.* **14**, 553–567 (2017).
194. Xue, S. & Barna, M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 355–369 (2012).
195. Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Ramajo, J. & Martinez-Salas, E. The RNA-binding protein Gemin5 binds directly to the ribosome and regulates global translation. *Nucleic Acids Res.* **44**, 8335–8351 (2016).
196. Colón-Ramos, D. A. *et al.* Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 103–111 (2006).

197. Yu, Y., Ji, H., Doudna, J. A. & Leary, J. A. Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Sci.* **14**, 1438–1446 (2005).
198. Landry, D. M., Hertz, M. I. & Thompson, S. R. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev.* **23**, 2753–2764 (2009).
199. Shi, Z. *et al.* Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* **67**, 71–83.e7 (2017).
200. Chen, D. & Huang, S. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J. Cell Biol.* **153**, 169–176 (2001).
201. Dyck, J. A. *et al.* A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**, 333–343 (1994).
202. Phelan, A., Carmo-Fonseca, M., McLaughlan, J., Lamond, A. I. & Clements, J. B. A herpes simplex virus type 1 immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9056–9060 (1993).
203. Phair, R. D. & Misteli, T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* **404**, 604–609 (2000).
204. Fong, K.-W. *et al.* Whole-genome screening identifies proteins localized to distinct nuclear bodies. *J. Cell Biol.* **203**, 149–164 (2013).
205. Fox, A. H. *et al.* Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr. Biol.* **12**, 13–25 (2002).
206. Hutchinson, J. N. *et al.* A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* **8**, 39 (2007).
207. Clemson, C. M. *et al.* An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol. Cell* **33**, 717–726 (2009).
208. Sunwoo, H. *et al.* MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* **19**, 347–359 (2009).
209. Naganuma, T. & Hirose, T. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* **10**, 456–461 (2013).
210. Naganuma, T. *et al.* Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J.* **31**, 4020–4034 (2012).
211. Clark, M. B. *et al.* Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res.* **22**, 885–898 (2012).
212. Choudhry, H. *et al.* Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2 α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. *Oncogene* **34**, 4546 (2015).

213. Fox, A. H., Nakagawa, S., Hirose, T. & Bond, C. S. Paraspeckles: where long noncoding RNA meets phase separation. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 124–135 (2018).
214. Chakravarty, D. *et al.* The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat. Commun.* **5**, 5383 (2014).
215. Adriaens, C. *et al.* p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat. Med.* **22**, 861–868 (2016).
216. Hirose, T. *et al.* NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol. Biol. Cell* **25**, 169–183 (2014).
217. Lellahi, S. M. *et al.* 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 (2018).
218. Hay, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* **233**, 706–720 (2005).
219. Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G. & Hirose, T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J. Cell Biol.* **193**, 31–39 (2011).
220. Prasanth, K. V. *et al.* Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**, 249–263 (2005).
221. Dettwiler, S., Aringhieri, C., Cardinale, S., Keller, W. & Barabino, S. M. L. Distinct sequence motifs within the 68-kDa subunit of cleavage factor Im mediate RNA binding, protein-protein interactions, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **279**, 35788–35797 (2004).
222. Lee, M. *et al.* The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3826–3840 (2015).
223. Fox, A. H., Bond, C. S. & Lamond, A. I. P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5304–5315 (2005).
224. Li, S. *et al.* Double-strand break repair deficiency in NONO knockout murine embryonic fibroblasts and compensation by spontaneous upregulation of the PSPC1 paralog. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9771–9780 (2014).
225. Zhang, Z. & Carmichael, G. G. 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 (2001).
226. Chen, L.-L. & Carmichael, G. G. 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 (2009).
227. Murthy, U. M. S. & Rangarajan, P. N. Identification of protein interaction regions of VINC/NEAT1/Men epsilon RNA. *FEBS Lett.* **584**, 1531–1535 (2010).

