



HAL
open science

Activité de liaison à l'ARN des protéines de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) dans le mélanome

Sabrina Mennour

► **To cite this version:**

Sabrina Mennour. Activité de liaison à l'ARN des protéines de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) dans le mélanome. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL062 . tel-03917476

HAL Id: tel-03917476

<https://theses.hal.science/tel-03917476>

Submitted on 2 Jan 2023

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.

Activité de liaison à l'ARN des protéines de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) dans le mélanome

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 oncologie : biologie - médecine - santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : université Paris-Saclay, CNRS UMR3348, intégrité du génome,
ARN et cancer, 91401, Orsay Cedex, France
Réfèrent : faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue en visio-conférence totale à Orsay, le
15 décembre 2020, par**

Sabrina MENNOUR

Composition du Jury

Simon SAULE Professeur, Institut Curie, Orsay	Président
Julie PANNEQUIN DR2, IGF, Montpellier	Rapporteur
David GILOT MCU, IGDR, Rennes	Rapporteur
Virginie MIEULET CR1, Institut Curie, Paris	Examinatrice
Stéphan VAGNER DR1, Institut Curie, Orsay	Directeur de thèse
Caroline ROBERT Professeur, Gustave Roussy, Villejuif	Co-directrice de thèse

université
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie: biologie-
médecine-santé (CBMS)



PSL 



Inserm



FONDATION ARC
POUR LA RECHERCHE
SUR LE CANCER 
Reconnue d'utilité publique

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABBREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION	6
I. Les protéines de liaison aux ARN	8
A. Méthode d'étude des interactions ARN-RBP	8
1. Approches expérimentales d'étude des interactions ARN-RBP « ARN centré ».....	9
2. Approches expérimentales « protéine centrée ».....	14
B. Les domaines de liaison à l'ARN	16
1. Domaines canoniques de liaison à l'ARN.....	17
2. Domaines de liaison à l'ARN non conventionnel.....	18
C. RBP et cancer	22
1. L'épissage alternatif.....	23
2. Polyadénylation alternative (APA).....	23
3. Stabilité des ARNm.....	24
4. Localisation subcellulaire.....	24
5. Traduction.....	25
6. Dommages à l'ADN.....	25
II. Les longs ARN non codants	26
A. Fonctions et mécanismes d'action des lncARN	27
1. Interactions avec la chromatine.....	27
2. Interactions avec l'ARN.....	28
3. Interactions avec des protéines.....	28
B. lncARN et cancer	30
1. Insensibilités aux signaux inhibiteurs de croissance.....	31
2. Dérégulation du métabolisme énergétique.....	31
3. Échappement à la destruction par le système immunitaire.....	32
4. Immortalité répliquative.....	32
5. Viabilité.....	33
6. Angiogenèse.....	33
7. Migration — invasion et métastase.....	34
8. Prolifération — Autosuffisance en signaux de croissance.....	34
C. Le <i>scaffolding</i> des lncARN dans les voies de signalisation oncogénique	36
1. Rôle des lncARN dans la détection du signal.....	37
2. Rôle des lncARN dans la transduction du signal.....	38
3. Rôle des lncARN dans la réponse cellulaire.....	40
III. BRAF, acteur central de la voie MAPK au cœur de la résistance aux thérapies ciblées contre le mélanome	41
A. Structure de la protéine BRAF et mutations dans le mélanome cutané métastatique	43
1. Structure.....	43
2. Les mutations de BRAF dans le mélanome cutané métastatique.....	45
B. Thérapies ciblées et mécanismes de résistances	47
1. Thérapies ciblées.....	47
2. Les résistances aux thérapies ciblées dans le mélanome.....	49
PRESENTATION ET OBJECTIF DU PROJET	52
Contexte de l'étude.....	53
Objectif de la thèse.....	54

RESULTATS.....	55
Choix des approches d'étude.....	56
Article	58
Résultats supplémentaires	90
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	96
Des protéines de la voie MAPK sont des protéines de liaison à l'ARN	97
L'activité de liaison à l'ARN de BRAF, un nouveau mécanisme de régulation de l'activité de la voie MAPK	98
Des « hubs » ou « signalling bodies », vers un nouveau mode de régulation dynamique des voies de transduction du signal	102
REFERENCES.....	104
ANNEXE	126

LISTE DES ABBREVIATIONS

2C : *complexe capture*
3'UTR : *3' untranslated region*
ADN : *acide désoxyribonucléique*
AGPC (ou TRIZOL) : *acide guanidinium thiocyanate-phenol chloroform*
ANRIL : *antisens noncoding RNA in the INK4 locus*
ARN : *acide ribonucléique*
 ARN ECT2 : *Epithelial Cell Transforming 2 RNA*
 ARN HOTAIR : *HOX Transcript Antisense RNA*
 ARNm : *ARN messenger*
 ARNm PARG : *poly (ADP-ribose) glycohydrolase mRNA*
 Inc-ARN : *long ARN non codant*
 IncRNA-EGFR : *Inc-epidermal growth factor receptor RNA*
 IncARN IL7R : *interleukin-7 receptor lncRNA*
 IncARN PANDA : *p21 associated ncRNA in DNA damage activated*
 IncARN TERRA : *telomere repeat-containing RNA lncRNA*
 snoRNA : *small nucleolar RNA*
 ARN MAYA : *MST1/2-antagonizing for YAP activation RNA*
 ARN PVT1 : *plasmacytoma variant translocation 1*
ATP : *adénosine triphosphate*
AU (ARE) : *élément riche en AU*
BAP1 : *BRCA1 associated protein 1*
BRK : *breast tumor kinase*
CCNA1 : *Cyclin-A1*
CCNB1 : *Cyclin-B1*
CEPB4 : *cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4*
CLIP : *crosslink and immunoprecipitation*
CPEB1 : *cytoplasmic polyadenylation element binding 1*
CR : *conserved region*
CRD : *Cystéine rich domain*
dsRBD : *double strand break domains*
eIF4F complexe : *eukaryotic initiation factor 4F complexe*
EMT : *transition épithélio-mésenchymateuse*
FMRP : *fragile X mental retardation protein*
GAS5 : *growth arrest-specific 5*
HBXIP : *hepatitis B virus X-interacting protein*
HIF-1 : *hypoxia inducible factor-1*
hnRNPs : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*
hnRNP-K : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*
hnRNPL : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L*
HOTAIR : *HOX Transcript Antisense RNA*
HuR : *human antigen R*
IDR : *intrinsically disordered region*
IMP1 : *IGF2 mRNA-binding protein 1*
KH domain : *« K-homology domain*
KLF5 (protéine) : *Kruppel Like Factor 5*

LRRK2 : *leucine-rich repeat kinase 2*
 LSD1 : *lysine-specific histone demethylase 1A*
 MALAT1 : *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*
 MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
 MDM2 : *mouse double minute 2*
 MEG3 : *maternally expressed gene 3*
 MITF : *microphthalmia-associated transcription factor*
 MS2-bioTRAP : *MS2 in vivo Biotin tagged RBP*
 NKILA : *Nuclear Factor- κ B Interacting lncRNA*
 OOPS : *orthogonal organic phase separation*
 ORF : *open reading frame*
p-bodies : *processing bodies*
 PARP1 : *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*
 PAZ domain : *Piwi/Argonaute/Zwille domain*
 PCR : *polymerase chain reaction*
 RT-qPCR : *reverse transcription quantitative PCR*
 [PDGF]/ PDGFR : *platelet derived growth factor/receptor*
 PIP3 : *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*
 PNK : *polynucleotide kinase*
 PTEN : *phosphatase and tensin homolog*
 PTENP1 pseudogène : *phosphatase and tensin homolog pseudogene 1*
 RAP-MS : *RNA affinity purification*
 RaPID : *RNA proximal protein interaction detection*
 RAT : *RNA affinity in tandem*
 RBD : *ras binding domain*
 RBP : *RNA binding protein*
 RGG : *RG (G) repeats*
 RIC : *RNA interactome capture*
 RIP : *RNA immunoprécipitation*
 RRM : *RNA recognition motif*
 SDA1 : *severe depolymerization of actin protein 1*
 SDS-PAGE : *électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium*
 SR protéine : *Serine And Arginine protein*
 SRSF1 : *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1*
 SYF2 : *Pre-mRNA-splicing factor SYF2*
 TERC : *telomerase RNA component*
 TERT : *telomerase reverse transcriptase*
 TRAPP : *RNA associated protein purification*
 TRIP : *tandem RNA isolation procedure*
 UV-C : *ultraviolet C*
 VEGF/VEGFR : *vascular endothelial growth factor/ receptor*
 XRNAX : *protein crosslink RNA extraction*
 YTH domaine : *YT521-B homology*
 ZEB : *E-box binding homeobox*
 ZnF : *zinc finger domain*
 ZRANB2 : *Zinc Finger RANBP2-Type Containing 2*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration des méthodes « ARN centré » basées sur l'utilisation du crosslink in vivo (RAP, PAIR, MS2-BioTRAP, TRIP).....	10
Figure 2 : Illustration de la méthode RaPID.	11
Figure 3 : Illustration des méthodes « interactome capture ».....	12
Figure 4 : Les méthodes sans exclusion des ARN non polyadénylés.....	14
Figure 5 : Illustration de la technique de CLIP (crosslinking and immunoprecipitation) d'après Ule et al., 2005.....	15
Figure 6 : Pourcentage des différents domaines de liaison à l'ARN retrouvés en RNA-IC d'après Beckmann et al., 2016.....	19
Figure 7 : Méthode d'identification des peptides crosslinkés réadapté de Hentze et al., 2018 ; Kramer et al., 2014.....	19
Figure 8 : Trois classes de régions désordonnées d'après Järvelin et al., 2016.	20
Figure 9 : Mécanismes d'interactions des longs ARN non codants d'après Schmitt and Chang, 2016.....	27
Figure 10 : Les Hallmarks of Cancer d'après Hanahan and Weinberg, 2011.....	30
Figure 11 : Sélection d'exemples de lncARN impliqués dans les hallmarks of cancer d'après Schmitt and Chang, 2016.....	36
Figure 12 : LINK-A joue un rôle dans la prolifération induite par la voie de signalisation HIF1 α dépendante d'après (Lin et al., 2016).	38
Figure 13 : Illustration de l'action de GUARDIN dans la sénescence d'après Sun et al., 2020.	40
Figure 14 : le complexe c-Myc/HBXIP/HOTAIR/LSD1 joue un rôle sur la transcription des cibles de c-Myc.	41
Figure 15 : la voie MAPK	42
Figure 16 : Structure schématique de BRAF.....	44
Figure 17 : Positions des mutations BRAF et sites de phosphorylation d'après Holderfield et al., 2014.....	46
Figure 18 : activation paradoxale de BRAF d'après Holderfield et al., 2014.....	50
Figure 19 : Enrichissement des différentes catégories de « reads » normalisé par la taille du génome	91
Figure 20 et 20 bis : Tableau des candidats sélectionnés pour la visualisation CLIP q-PCR et visualisation des pics de reads.....	91
Figure 21 et 21 bis : Western blot de validation des IP (* bande non spécifique) et résultats de CLIP-qPCR.....	94
Figure 22 : Alignement de séquence des trois isoformes RAF au niveau de la zone C-terminale.....	98
Figure 23 : Interactions des régions désordonnées avec l'ARN (modifié de Järvelin et al., 2016).....	99
Figure 24 : Des hubs à la séparation de phase (d'après Chong et al., 2018).....	101
Figure 25 : Spectre de mutations BRAF dans les cancers (d'après Zaman et al., 2019).....	102

INTRODUCTION

Les cellules sont capables de réagir face à leur environnement par l'intermédiaire des voies de signalisation. En effet, un signal extérieur peut être détecté au niveau de la membrane cellulaire grâce à un récepteur transmembranaire. En aval de ce récepteur, le message relayé par le signal est transmis à travers une cascade de réactions comprenant des interactions protéines-protéines ainsi que diverses phosphorylations. Ce mécanisme, appelé transduction du signal, permet de transporter le message de la membrane jusqu'au noyau, entraînant ensuite un changement dans l'expression des gènes. Ainsi, les cellules peuvent réagir spécifiquement en fonction du signal et s'engager dans des processus de différenciation, de migration, d'apoptose, etc. Ce sont des voies interconnectées très complexes, mais aussi finement régulées. Compte tenu de l'importance des voies de signalisation dans les divers processus cellulaires, il n'est pas surprenant de retrouver ces voies altérées dans de nombreux cancers tels que le mélanome cutané. On y constate principalement des mutations de la protéine BRAF, responsables d'une hyperactivation de la voie de signalisation MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*).

Dans cette introduction, seront tout d'abord présentés les caractéristiques et les rôles des protéines de liaison à l'ARN dans les cancers. Ensuite, les longs ARN non codants et leurs diversités de fonction seront décrits. Enfin, nous aborderons la voie de signalisation MAPK et plus particulièrement la protéine BRAF, acteur central de la voie au cœur de la résistance face aux thérapies ciblées du mélanome cutané.

I. Les protéines de liaison aux ARN

Dans la cellule, les protéines liant l'ARN, appelées RBP (*RNA-binding protein*), sont définies comme étant des protéines indispensables qui accompagnent les ARN en formant des complexes ribo-nucléoprotéiques. Les RBP peuvent contrôler chaque étape de la vie des ARN, de la transcription à la dégradation. En effet, dès leur transcription, les ARN pré-messagers, par exemple, sont pris en charge par des RBP, ce qui entraîne leur maturation en ARN messagers lors des événements d'épissage et de polyadénylation. Les RBP régulent aussi le transport, la localisation, la traduction, la stabilité et la dégradation des différents ARN (ARNm, micro-ARN, lnc-ARN, snoARN, etc.).