228. Yamazaki, T. & Hirose, T. The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs. *Front. Biosci. (Elite Ed)* **7**, 1–41 (2015).
229. Kawaguchi, T. *et al.* SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 4304–4309 (2015).
230. Hirose, T., Yamazaki, T. & Nakagawa, S. Molecular anatomy of the architectural NEAT1 noncoding RNA: The domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **10**, e1545 (2019).
231. West, J. A. *et al.* Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J. Cell Biol.* **214**, 817–830 (2016).
232. Yamazaki, T. *et al.* Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Mol. Cell* **70**, 1038–1053.e7 (2018).
233. Sasaki, Y. T. F., Ideue, T., Sano, M., Mituyama, T. & Hirose, T. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2525–2530 (2009).
234. Shen, W., Liang, X. & Crooke, S. T. Phosphorothioate oligonucleotides can displace NEAT1 RNA and form nuclear paraspeckle-like structures. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8648–8662 (2014).
235. Maharana, S. *et al.* RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science* **360**, 918–921 (2018).
236. Anantharaman, A. *et al.* Paraspeckles modulate the intranuclear distribution of paraspeckle-associated Ctn RNA. *Sci. Rep.* **6**, 34043 (2016).
237. Hu, S.-B. *et al.* Protein arginine methyltransferase CARM1 attenuates the paraspeckle-mediated nuclear retention of mRNAs containing IRAlus. *Genes Dev.* **29**, 630–645 (2015).
238. Wang, Y. *et al.* Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1145–1158 (2018).
239. Imamura, K. *et al.* Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol. Cell* **53**, 393–406 (2014).
240. Shen, W., Liang, X.-H., Sun, H., De Hoyos, C. L. & Crooke, S. T. Depletion of NEAT1 lncRNA attenuates nucleolar stress by releasing sequestered P54nrb and PSF to facilitate c-Myc translation. *PLoS One* **12**, e0173494 (2017).
241. Bruelle, C. *et al.* The mitotic phosphorylation of p54(nrb) modulates its RNA binding activity. *Biochem Cell Biol* **89**, 423–433 (2011).
242. Kowalska, E. *et al.* Distinct roles of DBHS family members in the circadian transcriptional feedback loop. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4585–4594 (2012).

243. Torres, M. *et al.* Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements. *Elife* **5**, (2016).
244. Hupalowska, A. *et al.* CARM1 and Paraspeckles Regulate Pre-implantation Mouse Embryo Development. *Cell* **175**, 1902–1916.e13 (2018).
245. Lehnert, S. A. *et al.* Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Dev. Biol.* **7**, 95 (2007).
246. Modic, M. *et al.* Cross-Regulation between TDP-43 and Paraspeckles Promotes Pluripotency-Differentiation Transition. *Mol. Cell* **74**, 951–965.e13 (2019).
247. Huang, S. *et al.* NEAT1 regulates Th2 cell development by targeting STAT6 for degradation. *Cell Cycle* **18**, 312–319 (2019).
248. Nakagawa, S. *et al.* The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development* **141**, 4618–4627 (2014).
249. Major, A. T. *et al.* Dynamic paraspeckle component localization during spermatogenesis. *Reproduction* (2019). doi:10.1530/REP-19-0139
250. Zhang, Q. & Jeang, K.-T. Long non-coding RNAs (lncRNAs) and viral infections. *Biomed. Pharmacother.* **3**, 34–42 (2013).
251. Zhang, Q., Chen, C.-Y., Yedavalli, V. S. R. K. & Jeang, K.-T. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. *MBio* **4**, e00596–12 (2013).
252. Wang, Z. *et al.* NEAT1 modulates herpes simplex virus-1 replication by regulating viral gene transcription. *Cell Mol. Life Sci.* **74**, 1117–1131 (2017).
253. Prinz, F., Kapeller, A., Pichler, M. & Klec, C. The Implications of the Long Non-Coding RNA NEAT1 in Non-Cancerous Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
254. Ma, H. *et al.* The Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Antihantaviral Effects by Acting as Positive Feedback for RIG-I Signaling. *J. Virol.* **91**, (2017).
255. Chanda, K. *et al.* Altered levels of long ncRNAs meg3 and neat1 in cell and animal models of huntington's disease. *RNA Biol.* **15**, 1348–1363 (2018).
256. Nishimoto, Y. *et al.* The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Brain* **6**, 31 (2013).
257. Santoro, M. *et al.* Expression Profile of Long Non-Coding RNAs in Serum of Patients with Multiple Sclerosis. *J. Mol. Neurosci.* **59**, 18–23 (2016).
258. Liu, Y. & Lu, Z. 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 (2018).