Par leurs diverses interactions avec les ARN, les RBP permettent une régulation fine de l'expression des gènes, mais également de l'activité cellulaire globale. En fonction de l'état de la cellule et de son environnement, les interactions ARN-RBP peuvent, entre autres, promouvoir la formation d'organelles telles que les granules de stress ou les *p-bodies* (*processing bodies*).

Des mutations dans les RBP sont susceptibles d'altérer les interactions ARN-RBP et, en conséquence, être à l'origine de nombreuses maladies humaines dont les cancers.

Ce chapitre se concentrera d'abord sur les méthodes d'étude des interactions ARN-RBP, puis les domaines de liaison à l'ARN seront définis et détaillés. Enfin, le rôle des RBP dans les cancers sera exploré.

A. Méthode d'étude des interactions ARN-RBP

Afin d'étudier les interactions ARN-protéine, il convient, dans un premier temps, de choisir une approche qui sera soit centrée sur un ARN d'intérêt, soit sur une protéine d'intérêt. Le choix, qui se fait en fonction de la question biologique et des connaissances de l'étude, conditionne les techniques qui seront utiles à cette dernière. En effet, s'il se porte sur l'examen des interactions ARN-protéine à partir d'un ARN d'intérêt, alors les techniques utilisées permettront de savoir quelles RBP se lient à cet ARN. À l'inverse, si la protéine est au centre de l'étude, la question sera de savoir quels ARN interagissent avec cette RBP. Ces

approches complémentaires ont apporté les connaissances que nous avons sur les interactions ARN-protéine.

Historiquement, les premières RBP ont pu être caractérisées grâce à des études biochimiques basées sur l'utilisation d'irradiations UV-C à 254 nm, qui permettent, *in vivo*, l'établissement d'un pont covalent irréversible appelé *crosslink* entre les ARN et les protéines interagissant de manière directe (Greenberg, 1979). Ainsi, *in vivo*, les interactions ARN-protéine sont figées après traitement aux UV-C 254nm ; les interactions protéines-protéines ne sont, quant à elles, pas impactées.

Les UV-C 254 nm ont une préférence de *crosslink* des uridines (Smith and Meun, 1968) et, en conséquence, l'efficacité du *crosslink* peut donc varier selon les acides aminés (Hockensmith et al., 1993). Il faut noter que d'autres types de *crosslinks* tels que le *crosslink* formaldéhyde ou le *crosslink* 4—SU (4—thiouridine) sont susceptibles d'être utilisés pour visualiser des interactions ARN-RBP. Ces *crosslinks* ont certains avantages (comme une meilleure efficacité), mais aussi des inconvénients (une toxicité cellulaire assez importante avec l'incorporation du 4—SU, et un *crosslink* protéine-protéine pour le formaldéhyde). Ils ne seront pas abordés dans cette introduction.

Au sein de cette partie, nous évoquerons les approches d'étude des interactions ARN-RBP à partir d'un ARN d'intérêt qu'on appellera « ARN centré », puis les approches d'étude à partir d'une protéine d'intérêt ou « protéine centrée ».

1. *Approches expérimentales d'étude des interactions ARN-RBP «ARN centré»*

La majorité des méthodes se focalisant sur l'ARN exploite la capacité de ce dernier à agir comme un appât pour ensuite capturer et caractériser toutes les protéines se liant à lui grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse ou, dans une moindre mesure, du western blot.

L'approche RAT (*RNA affinity in tandem*), par exemple, repose sur l'expression *in vivo* d'un ARN tagué, qui, dans la cellule, va interagir avec ses partenaires protéiques (Hogg and Collins, 2007). L'irradiation aux UV-C 254nm permet de figer les interactions ARN-protéines. Les complexes ARN-protéines seront alors purifiés grâce au tag. De cette façon, les protéines peuvent être identifiées par spectrométrie de masse.

Plus récemment, des approches telles que le RAP-MS (*RNA affinity purification*), MS2-bioTRAP (*MS2 in vivo Biotin tagged RBP*) et TRIP (*tandem RNA isolation procedure*) ont été

établies. Ces techniques semblables au RAP ont leurs propres particularités expérimentales concernant la purification des ARN et des complexes ARN-protéines. En effet, dans certains cas, comme le MS2-BioTRAP ou encore le TRIP, des sondes biotinylées comportant des oligonucléotides antisens de l'ARN d'intérêt sont utilisées pour faire une purification par billes de streptavidine (figure 1).

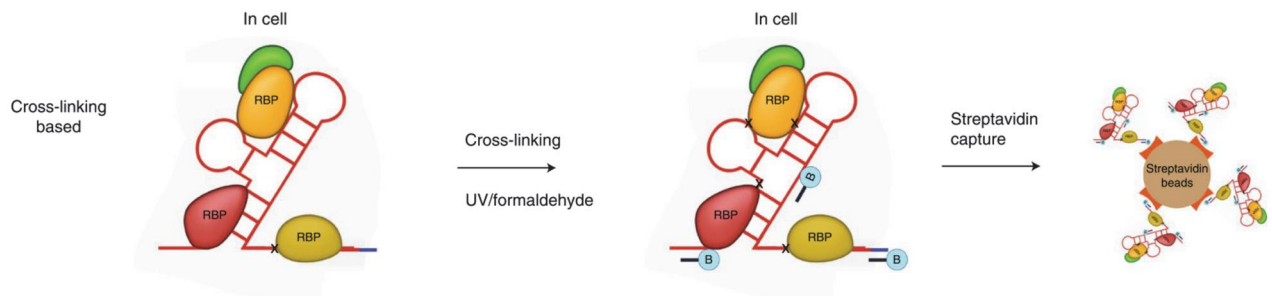


Figure 1 : Illustration des méthodes « ARN centré » basées sur l'utilisation du crosslink in vivo (RAP, PAIR, MS2-BioTRAP, TRIP).

Les sondes oligonucléotidiques biotinylées sont hybridées à l'ARN d'intérêt, et l'ARN et les protéines crosslinkées sont purifiés pour une analyse en aval (d'après Ramanathan et al., 2019).

D'autres techniques ne reposant pas sur l'utilisation de crosslink existent également. Le crosslink aux UV-C est très utile puisqu'il a une spécificité de crosslink des interactions ARN-protéines, au contraire du crosslink formaldéhyde. Cependant, il est important de souligner que l'efficacité du crosslink UV-C est très faible et peut dépendre des acides aminés présents dans la RBP et de la structure de l'ARN lié. D'ailleurs, pour rappel, il a été montré que les uridines ont une efficacité de crosslink plus importante et que les ARN double brins sont très peu crosslinkés. Cependant, les connaissances sur l'efficacité du crosslink UV-C restent assez faibles ; c'est la raison pour laquelle il peut être intéressant de tester des approches ne nécessitant pas l'utilisation de crosslink UV-C. C'est le cas de plusieurs techniques telles que RaPID (*RNA proximal protein interaction detection*) qui repose sur les propriétés de la ligase biotine « Bir A » d'*E. Coli (Escherichia coli)* à pouvoir biotinyler les protéines à proximité (Ramanathan et al., 2018). L'ARN d'intérêt est tagué par un aptamer appelé « boxB » qui rend possible le recrutement de la ligase modifiée Bir-A appelée « λ N-HA-BirA* ». La liaison BoxB- λ N-HA-BirA* permet à cette dernière de biotinyler les protéines à proximité de la région ARN d'intérêt. Une capture de ces protéines marquées est alors faisable à l'aide de billes de

streptavidine (figure 2). On peut ensuite réaliser une identification par Western Blot ou spectrométrie de masse des protéines biotinylées.

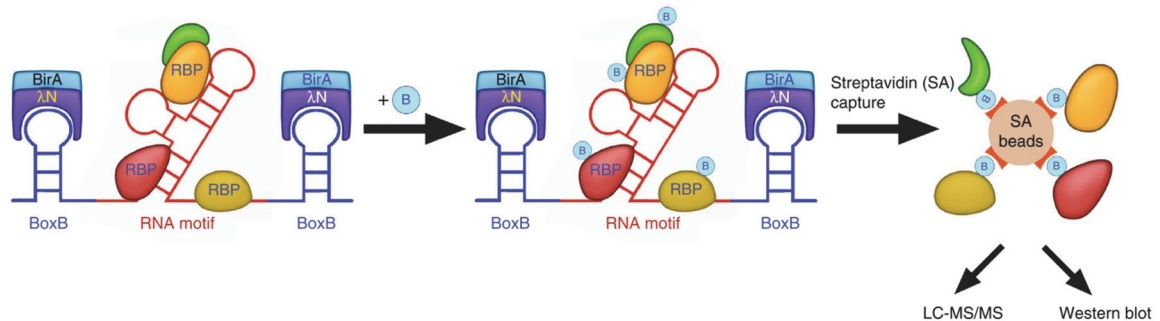


Figure 2 : Illustration de la méthode RaPID.

L'ARN BoxB (bleu) est situé de part et d'autre de la séquence de l'ARN d'intérêt (rouge). La liaison de la protéine de fusion RaPID (λ N — HA-BirA*) aux sites BoxB conduit à la biotinylation des protéines proximales à la séquence d'ARN dans les cellules vivantes cultivées dans des milieux contenant de la biotine. Les billes de streptavidine (SA) permettent de capturer les protéines biotinylées pour une identification par spectrométrie de masse ou par western blot (d'après Ramanathan et al., 2018).

L'ensemble de ces techniques a permis d'établir une liste de RBP d'environ 500 protéines et de mettre en évidence la présence de différents domaines de liaison à l'ARN partagés par ces différentes RBP.

Cependant, toutes ces techniques nécessitent la connaissance de l'ARN d'intérêt, ce qui pose une réelle limitation concernant les études à grandes échelles de découverte des RBP. Récemment, des techniques ont tenté de surmonter cette limitation afin d'établir une liste de RBP plus exhaustive à l'aide d'approches appelées « *interactome capture* » (*RNA interactome capture* : RIC et *serial interactome capture* : SerIC) (figure 3). Les groupes de Matthias W. Hentze, de Ulf Andersson Ørom et de Markus Landthaler ont, en effet, de façon assez similaire, utilisé la propriété des ARNm et de quelques ARN non codants à être polyadénylés. La présence de queue poly-A rend possible la purification d'un grand nombre d'ARN grâce à des billes poly d-T (Baltz et al., 2012 ; Castello et al., 2012 ; Conrad et al., 2016). Une étape protéomique de spectrométrie de masse permet ensuite d'identifier à grande échelle toutes les RBP liant ces ARN polyadénylés. Ces approches ont démontré que la liste des RBP connues à ce jour était fortement sous-estimée et qu'il existait un grand nombre de RBP non conventionnelles, c'est-à-dire ne possédant pas de domaine de liaison canonique à l'ARN (cette partie sera détaillée dans le point b). Grâce au RIC, environ 800 RBP ont pu être cataloguées, incluant les RBP classiques possédant des domaines de liaison à l'ARN. Mais de

façon intéressante, environ la moitié des RBP découvertes ne possèdent pas de domaines de liaison à l'ARN connus et certaines n'ont même aucun lien avec la biologie des ARN. D'après la *gene ontology*, elles sont appelées des « enigmRBP » (Beckmann et al., 2015). Les fonctions et rôles biologiques principaux de ces dernières sont, entre autres, en lien avec le métabolisme, la progression dans le cycle cellulaire ou la réponse antivirale. Cela suggère qu'il reste encore beaucoup de domaines à explorer afin de mieux comprendre les interactions ARN-protéines et que la liste des RBP n'est probablement pas encore complète. D'ailleurs, en 2014, le groupe de Thomas Tuschl a réalisé une étude basée sur un ensemble de données collectées par les différentes études à grande échelle utilisant des techniques modernes telles que le séquençage et la spectrométrie de masse. Ce groupe a démontré l'existence de 1 542 RBP dans les cellules humaines (Gerstberger et al., 2014).