259. Yan, W., Chen, Z.-Y., Chen, J.-Q. & Chen, H.-M. LncRNA NEAT1 promotes autophagy in MPTP-induced Parkinson's disease through stabilizing PINK1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**, 1019–1024 (2018).
260. Huang-Fu, N., Cheng, J.-S., Wang, Y., Li, Z.-W. & Wang, S.-H. Neat1 regulates oxidized low-density lipoprotein-induced inflammation and lipid uptake in macrophages via paraspeckle formation. *Mol. Med. Rep.* **17**, 3092–3098 (2018).
261. Zhang, P., Cao, L., Zhou, R., Yang, X. & Wu, M. The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages. *Nat. Commun.* **10**, 1495 (2019).
262. Ahmed, A. S. I. *et al.* Long noncoding RNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) is critical for phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E8660–E8667 (2018).
263. Kenneweg, F. *et al.* Long Noncoding RNA-Enriched Vesicles Secreted by Hypoxic Cardiomyocytes Drive Cardiac Fibrosis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **18**, 363–374 (2019).
264. Castanotto, D. *et al.* A stress-induced response complex (SIRC) shuttles miRNAs, siRNAs, and oligonucleotides to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E5756–E5765 (2018).
265. Xiao, Z.-D. *et al.* Energy stress-induced lncRNA FILNC1 represses c-Myc-mediated energy metabolism and inhibits renal tumor development. *Nat. Commun.* **8**, 783 (2017).
266. Ghafouri-Fard, S. & Taheri, M. Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (NEAT1): A long non-coding RNA with diverse functions in tumorigenesis. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 51–59 (2019).
267. Lo, P.-K. *et al.* Dysregulation of the BRCA1/long non-coding RNA NEAT1 signaling axis contributes to breast tumorigenesis. *Oncotarget* **7**, 65067–65089 (2016).
268. Klec, C., Prinz, F. & Pichler, M. Involvement of the long noncoding RNA NEAT1 in carcinogenesis. *Mol. Oncol.* **13**, 46–60 (2019).
269. Silvestre, J.-S., Smadja, D. M. & Lévy, B. I. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol. Rev.* **93**, 1743–1802 (2013).
270. Tatin, F. *et al.* Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction. *JCI Insight* **2**, (2017).
271. Jaba, I. M. *et al.* NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth. *J. Clin. Invest.* **123**, 1718–1731 (2013).
272. Matsunaga, T. *et al.* Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation* **102**, 3098–3103 (2000).
273. Murohara, T. *et al.* Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.* **101**, 2567–2578 (1998).

- 274. Bijlsma, M. F. *et al.* Hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1alpha. *J. Cell Mol. Med.* **13**, 2053–2060 (2009).
- 275. Chavakis, E. *et al.* Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J. Exp. Med.* **201**, 63–72 (2005).
- 276. Rey, S. *et al.* Synergistic effect of HIF-1alpha gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20399–20404 (2009).
- 277. Cummins, E. P. *et al.* Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18154–18159 (2006).
- 278. Pagé, E. L., Robitaille, G. A., Pouyssegur, J. & Richard, D. E. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* **277**, 48403–48409 (2002).
- 279. Schito, L. Hypoxia-Dependent Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1136**, 71–85 (2019).
- 280. Nanni, S. *et al.* Endothelial NOS, estrogen receptor beta, and HIFs cooperate in the activation of a prognostic transcriptional pattern in aggressive human prostate cancer. *J. Clin. Invest.* **119**, 1093–1108 (2009).
- 281. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732 (2003).
- 282. Eltzschig, H. K. & Carmeliet, P. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 656–665 (2011).
- 283. Schito, L. Bridging angiogenesis and immune evasion in the hypoxic tumor microenvironment. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **315**, R1072–R1084 (2018).
- 284. Ma, J. *et al.* Role of Twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 686–691 (2011).
- 285. Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Hardy, K. M., Seftor, R. E. B. & Hendrix, M. J. C. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2726–2732 (2012).
- 286. Seftor, R. E. B. *et al.* Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am. J. Pathol.* **181**, 1115–1125 (2012).
- 287. Alitalo, K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat. Med.* **17**, 1371–1380 (2011).
- 288. Ronca, R., Giacomini, A., Rusnati, M. & Presta, M. 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 (2015).

289. Vlodavsky, I. *et al.* Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metast. Rev.* **9**, 203–226 (1990).
290. Green, P. J., Walsh, F. S. & Doherty, P. Promiscuity of fibroblast growth factor receptors. *Bioessays* **18**, 639–646 (1996).
291. Böttcher, R. T. & Niehrs, C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr. Rev.* **26**, 63–77 (2005).
292. Prudovsky, I. *et al.* Secretion without Golgi. *J. Cell Biochem.* **103**, 1327–1343 (2008).
293. Jackson, A. *et al.* Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10691–10695 (1992).
294. Florkiewicz, R. Z., Majack, R. A., Buechler, R. D. & Florkiewicz, E. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.* **162**, 388–399 (1995).
295. Stegmann, T. J. New approaches to coronary heart disease: induction of neovascularisation by growth factors. *BioDrugs* **11**, 301–308 (1999).
296. Unger, E. F. *et al.* Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am. J. Physiol.* **266**, H1588–95 (1994).
297. Lazarous, D. F. *et al.* Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc. Res.* **36**, 78–85 (1997).
298. Laham, R. J. *et al.* Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2132–2139 (2000).
299. Murakami, M. & Simons, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol* **15**, 215–220 (2008).
300. Garmy-Susini, B. *et al.* Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation. *Circ. Res.* **94**, 1301–1309 (2004).
301. Kwabi-Addo, B., Ozen, M. & Ittmann, M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **11**, 709–724 (2004).
302. Cenni, E. *et al.* Inhibition of angiogenesis via FGF-2 blockage in primitive and bone metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* **27**, 315–319 (2007).
303. Wu, D. *et al.* Upregulation of long non-coding RNA RAB1A-2 induces FGF1 expression worsening lung cancer prognosis. *Cancer Lett.* **438**, 116–125 (2018).
304. Eigner, K. *et al.* The unfolded protein response impacts melanoma progression by enhancing FGF expression and can be antagonized by a chemical chaperone. *Sci. Rep.* **7**, 17498 (2017).

305. Grimm, J. *et al.* BRAF inhibition causes resilience of melanoma cell lines by inducing the secretion of FGF1. *Oncogenesis* **7**, 71 (2018).
306. Sun, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts secrete FGF-1 to promote ovarian proliferation, migration, and invasion through the activation of FGF-1/FGFR4 signaling. *Tumour Biol.* **39**, 1010428317712592 (2017).
307. Manousakidi, S. *et al.* FGF1 induces resistance to chemotherapy in ovarian granulosa tumor cells through regulation of p53 mitochondrial localization. *Oncogenesis* **7**, 18 (2018).
308. Li, J. *et al.* 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 (2017).
309. Endoh, M., Pulsinelli, W. A. & Wagner, J. A. Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **22**, 76–88 (1994).
310. Kuwabara, K. *et al.* Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4606–4610 (1995).
311. Lateef, Z. & Wise, L. M. Exploitation of receptor tyrosine kinases by viral-encoded growth factors. *Growth Factors* **36**, 118–140 (2018).
312. Marcellini, M. *et al.* Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *Am. J. Pathol.* **169**, 643–654 (2006).
313. Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B. & Carmeliet, P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer* **8**, 942–956 (2008).
314. Luttun, A., Tjwa, M. & Carmeliet, P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **979**, 80–93 (2002).
315. Zhang, F. *et al.* VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 6152–6157 (2009).
316. Rissanen, T. T. *et al.* VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ. Res.* **92**, 1098–1106 (2003).
317. Karnezis, T. *et al.* VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell* **21**, 181–195 (2012).
318. He, Y. *et al.* Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* **65**, 4739–4746 (2005).