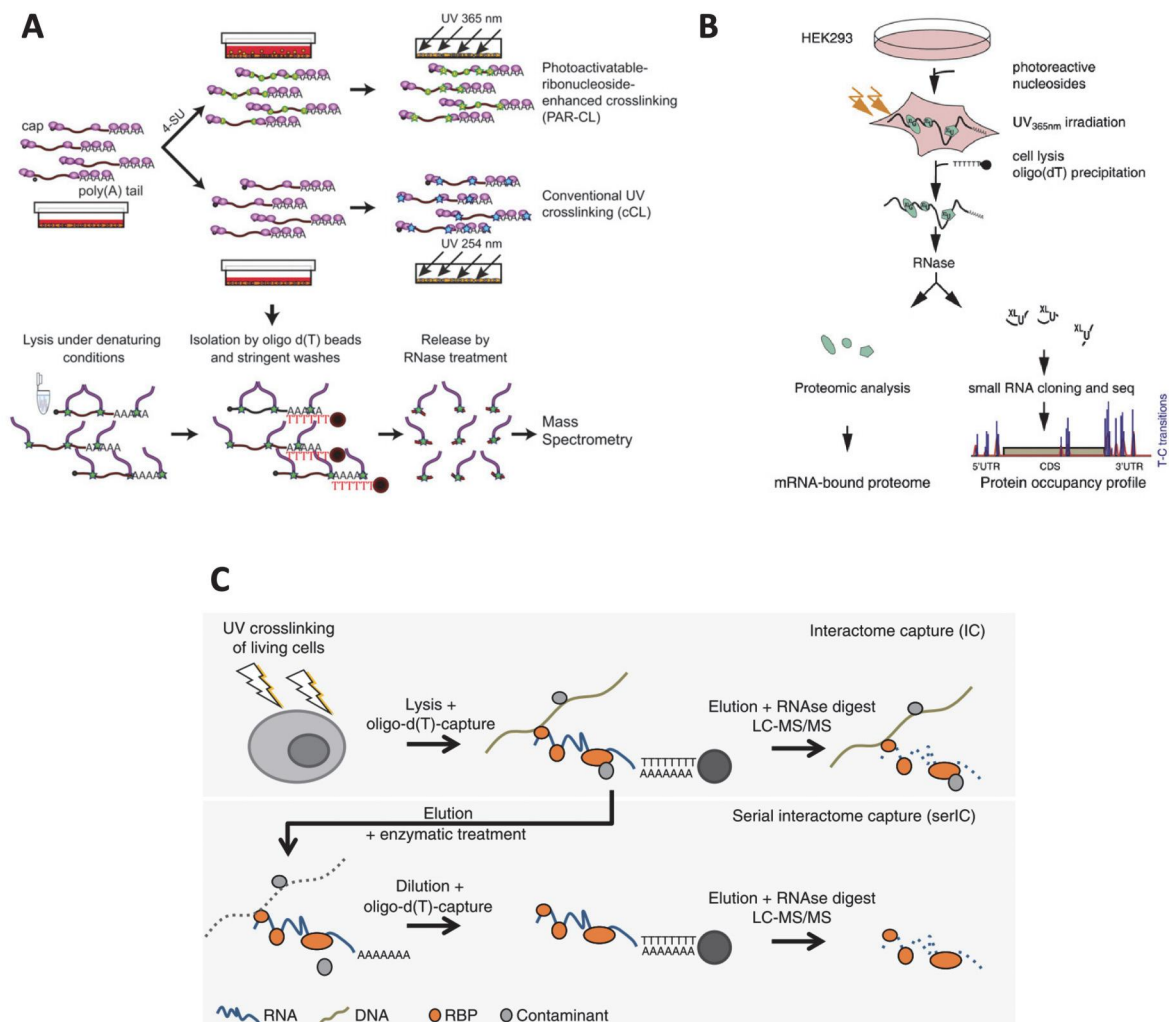


Figure 3 : Illustration des méthodes « interactome capture ».

A. RNA interactome capture (RIC) d'après Castello et al., 2012. B. RNA-IC d'après Baltz et al., 2012. C. Serial interactome capture (serIC) d'après Castello et al., 2016.

Ces observations à grande échelle ont permis l'étude des protéines liées aux ARNm principalement. Cependant, qu'en est-il des protéines interagissant avec des ARN ne possédant pas de queue poly-A comme la plupart des ARN non codants ?

Dès 2018, les chercheurs ont voulu surmonter cette limite à travers différentes méthodes. Le groupe de Matthias Hentze a choisi d'utiliser la capacité des colonnes de silice à retenir spécifiquement l'ARN grâce à leurs propriétés physico-chimiques (figure 4.A). Par conséquent, lors de l'irradiation des cellules aux UV-C 254 nm, les interactions protéines-ARN sont figées et les ARN pourront être purifiés sur la colonne de silice, mais également les complexes ARN-protéines crosslinkés. Cette technique est appelée « 2C » pour « *complexe capture* » (Asencio et al., 2018). Il est alors possible de valider par Western Blot la présence de RBP ou même d'envisager une étape de spectrométrie de masse afin d'identifier l'ensemble des RBP « capturées » par 2C.

En 2019, le groupe de David Tollervey a utilisé une technologie similaire appelée « TRAPP » (*RNA associated protein purification*) pour purifier les ARN à l'aide de billes de silice et ainsi identifier des RBP chez la levure *S. Cerevisiae* (*Saccharomyces Cerevisiae*) et chez la bactérie *E. Coli*.

Pour finir, en 2019, deux équipes, celles de Kathryn S Lilley et de Jeroen Krijgveld, ont développé des techniques originales appelées respectivement « OOPS » (*orthogonal organic phase separation*) (figure 4.B) et « XRNAX » (*protein crosslink RNA extraction*) (Queiroz et al., 2019 ; Trendel et al., 2019). Ces techniques reposent sur la propriété de l'acide *guanidinium thiocyanate-phenol chloroform* (AGPC, aussi appelé TRIZOL) à induire une séparation de phase d'un lysat cellulaire. La phase aqueuse supérieure contient les ARN tandis que la phase inférieure organique contient les protéines. Les complexes ARN-protéines crosslinkés quant à eux répondent aux propriétés physico-chimiques des deux groupes et ainsi se retrouvent à l'interphase entre la phase aqueuse et la phase organique. La purification de l'interphase permet de récupérer les complexes RBP-ARN, les RBP pourront alors être identifiées par spectrométrie de masse ou Western Blot.

Ces techniques ont l'avantage de ne pas exclure les ARN non polyadénylés ; ainsi, à l'heure actuelle, on estime le nombre de RBP à environ 2 000, ce qui souligne la complexité et la diversité des interactions ARN-protéines (Corley et al., 2020). De nombreuses études restent à venir afin de valider ce nombre et de comprendre les différentes interactions des complexes ARN-protéines.

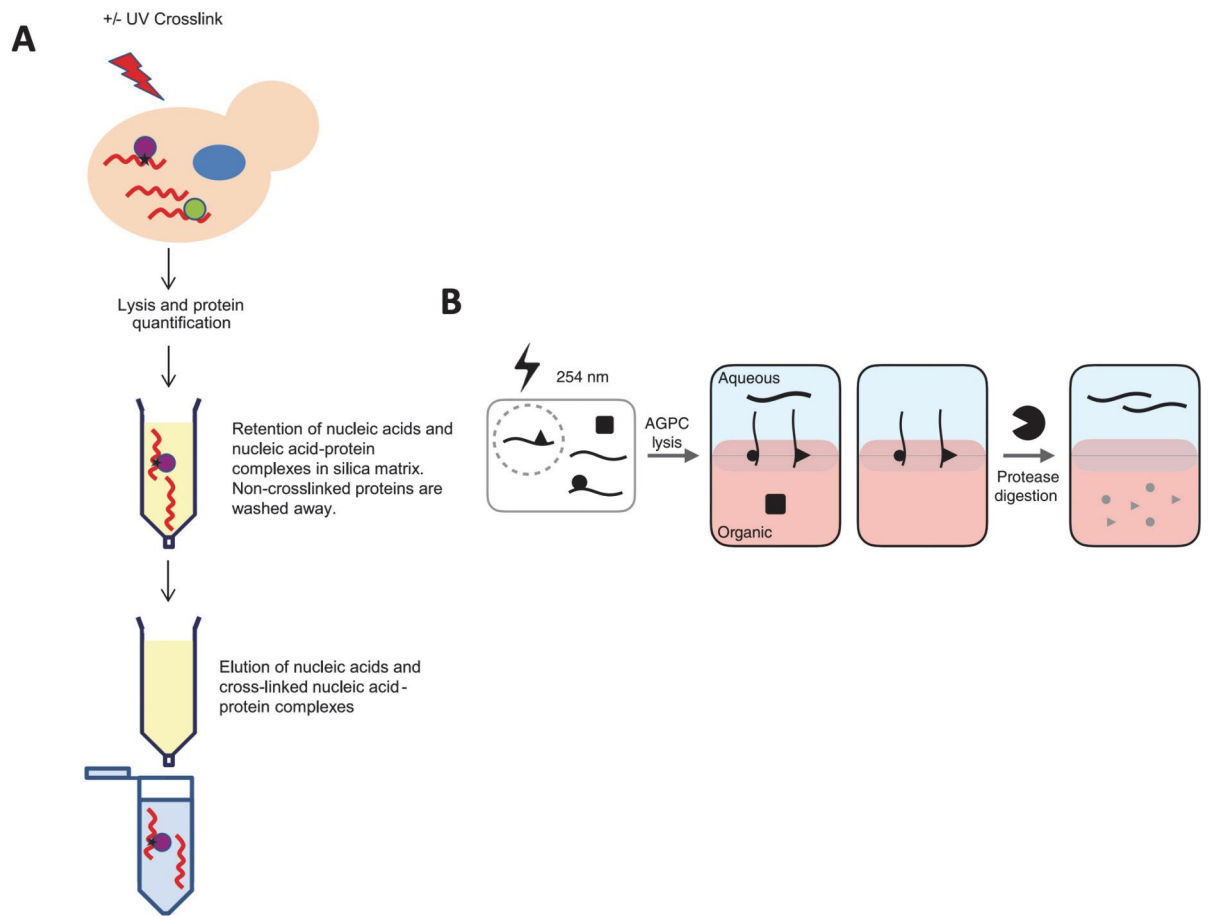


Figure 4 : Les méthodes sans exclusion des ARN non polyadénylés.

A. Complexe Capture (C) d'après Asencio et al., 2018. B. orthogonal organic phase separation (OOPS) d'après Queiroz et al., 2019.

2. Approches expérimentales « protéine centrée »

Les approches « protéine centrée » reposent sur des techniques d'immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine étudiée. L'immunoprécipitation est suivie d'une purification et d'une détection des ARN interagissant avec cette protéine d'intérêt, notamment par séquençage ou par RT-qPCR. Ces techniques font souvent suite aux techniques à grande échelle détaillées précédemment puisqu'elles servent à valider ces résultats obtenus.

Une des premières techniques utilisées a été le « RIP » (*RNA immunoprecipitation*). Le RIP offre la possibilité, dans des conditions natives, d'immunoprécipiter une protéine d'intérêt à l'aide de lavages peu stringents permettant de préserver les complexes ARN-protéines. Ensuite, une étape de purification par précipitation des ARN suivie d'une préparation de

banque est réalisée afin d'envoyer ces ARN au séquençage qui mènera à une identification à grande échelle. Les ARN identifiés doivent alors être validés, principalement par RT-qPCR. Cette étape de validation est assez importante en raison de la possibilité de détecter des interactions non spécifiques qui se formeraient dans le lysat en solution.

Cette problématique est abolie lorsque le RIP est effectué après irradiation des cellules aux UV-C. C'est ce qu'on appelle le CLIP (*CrossLink and ImmunoPrecipitation*) (figure 5). Cette approche, développée en 2003 par le groupe de Rober B. Darnell, utilise la capacité des UV-C 254 nm à créer des pontages covalents entre les protéines et ARN en contact direct (Ule et al., 2003, 2005). Cela permet de faire des lavages très stringents sans risque de perdre l'interaction ARN-protéine au contraire du RIP classique.

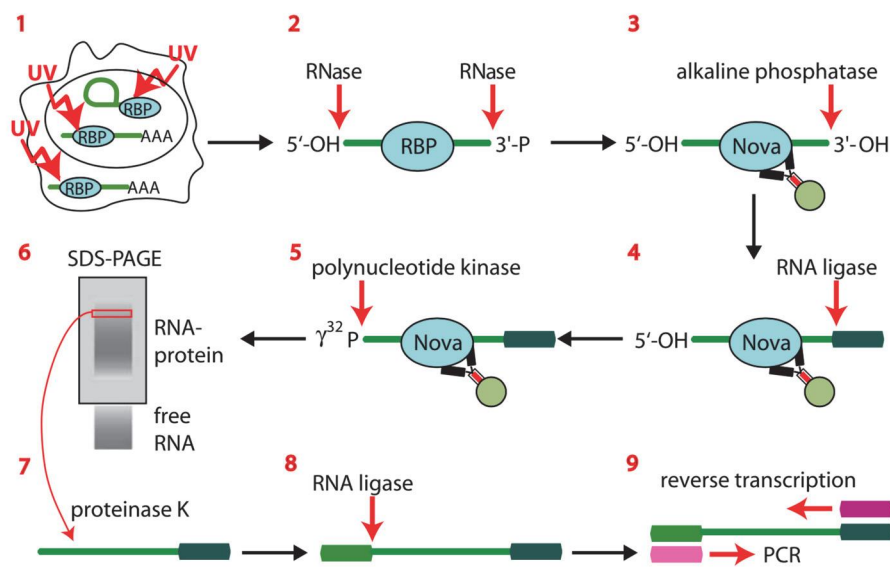


Figure 5 : Illustration de la technique de CLIP (crosslinking and immunoprecipitation) d'après Ule et al., 2005

Cette approche de CLIP est couramment utilisée par un grand nombre de laboratoires étudiant les RBP. Il s'agit d'une technique assez rapide qui peut apporter plusieurs réponses suivant l'orientation choisie. Tout d'abord, grâce à elle, il est possible de démontrer une interaction avec l'ARN qu'il soit connu ou non. En effet, après *crosslink* UV-C 254 nm des cellules *in vivo*, une lyse cellulaire est faite. Ce lysat cellulaire sera alors soumis à une digestion partielle à la RNase, puis mis en contact d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt préalablement couplé à des billes magnétiques. L'immunoprécipitation est alors réalisée sous conditions stringentes. Un traitement à la polynucléotide kinase T4 permet le marquage radioactif au P^{32} de l'extrémité 5' des ARN du complexe ARN-protéine immunoprécipité. Ce

complexe est ensuite élué et déposé sur gel SDS-PAGE en condition dénaturante. Après la migration, un transfert sur membrane nitrocellulose est réalisé, et il est possible de visualiser le complexe par autoradiographie, mais aussi d'isoler et de purifier ces ARN. Un séquençage de ces ARN après une étape de préparation d'une banque d'ADNc est alors faisable. C'est ce qu'on appelle « CLIP-Seq ». Par ailleurs, de la même manière que pour le RIP-qPCR, si les cibles ARN sont connues ou en cours d'investigation, il est envisageable de purifier les ARN après immunoprécipitation de la protéine d'intérêt et de valider la présence, ou absence, des ARN cibles par RT-qPCR : c'est le CLIP-qPCR. Par conséquent, avec cette technique de CLIP, nous pouvons valider l'activité de liaison à l'ARN d'une protéine, mais également identifier les ARN qui interagissent avec cette protéine d'intérêt.

Néanmoins, la complexité des étapes de préparation des banques et l'analyse bio-informatique qui en suit fait de cette technique une approche nécessitant de nombreux processus d'optimisation. C'est la raison pour laquelle, au cours des années, différents protocoles basés sur le CLIP original ont été publiés présentant chacun des avantages et inconvénients : PAR-CLIP, HITS-CLIP, irCLIP, eCLIP, dans le but d'améliorer le *crosslink*, d'optimiser la préparation des banques, etc. Ces nouveaux protocoles sont discutés dans la revue « *Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions* » de Flora C.Y. Lee et Jernej Ule (Lee and Ule, 2018).

Par ailleurs, il est important de souligner que le choix de la technique de CLIP doit être conditionné par l'existence d'un bon anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Si ce n'est pas le cas, il faut mettre en place l'expression d'un transgène tagué afin de pouvoir réaliser un CLIP.

B. Les domaines de liaison à l'ARN

La combinaison des différentes approches décrites précédemment a permis la mise en évidence d'environ 2 000 RBP (Corley et al., 2020). Parmi ces différentes protéines, certaines possèdent des domaines de liaison à l'ARN retrouvés de façon assez semblable, voire identique, sur plusieurs RBP. Ces domaines sont appelés « domaines canoniques de liaison à l'ARN ». D'autres domaines, plus rares et découverts récemment, sont quant à eux appelés « domaines non canoniques de liaison à l'ARN ». Dans cette partie, nous développerons

quelques domaines canoniques les plus connus et nous aborderons les domaines de liaison non canoniques ainsi que les nouveaux modes d'interactions avec l'ARN.

1. Domaines canoniques de liaison à l'ARN

Le domaine RRM « RNA recognition motif »

Ce domaine de liaison à l'ARN est le plus abondant et le plus classique, il est retrouvé chez un très grand nombre de RBP (Gerstberger et al., 2014). Chaque RRM comporte 90 acides aminés, dont deux régions sous motifs RNP1 et RNP2 composées de 8 acides aminés ayant la séquence consensus suivante : (R/K) — G — (F/Y) — (G/A) — (F/Y) — V-X — (F/Y) pour RNP1 et 6 acides aminés pour RNP2 (L/I) — (F/Y) — (V/I) — X — (N/G) — L (Maris et al., 2005). Le domaine RRM se structure en 4 feuillets β antiparallèles flanqués par deux hélices α . Le domaine RNP1 constitue le feuillet β_3 tandis que le RNP2 constitue le feuillet β_1 . Grâce à cette structure, le domaine RRM est capable de reconnaître 4 à 8 nucléotides. Très souvent, les protéines possèdent plusieurs domaines RRM, ce qui permet d'atteindre une spécificité d'interaction avec un ARN.

Le domaine KH « K-homology domain »

Le domaine KH est un domaine comportant 70 acides aminés. Il porte ce nom, car il a été initialement découvert chez la protéine hnRNP-K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) dans les années 1990 (Siomi et al., 1993). Deux types de domaines KH partagent la même structure centrale $\beta\alpha\beta$, mais le domaine KH de type I présente en C-terminal une addition d'un feuillet $\alpha\beta$ alors que, pour le type II, cette addition se retrouve en N-terminal (Valverde et al., 2008). De plus, ce domaine présente un motif de boucle conservé « GXXG ». Tout cela permet la reconnaissance de 4 nucléotides grâce à la structure en poche que forme ce domaine. Ces interactions se font grâce à des liaisons hydrogènes et électrostatiques. Néanmoins, de ce fait, ce sont des interactions faibles et labiles. C'est pourquoi, en général, lorsque ce domaine permet l'interaction à l'ARN on le retrouve souvent en répétitions. C'est cela qui rend possible une synergie d'action et donc une efficacité d'interaction avec l'ARN.

Le domaine DEAD-Box « Dead Box Helicases Domain »

Le domaine DEAD-box est retrouvé chez la superfamille des DEAD-box hélicases. Ce domaine se définit par la présence d'au moins 12 motifs de séquences localisées à des positions conservées dans la plupart de ces hélicases, et l'un de ces motifs conservés est le motif d'acides aminés Asp-Glu-Ala-Asp, d'où le nom DEAD. Ces hélicases jouent un rôle central dans le métabolisme de l'ARN puisqu'elles sont impliquées dans les mécanismes d'initiation de la traduction, mais aussi dans la machinerie du splicéosome (Linder and Jankowsky, 2011). Les études structurales montrent que toutes les protéines de la famille DEAD-box interagissent avec l'ARN suivant un mécanisme très conservé parmi les différentes espèces : elles entrent en contact direct avec le squelette phosphate de l'ARN (Del Campo and Lambowitz, 2009).

Il faut noter que ces exemples ne sont pas exhaustifs et qu'il existe d'autres domaines de liaison à l'ARN conventionnel tels que le domaine ZnF (*zinc finger domain*), le dsRBD (*double strand break domain*), le PAZ domaine (*Piwi/Argonaute/Zwille domain*), etc.

En outre, ces dernières années, les techniques à grande échelle d'étude des RBP ont permis de montrer que certaines interactions ARN-protéines complexes ne nécessitent pas la présence de domaines RBD conventionnels.

2. Domaines de liaison à l'ARN non conventionnel

En 2012, la moitié des RBP retrouvées dans les études à grande échelle de Hentze et Landthaler présentait une absence de domaine de liaison à l'ARN conventionnel (figure 6) (Beckmann et al., 2016), ce qui soulève automatiquement la question : comment interagissent-elles avec l'ARN ?

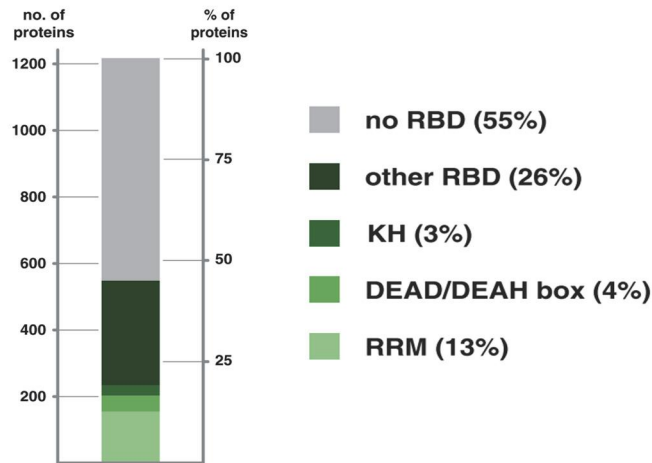


Figure 6 : Pourcentage des différents domaines de liaison à l'ARN retrouvés en RNA-IC d'après Beckmann et al., 2016

Des études de mutagenèse suivie de CLIP couplée à un marquage PNK peuvent être envisagées afin de déterminer précisément la zone d'interaction avec l'ARN pour ces RBP non conventionnelles. Ces méthodes de « *trial and error* » fonctionnent à l'échelle d'une protéine unique.

En 2014, Katharina Kramer et ses collaborateurs ont développé, chez l'humain et chez la levure, une approche à grande échelle permettant la purification et la détection des peptides crosslinkés à l'ARN par spectrométrie de masse grâce au développement de leur logiciel RNP^{xl} (Kramer et al., 2014). En effet, après *crosslink* aux UV-C 254 nm, l'interaction protéique-ARN est figée. Cela engendre une différence de masse sur les peptides crosslinkés dû à l'ARN crosslinké. Cette différence de masse est détectée lors de l'analyse des données de spectrométrie de masse par l'outil informatique RNP^{xl}, ce qui rend possible une localisation très précise du site de *crosslink* (figure 7).

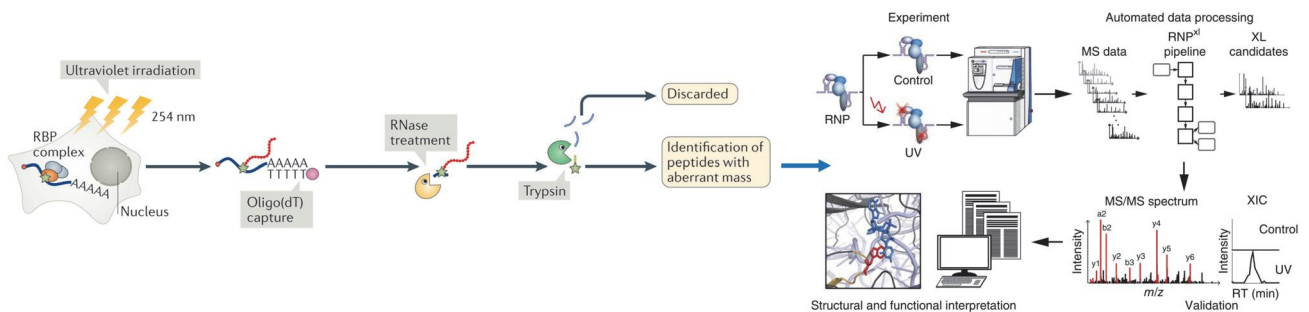


Figure 7 : Méthode d'identification des peptides crosslinkés réadapté de Hentze et al., 2018 ; Kramer et al., 2014.

Régions intrinsèquement désordonnées

Ces techniques d'étude des régions crosslinkées (Kramer et al., 2014), ainsi que les approches similaires plus récentes de RBD-map (Castello et al., 2016), ont démontré que de nombreuses régions de liaison à l'ARN identifiées sont des régions appelées régions désordonnées (ou IDR pour *intrinsically disordered regions*). Une région désordonnée est une région d'au moins 30 acides aminés peu structurée et donc de conformation plus ou moins instable. Cela est dû à une faible complexité de séquence et à un biais dans la séquence en acides aminés avec un enrichissement en acide aminé à haut point moléculaire et de faible hydrophobicité (Uversky, 2019). En effet, les acides aminés suivants promeuvent la formation de régions désordonnées : sérine, glycine, proline, lysine, arginine, aspartate, glutamate et tyrosine (Järvelin et al., 2016 ; Campen et al., 2008 ; Kumari et al., 2015).

Les répétitions d'acides aminés RS pour arginine-sérine (*RS repeats*), mais aussi arginine-glycine, appelées également RGG (*RG (G) repeats*) ainsi que les patches KH lysine-arginine (*KR basic patch*) sont les principales régions désorganisées connues. Il est intéressant de noter que ces régions désorganisées sont parfois retrouvées associées à des domaines de liaisons canoniques dans les protéines de liaison conventionnelles (figure 8).

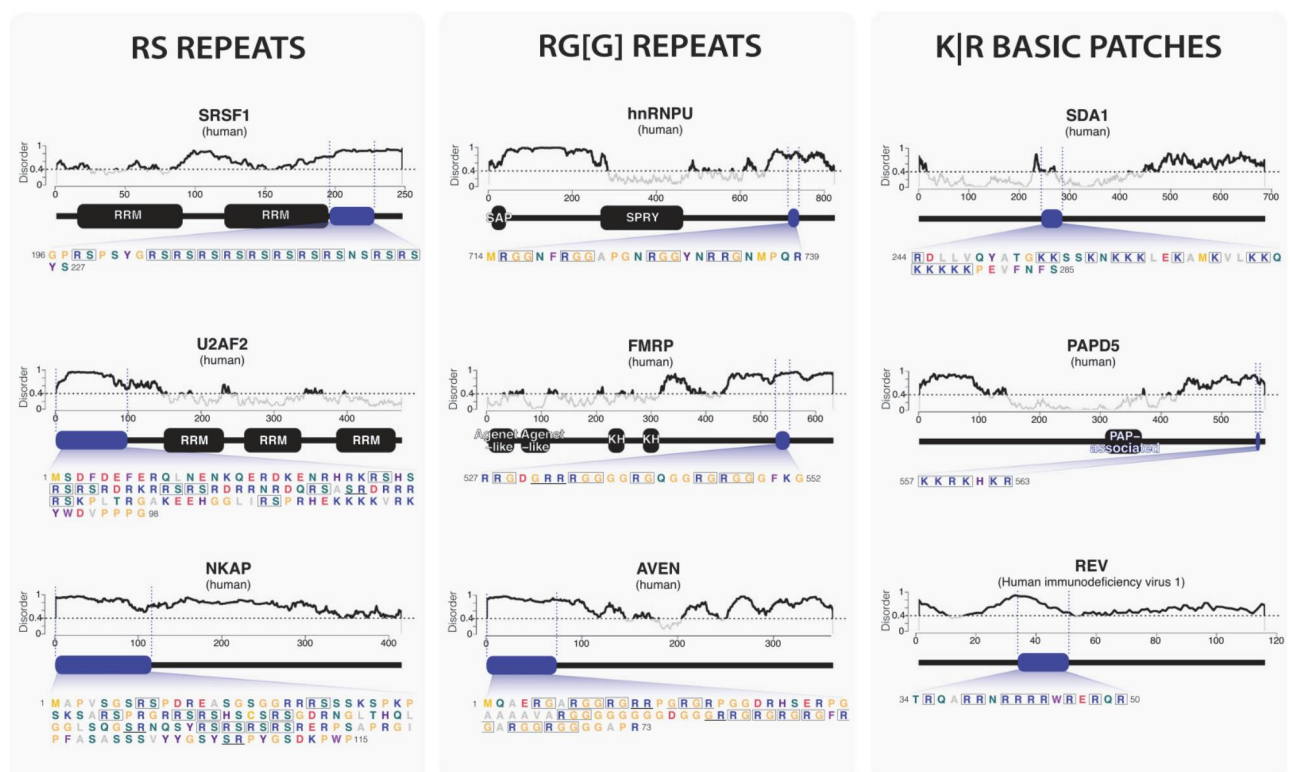


Figure 8 : Trois classes de régions désordonnées d'après Järvelin et al., 2016.