319. Petrova, T. V. *et al.* VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell* **13**, 554–556 (2008).
320. Laakkonen, P. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.* **67**, 593–599 (2007).
321. Prats, H. *et al.* High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1836–1840 (1989).
322. Florkiewicz, R. Z. & Sommer, A. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3978–3981 (1989).
323. Okada-Ban, M., Thiery, J. P. & Jouanneau, J. Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 263–267 (2000).
324. Vagner, S. *et al.* Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 35–44 (1995).
325. Peach, C. J. *et al.* Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
326. Bornes, S. *et al.* Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J. Biol. Chem.* **279**, 18717–18726 (2004).
327. Joukov, V. *et al.* Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* **16**, 3898–3911 (1997).
328. Morfoisse, F., Renaud, E., Hantelys, F., Prats, A.-C. & Garmy-Susini, B. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Molecular & Cellular Oncology* **2**, e1024821 (2015).
329. Gonzalez-Herrera, I. G. *et al.* IRES-dependent regulation of FGF-2 mRNA translation in pathophysiological conditions in the mouse. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 17–21 (2006).
330. Choudhry, H. *et al.* Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2 α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. *Oncogene* **34**, 4482–4490 (2015).
331. Wang, Z., Rao, D. D., Senzer, N. & Nemunaitis, J. RNA interference and cancer therapy. *Pharm. Res.* **28**, 2983–2995 (2011).
332. Castanotto, D. *et al.* Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5154–5164 (2007).
333. Grimm, D. *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**, 537–541 (2006).

334. Maczuga, P. *et al.* Optimization and comparison of knockdown efficacy between polymerase II expressed shRNA and artificial miRNA targeting luciferase and Apolipoprotein B100. *BMC Biotechnol.* **12**, 42 (2012).
335. Boudreau, R. L., Martins, I. & Davidson, B. L. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **17**, 169–175 (2009).
336. Lagos-Quintana, M. *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* **12**, 735–739 (2002).
337. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–234 (2009).
338. Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. & Millhorn, D. E. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J. Biol. Chem.* **278**, 15911–15916 (2003).
339. Marko, M., Leichter, M., Patrino-Georgoula, M. & Guialis, A. hnRNP M interacts with PSF and p54(nrb) and co-localizes within defined nuclear structures. *Exp. Cell Res.* **316**, 390–400 (2010).
340. Cauquil, M. *et al.* Ephrin-B1 blocks adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *BioRxiv* (2019). doi:10.1101/735571
341. Pan, L.-J. *et al.* Upregulation and clinicopathological significance of long non-coding NEAT1 RNA in NSCLC tissues. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 2851–2855 (2015).
342. Skobe, M. *et al.* Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* **7**, 192–198 (2001).
343. Stacker, S. A. *et al.* VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* **7**, 186–191 (2001).
344. Prats, A. C. *et al.* CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvasc. Res.* **89**, 25–33 (2013).
345. Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H. H. & Gorospe, M. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* **6**, 1288–1292 (2007).
346. Miyashita, H. *et al.* Angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1. *PLoS One* **7**, e46459 (2012).
347. Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A. & Sonenberg, N. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* **11**, 4153–4158 (1992).
348. Jünemann, C. *et al.* Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J. Biol. Chem.* **282**, 132–141 (2007).