Les répétitions RS sont par exemple retrouvées sur les protéines de la famille SR telles que SRSF1 (*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1*), facteur d'épissage des ARN pré-messagers (Long and Caceres, 2009; Shepard and Hertel, 2009). Ces protéines contiennent des domaines RRM en N-ter et un domaine constitué de répétitions RS en C-ter pouvant interagir directement avec l'ARN (Jeong, 2017). L'efficacité de l'épissage dépend alors de la taille du motif RS et de sa phosphorylation. En effet, cela permet un changement de conformation d'une structure désordonnée à une poche en arche qui influe sur l'efficacité de la liaison à l'ARN. On retrouve également des séquences RS répétées chez les protéines virales, telles que la nucléocapside du coronavirus (SARS-CoV). Cette protéine utilise sa région désordonnée riche en répétitions RS en collaboration avec ses autres domaines de liaison à l'ARN afin de recruter l'ARN viral et de former des virions (Chang et al., 2009).

La répétition RG(G), appelée aussi *RGG box* ou GAR, est un motif retrouvé fréquemment dans les RBP dont les propriétés de liaison à l'ARN sont peu définies ; il semblerait que ce soit un motif dont l'affinité de liaison est dépendante de la séquence et de la structure de l'ARN lié. Par exemple, la protéine FMRP (*fragile X mental retardation protein*) interagit avec sa cible ARN sc1 par l'intermédiaire de son domaine RGG qui reconnaît particulièrement la structure en G-quadruplex de l'ARN cible (Phan et al., 2011). Cette affinité particulière permet la formation d'une interaction par reconnaissance de structure et non d'une séquence particulière.

Les segments K/R, quant à eux, sont constitués de 4 à 8 lysines ou parfois arginines, formant une interface fortement positive. Sur les RBP, ces patchs K/R sont retrouvés à diverses et multiples positions et forment des îlots flanquant souvent les domaines globulaires (Järvelin et al., 2016). Cela suggère une coopération fonctionnelle entre les régions formant des structures organisées et les régions intrinsèquement désordonnées. Par exemple, la région C-ter de la protéine SDA1 (*severe depolymerization of actin protein 1*) est constituée de 45 acides aminés dont 15 lysines. Des études *in vivo* ont montré que son efficacité de liaison à l'ARN était aussi forte que celle des régions RRM (Strein et al., 2014). Le mécanisme d'interaction des segments K/R reste cependant encore assez flou (Castello et al., 2012).

Ces domaines intrinsèquement désordonnés se distinguent particulièrement par leur interaction à l'ARN malléable contrairement aux domaines de liaison à l'ARN classiques qui font souvent appel à une séquence spécifique.

Autres domaines de liaison à l'ARN non classiques

Les techniques d'étude des régions crosslinkées (Kramer et al., 2014), ainsi que les approches similaires plus récentes de RBD-map (Castello et al., 2016), ont également permis de mettre en évidence une représentation assez importante de quelques domaines de liaisons à l'ARN non classiques qui restent à ce jour encore peu étudiés, tels que le domaine YTH (*YTH521-B homology*) (Zhang et al., 2010), ou le domaine SM (Achsel et al., 2001) ou encore le domaine WD40. Ce dernier est par exemple retrouvé dans la protéine Gemin5 et permet son interaction avec l'ARN (Lau et al., 2009).

De plus, environ la moitié de l'interactome de l'étude de Hentze montre une absence de RBD connus (Castello et al., 2012) (figure 6). Cela souligne les challenges futurs pour essayer de comprendre ce que sont ces domaines non classiques, mais aussi le rôle de ces RBP non conventionnelles.

C. RBP et cancer

Les RBP jouent un rôle majeur dans les différents processus cellulaires de la vie des ARN tels que la transcription, le splicing, la stabilité, le transport, la traduction ou encore la dégradation. Compte tenu de leur importance, il n'est pas surprenant de voir que des mutations ou une altération de l'expression des RBP peuvent mener à diverses maladies dont, plus particulièrement, les cancers.

Des études récentes montrent qu'une expression aberrante, un changement de localisation ou encore des modifications post traductionnelles des RBP peuvent contribuer à une tumorigenèse, non seulement en augmentant l'expression d'oncogènes, mais également en diminuant l'expression des gènes suppresseurs de tumeur (Mohibi et al., 2019). Par ailleurs, les RBP sont également capables de moduler de nombreux processus favorisant la progression tumorale (les *hallmarks of cancer*) telle que la prolifération, l'échappement à la mort cellulaire, l'invasion, la migration et l'angiogenèse. Dans cette partie, seront développés quelques mécanismes moléculaires expliquant les différentes actions des RBP dans les cancers.

1. L'épissage alternatif

L'épissage alternatif est un mécanisme vital contribuant à la diversité protéique. Les protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) et SR sont les principaux acteurs et régulateurs de l'épissage.

Ces RBP sont fréquemment retrouvées mutées et exprimées de façon aberrante dans de nombreux cancers, suggérant que leur fonction de facteur d'épissage a un rôle particulièrement important dans la progression tumorale et dans la résistance aux traitements anticancéreux (Qin et al., 2020).

Très récemment, notre équipe a montré que ZRANB2 (*Zinc Finger RANBP2-Type Containing 2*) et SYF2 (*Pre-mRNA-splicing factor SYF2*), facteurs d'épissage, entraînent un épissage alternatif de l'ARN ECT2 (*Epithelial Cell Transforming 2*), et génèrent un variant d'ARN qui inclut l'exon 5. Ce variant d'épissage joue un rôle dans la résistance à la doxorubicine dans les cancers du sein. Déplété spécifiquement, cet isoforme réduit la résistance à la doxorubicine dans des tumeurs de souris xénograpes (Tanaka et al., 2020).

2. Polyadénylation alternative (APA)

Les RBP sont en charge du processus d'addition de la queue poly A de la plupart des ARNm en position 3'. Cette queue poly-A joue un rôle important dans la stabilité des transcrits, mais aussi dans leur diversité. En effet, de façon similaire à l'épissage alternatif, la polyadénylation alternative permet à un gène de coder pour plusieurs transcrits qui diffèrent alors au niveau de leur séquence codante ou de leur 3'UTR (*untranslated region*). Tout cela peut avoir une conséquence au niveau de la fonction de la protéine, mais également sur l'ARNm et sa stabilité, localisation, efficacité de traduction, etc.

Il a été montré que la taille du 3'UTR des ARNm des cellules cancéreuses est plus petite que celle des cellules normales (Mayr and Bartel, 2009). Cela s'explique par l'APA, et aussi par le fait que le 3'UTR constitue une zone majeure de régulation négative de l'ARN. L'APA permettrait d'augmenter la production des protéines d'un facteur 10 chez les cellules cancéreuses (Mayr and Bartel, 2009), ce qui entraînerait une prolifération plus rapide. Par conséquent, les RBP telles que la protéine CPEB1 (*cytoplasmic polyadenylation element binding 1*) peuvent coordonner la polyadénylation de certains transcrits spécifiques à la prolifération et à la tumorigenèse (Bava et al., 2013). Un autre exemple est la protéine CEPB4

(*cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4*) qui, quant à elle, contrôle la polyadénylation spécifique de gènes impliqués dans le mélanome, MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) et RAB27A (*Ras-related protein Rab-27A*), en améliorant leur efficacité de transcription. Ces gènes sont parties prenantes de la prolifération cellulaire (Pérez-Guijarro et al., 2016).

3. Stabilité des ARNm

Comme détaillée ci-dessus, la région 3'UTR est un élément important de la stabilité des transcrits, et plus particulièrement les éléments riches en AU (ARE) que l'on retrouve chez certains transcrits, impliqués dans le cycle cellulaire, l'inflammation et la carcinogenèse (Benjamin and Moroni, 2007). Ces éléments sont déterminants dans la prise en charge de la dégradation de l'ARNm par les RBP. Dans les cancers, HuR (*human antigen R*) est retrouvée surexprimée et permet la stabilisation de nombreux transcrits au niveau de leur ARE. Ces transcrits CCNA1 (*Cyclin-A1*), CCNB1 (*Cyclin-B1*), entre autres, sont impliqués dans le cycle cellulaire et contribuent à une optimisation de la prolifération des cellules cancéreuses (Pereira et al., 2017).

4. Localisation subcellulaire

Les RBP sont également reconnues pour leur rôle important dans la localisation subcellulaire des ARN. En effet, elles sont responsables de leur transport d'un compartiment cellulaire à un autre.

La protéine IMP1 (*IGF2 mRNA-binding protein 1*), par exemple, est une protéine qui reconnaît le 3'UTR de l'ARNm β -actine et qui contrôle le transport et sa traduction dans les cellules polarisées, les fibroblastes. Dans des conditions normales, IMP1 s'associe avec l'ARNm β -actine dans le noyau et l'exporte dans le cytoplasme. Ce complexe ribonucléoprotéique se lie alors à la myosine pour être exporté en périphérie de la cellule, là où les besoins en actine sont importants pour la migration. En arrivant à destination près de la membrane cellulaire, IMP1 est phosphorylée par une kinase SRC, ce qui entraîne sa dissociation du complexe, activant alors la traduction de transcrit. Dans de nombreux cancers métastatiques, IMP1 est retrouvée sous-exprimée ce qui permet à la cellule de migrer plus facilement, l'inhibition de

la RBP IMP1 étant responsable d'une diminution de l'adhésion cellulaire, et favorise l'invasion et les métastases (Gu et al., 2012).

5. Traduction

La traduction comporte trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Plusieurs études ont montré que dans 30 % des tumeurs humaines, l'expression de eIF3E (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit E*) est dérégulée (Piserà et al., 2018). eIF4E est un facteur d'initiation de la traduction faisant partie du complexe eIF4F qui régule l'initiation de la traduction.

Ces dernières années, notre équipe a pu mettre en évidence l'importance du complexe eIF4F dans la résistance aux thérapies ciblées du mélanome cutané métastatique, mais également aux immunothérapies (Boussemart et al., 2014; Cerezo et al., 2018).

Dans les tumeurs BRAF mutées, les thérapies ciblées anti-BRAF et anti-MEK ont pour but de stopper l'activation de la voie MAPK hyperactivée. Néanmoins, la machinerie d'initiation de la traduction eIF4F persiste lors des traitements anti-BRAF et anti-MEK ce qui permet de contourner les effets des traitements et d'activer les mécanismes de résistance en entraînant une réactivation de la voie MAPK. Cela montre qu'il est important d'envisager des thérapies ciblant à la fois BRAF et MEK, mais aussi le complexe eIF4F afin de surmonter cette résistance (Malka-Mahieu et al., 2016, 2017).

6. Dommages à l'ADN

Récemment, de nombreuses études ont montré que les RBP sont impliquées dans la réparation aux dommages de l'ADN (Dutertre and Vagner, 2017). Une étude a mis en évidence que la protéine HuR est capable de stabiliser l'ARNm PARG (*poly (ADP-ribose) glycohydrolase*), ce qui contribue à sa surexpression et ainsi régule la dynamique d'interaction entre PARP1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*) et la chromatine. Cela permet une réparation de l'ADN plus efficace, cependant cela entraîne aussi une résistance aux inhibiteurs de PARP (Chand et al., 2017). Ces derniers sont utilisés en complément des chimiothérapies dans le but d'inhiber la réparation de l'ADN et ainsi inhiber la prolifération cellulaire des tumeurs.

Les mécanismes décrits démontrent le rôle important des RBP sur les ARNm dans les cancers. De plus en plus d'études soulèvent l'importance des interactions des RBP avec les longs ARN non codants dans les cancers (Jonas et al., 2020).

II. Les longs ARN non codants

Ces dernières années, de nombreuses études ont souligné l'importance des longs ARN non codants (lncARN) dans les cancers et la signalisation oncogénique (Fang and Fullwood, 2016; Sanchez Calle et al., 2018; Wang et al., 2017b). Les lncARN sont généralement définis comme des ARN de plus de 200 nucléotides et ne codant pas pour une protéine (Ponting et al., 2009). En effet, on ne retrouve pas d'ORF apparente chez ces longs ARN non codants. Comme les ARN messagers, ils sont transcrits par l'ARN polymérase II (il existe néanmoins des exceptions avec des lncARN transcrits par l'ARN polymérase III). Ils ont une coiffe en 5', peuvent également parfois être polyadénylés et subir des phénomènes d'épissage. On les retrouve exprimés dans le noyau, le cytoplasme et dans la mitochondrie. La séquence des lncARN est généralement faiblement conservée à travers les espèces (Necsulea et al., 2014) ; de plus dans une même espèce leur expression est souvent faible et tissu spécifique (Connerty et al., 2020).

De nombreux types de classification des ARN non codants existent, ces classifications étant régulièrement mises à jour et développées au fur et à mesure des découvertes récentes. Il existe cependant des classifications assez conventionnelles (localisation, structure, mécanisme d'action, motif de liaison aux protéines). Selon leur localisation sur le génome, par exemple, les lncARN peuvent être divisés en deux groupes :

- lncARN intergéniques : situés entre les gènes, ces lncARN sont généralement appelés LincARN.
- lncARN intragéniques : situés sur les gènes, ces lncARN peuvent également être classés en sous-groupes selon leur orientation sur le gène qu'ils chevauchent : sens, antisens, bidirectionnel (ou divergent).

Au départ considérés comme non fonctionnels, voire comme du « bruit de fond transcriptionnel », les lncARN montrent aujourd'hui qu'ils sont d'importants régulateurs dans

l'expression des gènes, mais également dans divers processus cellulaires, tels que la prolifération, l'apoptose, le métabolisme, ainsi que dans les événements de tumorigenèse (Wang et al., 2017b).

Dans cette partie seront abordés les fonctions et mécanismes d'action des longs ARN non codants ainsi que leur rôle dans les cancers et les voies de signalisation oncogéniques.

A. Fonctions et mécanismes d'action des lncARN

Afin de réguler les différents processus cellulaires, les longs ARN non codants peuvent interagir avec la chromatine, avec des protéines, mais également avec d'autres ARN (figure 9) (Guttman and Rinn, 2012; Schmitt and Chang, 2016).

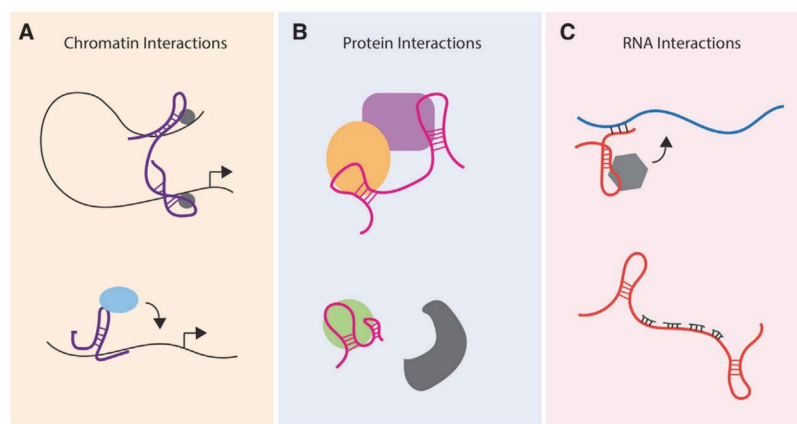


Figure 9 : Mécanismes d'interactions des longs ARN non codants d'après Schmitt and Chang, 2016

1. Interactions avec la chromatine

Les études explorant l'expression des lncARN dévoilent une expression la plupart du temps faible et/ou tissu-spécifique (Jiang et al., 2016). Souvent en réponse à un stimulus cellulaire, tel qu'un stress, l'expression d'un lncARN est activée. Cela suggère une importante régulation transcriptionnelle. Cet aspect est particulièrement intéressant puisque c'est cela qui permet au lncARN d'agir en tant que signal moléculaire et donc de réguler finement l'expression des gènes cibles. D'ailleurs, il a été montré que l'état de la chromatine pouvait être régulée grâce aux lncARN nucléaires (Wang and Chang, 2011). Ces derniers peuvent en effet contrôler l'architecture de la chromatine ; l'un des exemples les plus connus est le lncARN XIST (*X Inactive Specific Transcrit*) qui, afin d'inactiver un des chromosomes X, va se positionner sur

ce chromosome. Cela va enclencher le recrutement de la machinerie ribonucléoprotéique répresseur de la transcription où des méthyles transférase vont venir apposer la marque H3K27 sur les histones, inhibant ainsi la transcription des gènes situés sur ce chromosome X à inactiver (Brown et al., 1991).

2. Interactions avec l'ARN

Les lncARN, en plus de réguler l'état de la chromatine, ce qui permet en aval la modulation de la transcription, sont également capables d'interagir avec les ARN pour réguler leur activité, leur stabilité, leur épissage ou encore leur traduction.

Le lncARN Staufen-1, par exemple, permet de réguler un set d'ARNm et d'induire leur dégradation en interagissant avec leur région 3'UTR : il se forme alors une tige entre l'ARN et un élément ALU du lncARN (Gong and Maquat, 2011).

Par ailleurs, les lncARN peuvent par exemple interagir avec des mi-ARN en agissant comme des éponges à mi-ARN par compétition endogène. Ces derniers sont en effet séquestrés et ne peuvent donc plus agir sur leur cible. C'est un mécanisme qui permet de réguler leur activité. C'est le cas du pseudogène PTENP1 (*phosphatase and tensin homolog pseudogene 1*), considéré jusqu'en 2010 (Poliseno et al., 2010) comme biologiquement inactif, lorsque le groupe de Pandolfi a montré que la région 3'UTR de l'ARN de PTENP1 pouvait interagir avec un set de mi-ARN connus pour réprimer l'expression de l'ARNm PTEN et ainsi de la protéine répresseur de tumeur PTEN. Ce mécanisme suggère, de façon assez intéressante, la possibilité de régulation par le 3'UTR des ARNm ou des pseudogènes (Song et al., 2011).

3. Interactions avec des protéines

Les lncARN peuvent aussi agir en tant que guide, et ainsi interagir et diriger des complexes ribonucléoprotéiques vers leur cible spécifique ou un locus particulier de la chromatine par exemple (Wang et al., 2017a). Cela permet une régulation très fine de l'expression des gènes en fonction des stimuli cellulaires.

Les lncARN sont également capables d'agir en tant qu'échafaudage moléculaire ou encore *scaffold*. En se liant à plusieurs protéines, ils engendrent ainsi la formation d'un complexe protéique. L'exemple le plus connu est l'exemple de l'ARN HOTAIR (*HOX Transcript Antisense*

RNA) capable de se lier à une méthylase et à une déméthylase, ce qui permet la formation d'un complexe ribonucléoprotéique capable de réguler l'état de la chromatine (Tsai et al., 2010). Il est à noter que ce rôle de *scaffold* peut être particulièrement intéressant pour regrouper des protéines dans un même espace cellulaire.

De plus, les lncARN sont également capables de guider les protéines dans un espace cellulaire donné. C'est le cas, par exemple, de l'ARN Apela (*Apelin receptor early endogenous ligand*) qui, en réponse à un dommage, va se lier à hnRNPL (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L*), inhibant la capacité de ce dernier à lier p53. La protéine p53 va alors pouvoir entrer dans la mitochondrie et induire l'apoptose (Li et al 2015).

Pour finir, les lncARN peuvent aussi moduler l'activité d'une protéine et ainsi avoir un rôle sur l'homéostasie cellulaire. En interagissant avec des protéines régulatrices, les lncARN peuvent empêcher ces protéines d'accomplir leur rôle. De la même manière que pour les mi-ARN, les lncARN peuvent alors jouer le rôle de leurre à protéines. Les facteurs de transcription ainsi que les facteurs modificateurs de la chromatine sont particulièrement sujets à ce type de régulation. À l'inverse, les lncARN sont aussi capables d'interagir avec des domaines clés d'une protéine, et cela en affectera sa fonction. Par exemple, en masquant son site d'ubiquitination, un lncARN peut stabiliser une protéine et elle pourra alors s'accumuler (Zhang et al., 2015). Donc en interagissant avec une protéine, un lncARN peut en changer sa fonction : soit l'inhiber, soit au contraire augmenter son activité (Gong et al., 2015).

En interagissant avec des protéines, les lncARN sont donc capables de moduler la fonction de la protéine, de réguler des interactions protéine-protéine, mais également de diriger la localisation d'une protéine dans un espace cellulaire particulier.

Le mode d'action des lncARN est donc très divers, il est rendu possible par leur séquence nucléotidique, mais aussi leur habilité à former des structures secondaires particulières, ce qui permet des diversités d'interactions.

Ces différentes interactions ont donc soulevé cinq rôles principaux pour les lncARN :

- signal moléculaire,
- leurre (*decoy*),
- guide,
- « *scaffold* » ou plateforme, échafaudage moléculaire,
- régulateur de l'activité protéique.

De plus, il est important de souligner que les lncARN ne sont pas restreints à ces rôles. En effet, les connaissances sur les fonctions des lncARN sont encore récentes et de plus en plus d'études mettent en évidence de nouveaux rôles.

B. lncARN et cancer

De par leurs interactions variées, il n'est pas surprenant de constater que les lncARN sont impliqués dans divers processus liés au développement cancéreux tels que la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose.

D'ailleurs, les premières études de séquençage à haut débit concernant leur implication dans les cancers ont montré une dérégulation de l'expression de certains lncARN dans certains types de cancers par rapport au tissu sain. Ils peuvent même agir en tant que potentiels suppresseurs de tumeurs ou oncogènes et ainsi être utilisés en tant que biomarqueurs (Gesualdo et al., 2014; Haemmerle and Gutschner, 2015; Kitagawa et al., 2012; Shi et al., 2013). Il existe de nombreux exemples de lncARN impliqués dans tous les types de cancer. C'est d'ailleurs dans ce contexte qu'ils ont été le plus décrits, bien que de nombreuses interrogations subsistent. Les lncARN sont en effet impliqués dans tous les processus reliés aux cancers, les fameuses *hallmarks of cancer* décrites par Hanahan et Weinberg en 2000 et 2011 (figure 10).



Figure 10 : Les Hallmarks of Cancer d'après Hanahan and Weinberg, 2011

Dans cette partie seront détaillés quelques exemples d'implication des lncARN pour chaque *hallmark*.

1. Insensibilités aux signaux inhibiteurs de croissance

Cette particularité permet aux cellules cancéreuses de maintenir un niveau assez élevé de croissance. Cela peut se faire par l'inhibition des suppresseurs de tumeur par exemple. ANRIL (*antisense noncoding RNA in the INK4 locus*) est un lncARN reconnu pour être dérégulé dans de nombreux cancers. Il est responsable de l'inhibition de l'expression de la protéine suppresseur de tumeur p15 (INK4B) puisque ANRIL interagit avec SUZ12, une sous-unité du complexe de répression PRC2, ce qui permet de recruter le complexe de répression de p15 (Kotake et al., 2011). Ce lncARN agit alors comme un oncogène.

À l'opposé, il existe des lncARN se comportant comme des suppresseurs de tumeurs, c'est le cas de GAS5 (*growth arrest-specific 5*). Ce lncARN est capable d'inhiber la réponse aux glucocorticoïdes et arrête la croissance des cellules, les rendant alors sensibles à l'apoptose (Kino et al., 2010 ; Mourtada-Maarabouni et al., 2009).

2. Dérégulation du métabolisme énergétique

Le glucose est une des premières sources d'énergie pour la cellule. C'est ce qui permet la croissance et la prolifération grâce à la production d'ATP. La transformation de glucose en ATP se fait par l'intermédiaire du métabolisme énergétique. En comparaison avec des cellules normales, les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques distinctes concernant leur métabolisme énergétique telles qu'une absorption excessive de glucose, une dépendance plus importante à la glycolyse aérobie et une modification du métabolisme des lipides (Pavlova and Thompson, 2016). Ces dernières années, il a été démontré que les lncARN peuvent moduler le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses grâce à des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse tel que HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), ce qui facilite le processus glycolytique. Par exemple, le lncARN p21 est fortement induit par l'hypoxie et améliore la glycolyse de manière HIF1- α dépendante. En effet, le lncARN p21 stabilise HIF-1 en atténuant son ubiquitination et donc sa dégradation (Yang et al., 2014). D'autres mécanismes par lesquels les lncARN peuvent jouer un rôle sur le métabolisme ont également été décrits : augmentation de l'expression d'enzyme spécifique du métabolisme (lncARN IGFBP4-1 pour *insulin-like growth factor binding protein 4-1 lncRNA*) (Yang et al., 2017), interaction avec des facteurs régulant l'homéostasie

mitochondriale et le métabolisme (SAMMSON pour *survival associated mitochondrial melanoma specific oncogenic non-coding RNA*) (Leucci et al., 2016).

3. Échappement à la destruction par le système immunitaire

La défense immunitaire est un mécanisme de protection envers les cellules anormales ou du non-soi, qui peuvent alors être reconnues et éliminées. Cependant, les cellules cancéreuses se sont adaptées et ont mis en place des mécanismes leur permettant d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire. Récemment, des études ont mis en évidence l'implication des lncARN dans ce phénomène. Le lnc-EGFR (*lnc-epidermal growth factor receptor*) est retrouvé surexprimé dans des lymphocytes T régulateurs : cela est corrélé positivement à la taille de la tumeur et la voie EGFR/Foxp3 et négativement à l'expression de l'interféron γ . Ce lncARN stimule en effet la différenciation de ces lymphocytes T et supprime la cytotoxicité médiée par le complément, ce qui favorise l'évasion immunitaire des cellules de carcinomes hépatocellulaires (Jiang et al., 2017).

D'autres lncARN, tels que le lncARN IL7R (*interleukin-7 receptor*) ou le lncARN TMEVPG1 ont quant à eux été décrits comme étant localisés à proximité des gènes de cytokines, agissant sur les facteurs de transcription par régulation épigénétique et inhibant ainsi la réponse inflammatoire (Collier et al., 2012 ; Cui et al., 2014 ; Mowel et al., 2018 ; Vigneau et al., 2003).

4. Immortalité répllicative

Les cellules cancéreuses sont capables de se diviser de façon presque illimitée. Cela est principalement expliqué par le maintien des télomères qui empêche la sénescence, grâce à l'activité de la télomérase.

La télomérase est une enzyme composée de deux sous-unités : TERC (*telomerase RNA component*), un ARN non codant et TERT (*telomerase reverse transcriptase*), la reverse transcriptase. TERC sert de matrice à TERT, ce qui permet de maintenir la taille des télomères. Une amplification de l'activité de TERC est remarquée dans plusieurs cancers, dont le carcinome cervical et la leucémie (Andersson et al., 2006 ; Nowak et al., 2006). Par ailleurs, des études ont démontré que des lncARN peuvent être transcrits à partir des régions télomériques et subtélomériques des télomères, ils sont appelés lncARN TERRA (*telomere*

repeat-containing RNA). Ils sont capables d'interagir avec la télomérase, ce qui inhibe sa fonction. Ils agissent par compétition avec l'ADN des télomères (Redon et al., 2010). Il a été montré que l'activité télomérase et l'immortalité répliquative semblent dépendantes de l'inhibition de ces lncARN (Ng et al., 2009). Cependant, les mécanismes concernant cette inhibition restent encore peu compris. Il est néanmoins intéressant de constater que ces lncARN TERRA sont retrouvés faiblement exprimés dans les cellules cancéreuses telles que la lignée HeLa, alors qu'ils sont fortement exprimés dans les tissus sains ayant peu d'activité télomérase (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008).