349. Vera, M. *et al.* The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *Elife* **3**, e03164 (2014).
350. Yang, C. *et al.* Long non-coding RNA NEAT1 overexpression is associated with poor prognosis in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 2672–2680 (2017).
351. Takeda, N. & Manabe, I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int. J. Inflam.* **2011**, 535241 (2011).
352. Kakkar, R. & Lee, R. T. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ. Res.* **106**, 47–57 (2010).

Régulation de la traduction des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques et rôle de l'ARN non codant NEAT1 lors du stress hypoxique

La traduction est une étape de l'expression des gènes fortement régulée. Lorsque la cellule est stressée, cela bloque la synthèse protéique globale tout en activant la traduction de certains ARNm par des mécanismes alternatifs. L'un de ces mécanismes implique des structures de l'ARNm, les IRES (Internal Ribosome Entry Sites), qui permettent un recrutement de la machinerie de traduction indépendamment de l'extrémité 5' coiffée de l'ARNm. L'activité des IRES est régulée par des facteurs appelés ITAF (IRES trans-acting factor). Le stress hypoxique survient dans différentes pathologies comme l'ischémie cardiaque et le cancer. Pour répondre rapidement à ce stress, les cellules produisent des facteurs de croissance (lymph)angiogéniques qui stimulent la formation de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cela permet de reperfuser la zone lésée dans le cœur ischémique, ou de stimuler la croissance tumorale et la dissémination métastatique dans le cancer.

Mon projet de thèse porte sur l'identification d'ITAF contrôlant la traduction des ARNm de ces facteurs de croissance lors de l'hypoxie. La première partie de ma thèse s'est focalisée sur la régulation de la traduction dans les cardiomyocytes hypoxiques. Une étude semi-globale a montré que les gènes de la (lymph)angiogenèse sont régulés majoritairement au niveau traductionnel, alors que tous les ARNm connus pour posséder des IRES sont recrutés plus activement dans les polysomes lors du stress. Nous avons montré que les IRES d'ARNm des familles FGF (fibroblast growth factor) et VEGF (vascular endothelial growth factor) sont tous activés lors de l'hypoxie précoce alors que les IRES d'ARNm non liés à la (lymph)angiogenèse sont activés plus tardivement. Enfin, nous avons identifié un nouvel ITAF, la vasohibine (VASH1), qui active spécifiquement l'IRES du FGF1, mais pas les autres IRES testés. Une analyse par PCR array indique cependant que VASH1 est capable d'inhiber ou de stimuler la traduction de nombreux autres ARNm.

La recherche d'un mécanisme global d'activation des IRES des FGF et VEGF fait l'objet du deuxième chapitre de ma thèse. VASH1 n'étant pas un ITAF commun, j'ai recherché d'autres candidats. Je suis partie de l'observation qu'un autre ITAF identifié précédemment au laboratoire, p54nrb, est un composant essentiel du paraspeckle, un corps nucléaire formé en cas de stress. Nous avons émis l'hypothèse que d'autres composants du paraspeckle pourraient être des ITAFs, en particulier le long ARN non codant NEAT1 sur lequel repose sa formation. J'ai établi une corrélation entre l'induction de NEAT1 et l'activation de l'IRES du FGF1 lors de l'hypoxie. De plus, la déplétion de NEAT1 entraîne une inactivation de l'IRES, suggérant que cet ARN non codant est un ITAF. J'ai mis en évidence qu'une autre protéine du paraspeckle, PSPC1, est également un ITAF. Une analyse de la composition de l'IRESome par spectrométrie de masse m'a permis d'identifier trois candidats supplémentaires : hnRNPM, rps2 et Nucléoline. Ayant élargi cette étude aux autres IRES étudiés dans le chapitre 1, nous avons démontré que p54nrb et PSPC1 sont capables d'activer plusieurs IRES alors que l'ARN non codant NEAT1, est un ITAF activateur de tous les IRES testés. NEAT1 paraît donc être la clé de l'activation des IRES, et donne au paraspeckle la fonction nouvelle de plateforme d'assemblage de l'IRESome dans les cardiomyocytes en réponse à l'hypoxie.