5. Viabilité

L'apoptose, appelée aussi mort cellulaire contrôlée, est un mécanisme clé de la vie cellulaire. Les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à ce phénomène et peuvent ainsi proliférer. Elles sont qualifiées d'immortelles. Les lncARN peuvent être impliqués dans ce processus. Le lncARN PANDA (*p21 associated ncRNA in DNA damage activated*) est, par exemple, capable de bloquer l'apoptose à travers son interaction avec le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear transcription factor κ subunit alpha*), ce qui limite l'expression de gènes proapoptotiques (Hung et al., 2011). À l'inverse, le lincARN p21, quant à lui, sert de répresseur impliqué dans la réponse transcriptionnelle à p53 (Huarte et al., 2010). Quand le lincARN p21 se lie à la protéine hnRNPK (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*), un complexe ribonucléoprotéique capable de réprimer l'expression des gènes se forme et entraîne l'activation de la voie de l'apoptose dirigée par p53.

6. Angiogenèse

L'angiogenèse est une condition préalable à l'apparition de métastases. Elle se déroule dans le microenvironnement tumoral et est dirigée par de nombreuses interactions complexes faisant intervenir des facteurs proangiogéniques (VEGF/VEGFR (*vascular endothelial growth factor/ receptor*), facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF/PDGFR (*platelet derived growth factor/receptor*)) et anti-angiogéniques (thrombospondine TSP-1/2). Il a été rapporté que certains lncARN pouvaient participer à l'angiogenèse tumorale (Khorshidi et al., 2016). Par exemple, les cellules déficientes en lncARN

MALAT1 (*metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*) présenteraient une prolifération vasculaire et une réactivité au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) réduites, entraînant une réduction du réseau vasculaire, par rapport à celui des cellules de rétine de souris de type sauvage (Michalik et al., 2014).

Outre l'angiogenèse, l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un moyen vital pour les cellules d'augmenter leur capacité d'invasion. Certains lncARN ont été décrits comme pouvant promouvoir cette transition. C'est le cas de l'ARN HULC (*highly up-regulated in liver cancer*) qui peut moduler le domaine doigt de zinc du facteur ZEB (*E-box binding homeobox*), ce qui permet sa liaison au promoteur de la E-cadhérine et réprime ainsi sa transcription. La perte de l'expression de la E-cadhérine est considérée comme un événement fondamental favorisant le passage de l'EMT (Li et al., 2016a).

7. Migration — invasion et métastase

De multiples études ont démontré l'implication de nombreux lncARN dans les phénomènes cellulaires d'invasion de métastases (Flockhart et al., 2012 ; Hu et al., 2015).

Dans le contexte du mélanome, l'équipe de Paul A Khavari a montré, en 2012, que le lncARN BANCR (*BRAF-Activated Non-Protein Coding RNA*) est retrouvé surexprimé et a une fonction potentielle sur la migration. En effet, une déplétion de BANCR permet de réduire la migration des cellules de mélanome.

Le lncARN NKILA (*Nuclear Factor- κ B Interacting lncRNA*), quant à lui, se lie directement avec le complexe NF- κ B p65-I κ B pour bloquer la phosphorylation d'I κ B (*inhibitor of nuclear factor κ B*). Cela entraîne une diminution de l'activation de la voie NF- κ B, responsable de l'inflammation dans les cellules épithéliales du cancer du sein. Il agit alors comme un suppresseur de tumeur et un biomarqueur puisque des une expression relativement faible de NKILA dans les cancers du sein est synonyme de mauvais pronostics, puisque lié à un développement de métastases (Liu et al., 2015).

8. Prolifération — Autosuffisance en signaux de croissance

Les cellules normales sont sous le contrôle des voies de signalisation, ce qui permet de réguler leur division et leur prolifération. Les cellules cancéreuses ont quant à elles trouvé le

moyen d'échapper à ces mécanismes de contrôle du cycle cellulaire en dérégulant les voies de signalisation.

Un grand nombre de lncARN démontrent, des caractéristiques pro-oncogéniques permettant la prolifération, et, une surexpression dans certains cancers. Par sa capacité à méthyler certaines histones, HOTAIR par exemple, est capable d'inhiber l'expression de nombreux oncosuppresseurs (Nie et al., 2013 ; Yang et al., 2011). Sa surexpression est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers, potentiellement par son activité oncogénique (Slack and Chinnaiyan, 2019). D'autre part, MALAT1 agit en tant qu'oncogène dans de nombreux cancers en induisant la migration, la prolifération et l'invasion (Wu et al., 2014 ; Zhou et al., 2015).

À l'inverse, quelques lncARN démontrent des caractéristiques oncosuppressives et se retrouvent sous exprimés dans certains cancers. C'est le cas des linc p21, GAS5 (détaillés plus haut) et de MEG3 (*maternally expressed gene 3*). Ce dernier est capable d'interagir avec p53, ce qui a pour effet de stabiliser cette protéine. De plus, il est également capable de réprimer l'expression de la protéine MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) qui est impliquée dans la dégradation de p53 par le protéasome. Ces deux mécanismes convergent vers une augmentation de l'activité de p53, et ainsi une inhibition de la prolifération et une augmentation de l'apoptose dans les cancers du poumon (Lu et al., 2013).

Tous les différents exemples décrits ainsi que la figure 11 démontrent l'importance des lncARN dans les *hallmarks of cancer*. Cela reste assez récent, et il est fort probable que la liste des lncARN impliqués dans les différents processus des *hallmarks of cancer* ne fasse que s'allonger.

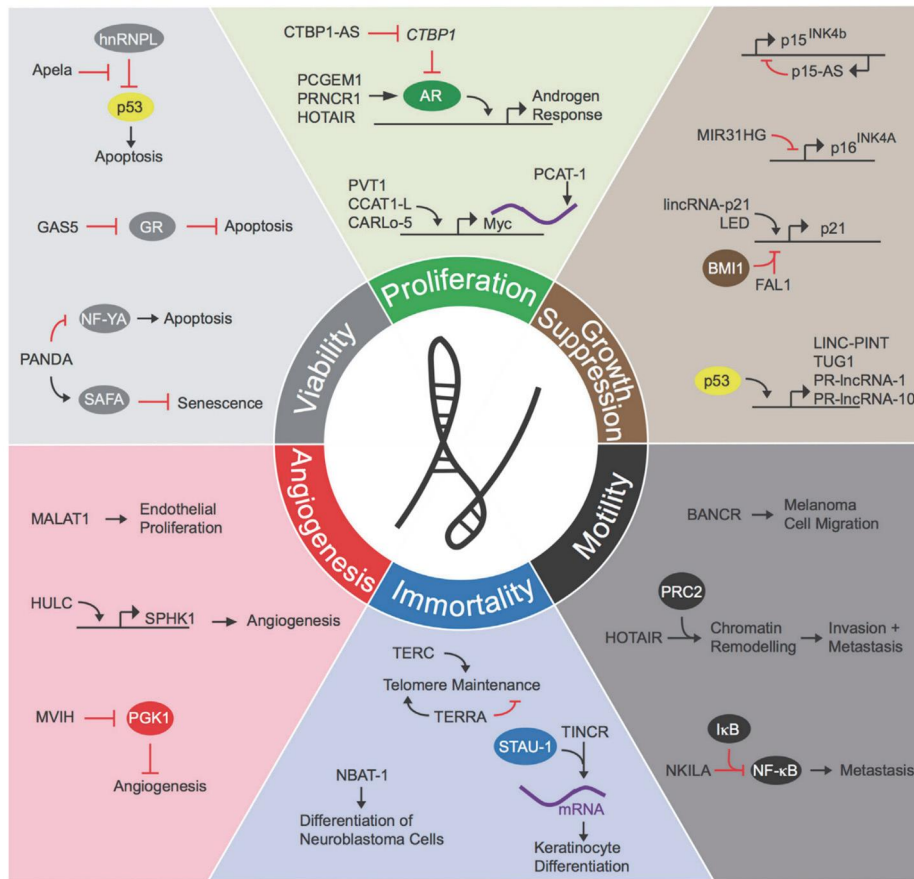


Figure 11 : Sélection d'exemples de lncARN impliqués dans les hallmarks of cancer d'après Schmitt and Chang, 2016.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que des études récentes suggèrent un rôle important et complexe des lncARN dans ces processus de prolifération par l'intermédiaire des voies de signalisation.

C. Le *scaffolding* des lncARN dans les voies de signalisation oncogénique

Par leurs différents rôles dans la progression tumorale, les lncARN agissent comme des médiateurs clés dans les voies de signalisation oncogénique. Ils se retrouvent impliqués dans l'activation de nombreuses voies oncogéniques.

Comme abordé précédemment, dans les différents *hallmarks of cancer*, grâce à leurs diverses interactions (ARN, protéine, ADN), les lncARN sont capables d'agir de différentes manières sur les voies de signalisation. Cela est rendu possible principalement par leur rôle de signalement moléculaire, de guide, ou encore de modulateur de l'activité protéique. En 2018,

une étude a révélé que leur rôle de *scaffold* semble plus important que ce qu'on pensait (Ribeiro et al., 2018).

Toutes les voies de signalisation ont un mécanisme assez similaire. En réponse à un stimulus externe ou interne, la voie de signalisation s'active. Cela déclenche alors une cascade de phosphorylation et d'interactions protéine-protéine pour transmettre le signal de la membrane jusqu'au noyau. C'est ce qu'on appelle la transduction du signal.

Diverses études récentes ont montré le rôle de *scaffold* des lncARN dans ces voies de signalisation (voir revue en annexe). En jouant le rôle de *scaffold*, les lncARN peuvent médier les interactions protéine-protéine de ces voies et ainsi réguler la transduction du signal.

Les lncARN ont été décrits comme pouvant agir comme *scaffold* à chaque étape des voies de signalisation de la détection du signal, en passant par la transduction de ce signal, et pour finir à la réponse cellulaire. Ici seront détaillés quelques exemples illustrant leur rôle dans chacune des étapes de la voie de signalisation.

1. Rôle des lncARN dans la détection du signal

Assez récemment, quelques études ont commencé à souligner l'importance des lncARN dans l'activation des voies de signalisation. En 2016, Aifu Lin et ses collaborateurs ont identifié un lncARN cytoplasmique LINK-A (*long intergenic non-coding RNA for kinase activation*) jouant un rôle dans la prolifération induite par la voie de signalisation HIF1 α dépendante (figure 12) (Lin et al., 2016). LINK-A agit en tant que *scaffold* et forme alors un complexe entre les protéines BRK (*breast tumor kinase*) et LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*). Lorsque la voie de signalisation est activée par fixation de HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) sur un récepteur transmembranaire, LINK-A est requis pour recruter le complexe près de ce récepteur. BRK et LRRK2 sont alors capables de phosphoryler HIF1 α , ce qui déclenche l'activation séquentielle de la voie. L'expression importante de LINK-A, ainsi qu'une suractivation de la voie de signalisation, sont retrouvés dans les cancers du sein triple négatif et sont corrélés avec une augmentation de la glycolyse et de la tumorigénèse.

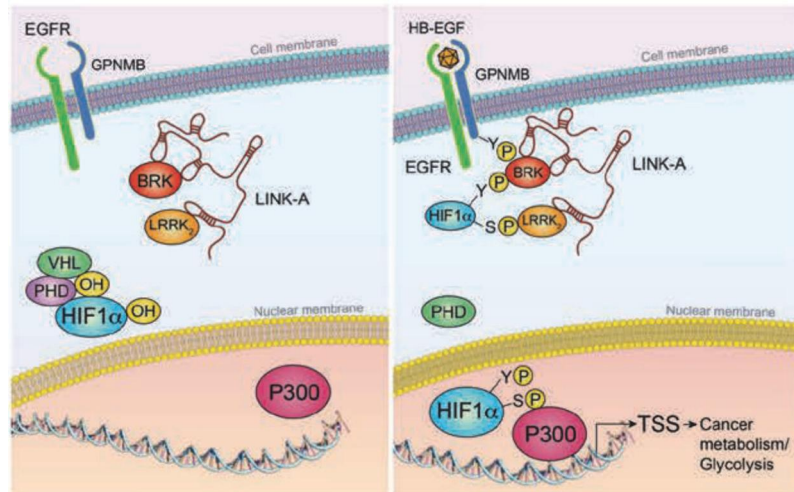


Figure 12 : LINK-A joue un rôle dans la prolifération induite par la voie de signalisation HIF1 α dépendante d'après (Lin et al., 2016).

En 2017, un rôle similaire pour LINK-A de *scaffolding* et de recrutement à la membrane a été décrit par Lin et ses collaborateurs dans le cadre de la voie de signalisation AKT-mTOR (Lin et al., 2017). La liaison de LINK-A avec AKT (*protein kinase B*) et PIP3 (Phosphatidylinositol-3, 4,5 — trisphosphate) permet de faciliter leur interaction et les activations enzymatiques qui s'en suivent. Cette hyperactivation médiée par LINK-A est responsable de résistance face aux inhibiteurs anti-AKT utilisés dans certains cancers. Des délétions génomiques du motif de liaison LinkA-PIP3 sensibilisent de façon spectaculaire les cellules de cancer du sein aux anti-AKT.

D'autres lncARN tels que LINC00673-v4 (Guan et al., 2019), lncARN-MUF ou encore HEXIM et NEAT1 (*nuclear paraspeckle assembly transcript 1*) (Morchikh et al., 2017) sont également capables d'agir sur les premières étapes de l'activation de voies de signalisation oncogénique.

2. Rôle des lncARN dans la transduction du signal

Les lncARN ont également été montrés comme acteurs de la transduction du signal, car ils servent de *scaffold* régulateurs des interactions protéiques.