Dans un troisième chapitre, nous avons élargi l'étude à d'autres types cellulaires, les carcinomes mammaires métastatiques et non-métastatiques 4T1 et 67NR. NEAT1 est induit en corrélation avec l'activation de l'IRES du FGF1 lorsque ces cellules sont soumises à l'hypoxie, suggérant que le rôle de NEAT1 et du paraspeckle dans le contrôle de la traduction concerne l'hypoxie tumorale comme l'ischémie. Ainsi, ces travaux de thèse révèlent le grand potentiel de NEAT1 en tant que nouvelle cible thérapeutique.

Regulation of the translation of (lymph)angiogenic growth factors and role of the non-coding RNA NEAT1 during hypoxic stress

Translation is a highly regulated step of gene expression. During cellular stress, global protein synthesis is blocked but translation of specific subsets of mRNAs is activated by alternative mechanisms. One of these mechanisms involves an RNA structure called IRES (Internal Ribosome Entry Site), that enables the recruitment of the translational machinery in a 5' cap-independent manner. IRES activity is regulated by factors called ITAF (IRES trans-acting factor). Hypoxic stress occurs in different pathologies such as cardiac ischemia and cancer. In response to stress, the cell produces (lymph)angiogenic growth factors that stimulate blood and lymphatic vessel formation, allowing reperfusion of the injured area in ischemic heart, or stimulation of tumor growth and metastatic spread in cancer. My thesis project is focused on identification of ITAF-controlled translation of (lymph)angiogenic growth factor mRNAs during hypoxia. The first part of my thesis addresses translational regulation in hypoxic cardiomyocytes. A semi-global study showed that (lymph)angiogenic genes are mostly regulated at the translational level. Furthermore IRESs of mRNAs coding (lymph)angiogenic growth factors are activated in early hypoxia while IRESs of mRNAs non-related to (lymph)angiogenesis are activated later. Finally, we have identified a new ITAF, vasohibin (VASH1), that specifically activates the FGF1 IRES, but not the other IRES tested. A PCR array study indicates however that VASH1 is able to inhibit or stimulate translation of numerous mRNAs.

Identification of a global mechanism of FGF and VEGF IRES activation is the main focus of the second chapter of my thesis. Considering that VASH1 is not a common ITAF, I searched for new candidates. I started from the observation that another ITAF previously identified in the laboratory, P54nrb, is also a component of the paraspeckle, a nuclear body formed during cellular stress. We make the hypothesis that other paraspeckle components could be ITAFs, particularly the backbone of the paraspeckle, the long non-coding RNA NEAT1. I established a correlation between NEAT1 induction in hypoxia and FGF1 IRES activation in cardiomyocytes. Moreover, NEAT1 depletion leads to inactivation of the FGF1 IRES, suggesting that NEAT1 is an ITAF. I also highlighted that another paraspeckle component, PSPC1, has an ITAF function. Analysis of IRESsome composition by mass spectrometry allowed me to identify three other candidates: hnRNPM, Rps2 and nucleolin. We then expanded the study to the other IRESs studied in chapter 1 and demonstrated that P54nrb and PSPC1 are able to activate several IRES whilst the non-coding RNA NEAT1 is a positive ITAF of all tested IRES. Thus NEAT1 seems to be the key of IRES activation, and confers on the paraspeckle the novel function of assembly platform for IRESsome formation in cardiomyocytes during hypoxia.

In a third chapter, we investigated the same way in other cellular types, metastatic and non metastatic mammary carcinoma 4T1 and 67NR. NEAT1 is induced in correlation with FGF1 IRES activation when the cells are subjected to hypoxia, suggesting that the role of NEAT1 in translational control can be associated to tumoral hypoxia as well as to ischemia. Thus, this work reveal the unique potential of NEAT1 as a therapeutic target.