Dans le cancer du sein triple négatif, il a été démontré que le lncARN PVT1 (*plasmacytoma variant translocation 1*) peut agir comme un *scaffold* dans le cytosol en liant directement la protéine KLF5 (*Kruppel Like Factor 5*) à deux sites et en augmentant la stabilité de la protéine BAP1 (*BRCA1 associated protein 1*), ce qui entraîne une surexpression de la β -caténine (Tang

et al., 2018). Les auteurs démontrent que cette régulation de la signalisation de la β -caténine par l'ARN PVT1 est particulièrement critique pour la croissance des tumeurs et la prolifération cellulaire. En effet, la déplétion de l'ARN PVT1 inhibe la prolifération cellulaire et la croissance des tumeurs dans deux lignées cellulaires triples négatives de cancer du sein.

Un processus similaire se retrouve dans la régulation de la signalisation des métastases osseuses grâce à un cross-talk entre les voies ROR1-HER3 et Hippo-YAP où l'ARN MAYA (*MST1/2-antagonizing for YAP activation*) favorise la métastase osseuse du cancer du sein (Li et al., 2017). Cette étude montre que l'ARN MAYA fournit de multiples sites de liaison aux protéines ; il est capable de former un complexe ARN-protéine contenant HER3, LLGL2 et NSUN6 qui peut ainsi contrôler la méthylation de Hippo/MST1.

Ces exemples illustrent la capacité de l'ARN échafaudage à servir de médiateur dans les interactions protéine-protéine et donc à réguler la transduction du signal et à favoriser ou défavoriser la croissance de la tumeur.

Un aspect intéressant de la fonction d'échafaudage des lncARN est également qu'ils semblent être impliqués dans les processus d'ubiquitination des protéines (Xue et al., 2018 ; Yoon et al., 2013). L'exemple de cette régulation est l'ARN HOTAIR qui a été trouvé associé aux ubiquitines ligases E3 et à leurs substrats, tous deux contenant des domaines de liaison à l'ARN. L'ARN HOTAIR a été l'un des premiers ARN *scaffold* découverts (Tsai et al., 2010), il est capable d'assembler un complexe épigénétique afin de réguler l'état de la chromatine. En possédant des domaines de liaison pour une déméthylase LSD1 (*lysine-specific histone demethylase 1A*) et une méthylase PRC2 (*polycomb repressive complex 2*), le lncARN HOTAIR peut réguler l'héritage épigénétique. Dans le contexte des voies d'ubiquitination des protéines, l'ARN HOTAIR semble être nécessaire pour contrôler les niveaux de protéines en induisant une protéolyse médiée par l'ubiquitine. Un niveau élevé d'ARN HOTAIR s'est avéré responsable de la dégradation de ses cibles, l'Ataxine-1 et la Snurportine-1, en favorisant leur ubiquitination et donc en stimulant la sénescence (Yoon et al., 2013). Dans le cancer de l'estomac, l'ARN HOTAIR est associé à une régulation positive de l'invasion cellulaire et des métastases tumorales, en induisant la protéolyse de Runx3. Les auteurs soulignent la possibilité de tirer profit de cette interaction HOTAIR-Runx3 comme cible thérapeutique potentielle pour traiter le cancer gastrique (Xue et al., 2018). Toutes ces découvertes sur les complexes protéiques d'échafaudage par l'ARN HOTAIR suggèrent l'importance de l'ARN HOTAIR dans le traitement du cancer gastrique.

3. Rôle des lncARN dans la réponse cellulaire

En plus d'agir sur la détection du signal et sur sa transduction, les lncARN peuvent également impacter la réponse cellulaire en aval de la voie.

Le lncARN GUARDIN fonctionne pour protéger la stabilité du génome. L'inhibition de l'expression de GUARDIN peut modifier les décisions relatives au destin des cellules vers la sénescence ou l'apoptose, mais les signaux moléculaires sous-jacents restent encore assez inconnus. En 2020, Sun et ses collaborateurs ont démontré que GUARDIN est un composant essentiel d'un complexe répresseur transcriptionnel impliquant LRP130 et PGC1 α (Sun et al., 2020). GUARDIN agit comme un échafaudage pour stabiliser les hétérodimères LRP130/PGC1 α et leur occupation au niveau du promoteur FOXO4. La déstabilisation de ce complexe par l'inhibition de GUARDIN, LRP130 ou PGC1 α conduit à une expression accrue de FOXO4 et à une régulation à la hausse de son gène cible p21, entraînant les cellules dans la sénescence. Ils montrent également que l'expression de GUARDIN est induite en réponse à l'utilisation de la rapamycine, inhibiteur de mTOR (figure 13).

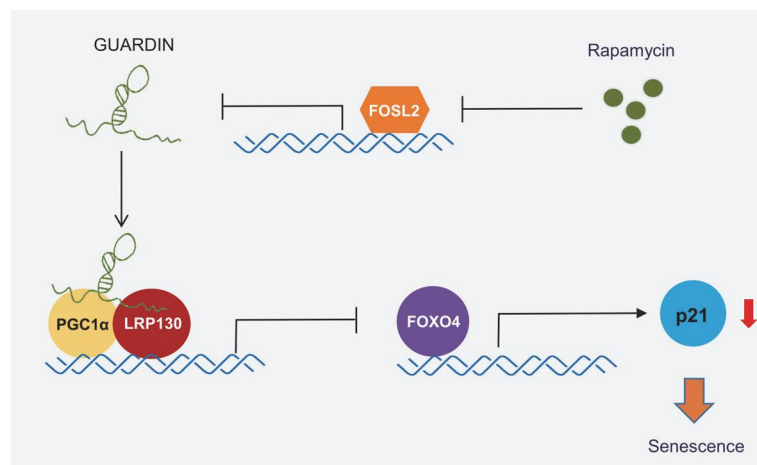


Figure 13 : Illustration de l'action de GUARDIN dans la sénescence d'après Sun et al., 2020.

D'autres exemples existent, dont celui de Yinghui Li et ses collaborateurs, qui démontrent que le lncARN HOTAIR sert de médiateur pour l'activation transcriptionnelle par c-Myc dans les cellules de cancer du sein (Li et al., 2016 b). L'oncoprotéine HBXIP (*hepatitis B virus X-interacting protein*) interagit directement avec c-Myc et est recrutée par l'ARN HOTAIR. HOTAIR interagit également avec l'histone déméthylase LSD1. Il sert d'échafaudage pour ce complexe c-Myc/HBXIP/LSD1/ HOTAIR et ce complexe prend le rôle d'effecteur critique de

l'oncogène c-Myc en activant la transcription de ses gènes cibles dans les cancers du sein (figure 14).

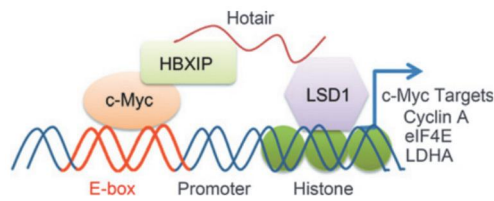


Figure 14 : le complexe c-Myc/HBXIP/HOTAIR/LSD1 joue un rôle sur la transcription des cibles de c-Myc.

Toutes ces études récentes démontrent l'importance des RBP, lncARN et des interactions RBP-lncARN dans les cancers et la progression tumorale. Étant donné la complexité et diversité de ces interactions, les rôles des lncARN et des RBP commencent tout juste à être découverts. Il est donc nécessaire d'étudier en profondeur ce nouveau domaine qui peut potentiellement lever le voile sur de nombreuses interrogations entourant les cancers et leurs traitements, qui font souvent face à des résistances encore largement incomprises.

III. BRAF, acteur central de la voie MAPK au cœur de la résistance aux thérapies ciblées contre le mélanome

BRAF est une protéine de la voie de signalisation MAPK appelée également voie RAS-RAF-MEK-ERK en raison des noms des acteurs successifs de la voie (figure 15). La voie de signalisation MAPK régule des phénomènes indispensables à la vie cellulaire tels que la migration cellulaire ou encore la différenciation (Pearson et al., 2001). Lorsqu'un ligand se fixe au récepteur tyrosine kinase, cela déclenche un signal et la voie de signalisation s'active alors par une cascade de phosphorylations et d'interactions protéiques (Chang and Karin, 2001; English et al., 1999; Malumbres and Barbacid, 2003). Le signal est transporté de la membrane cellulaire jusqu'au noyau où des facteurs de transcription seront activés en réponse à ce signal. Ainsi, divers processus cellulaires pourront être enclenchés, tels que la prolifération, la migration, la survie, l'angiogenèse ou encore la différenciation. Les voies de signalisation sont donc des voies cruciales et très souvent interconnectées. Elles constituent un véritable réseau

permettant à la cellule de réagir rapidement. Ce réseau de diverses voies de signalisation est à l'origine d'une communication efficace face à l'environnement, grâce notamment à la cascade rapide de phosphorylations et d'interactions. La voie de signalisation MAPK étant impliquée dans des processus cellulaires indispensables, il n'est pas surprenant de la voir altérée dans des cancers et plus particulièrement dans le cas du mélanome cutané métastatique (Davies et al., 2002).

D'ailleurs, dans le mélanome cutané métastatique, la voie MAPK est hyperactivée, et engendre une prolifération incontrôlée des cellules. Il est intéressant de souligner que dans plus de 50 % des cas, l'isoforme BRAF de la famille RAF est à l'origine de cette hyperactivation (Davies et al., 2002). En effet, la mutation de BRAF (mutation V600E) rend la protéine anormalement active et insensible aux signaux inhibiteurs de la voie. Des thérapies ciblées ont été développées contre la protéine oncogénique BRAF menant à une forte avancée médicale dans le traitement des patients (Carlino et al., 2015). Cependant des résistances apparaissent très rapidement après le début du traitement. Les mécanismes de résistance restent à ce jour très complexes et les moyens de les contourner sont encore peu compris. C'est la raison pour laquelle nous allons nous concentrer sur l'étude de cette protéine dans ce chapitre.

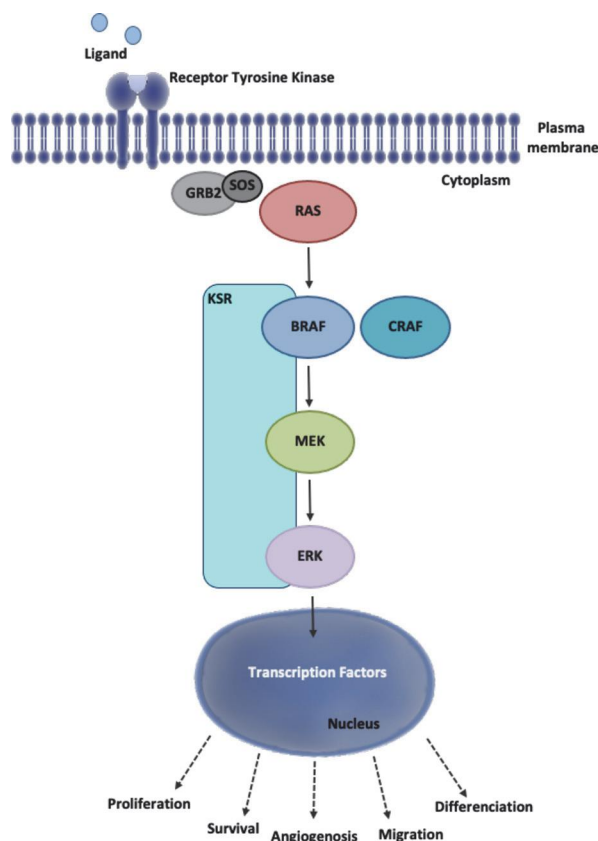


Figure 15 : la voie MAPK

BRAF est une protéine essentielle de la voie MAPK de par sa position centrale dans la cascade de phosphorylation et de par son rôle indispensable dans la transduction du signal (Zaman et al., 2019). En effet, la protéine BRAF interagit avec de nombreux acteurs de cette voie. Cette protéine est activée par une phosphorylation de la protéine RAS, et active à son tour, en aval, par phosphorylation la protéine MEK. BRAF est donc au centre de la cascade de phosphorylation de la voie MAPK. De plus, cette protéine est également capable d'interagir avec les protéines d'échafaudage de la voie telle que KSR (Therrien et al., 1996). Cette protéine d'échafaudage optimise l'activation de la voie en permettant à tous les acteurs de se situer dans un même espace cellulaire.

Il est par ailleurs important de souligner que BRAF possède un rôle majeur dans la cellule et intervient de façon complexe et diversifiée dans de nombreux cancers (Zaman et al., 2019). Cependant, ici ne seront uniquement développés ces rôles dans le mélanome cutané.

A. Structure de la protéine BRAF et mutations dans le mélanome cutané métastatique

1. Structure

Découvert en 1988 par une équipe japonaise, le gène *BRAF* est le dernier membre identifié de la famille RAF (Ikawa et al., 1988) ; *CRAF* et *ARAF* ont été découverts quelques années plus tôt (Mark and Rapp, 1984). C'est un gène contenant 18 exons et situé sur le chromosome 7 en position 7q34. Il code pour une protéine cytoplasmique de 766 acides aminés. Cette protéine BRAF est une sérine thréonine kinase qui participe à la transduction des signaux de la voie MAPK.

L'activation de BRAF est permise par une interaction protéine-protéine avec NRAS et une phosphorylation activatrice de RAS sur BRAF. Cela permet son recrutement à la membrane cytoplasmique. BRAF est alors capable d'activer par son activité kinase la protéine MEK et peut aussi après activation par NRAS former des homodimères et des hétérodimères avec les protéines ARAF et CRAF. Tout cela participe à une augmentation de l'activité de la voie et de la transduction du signal (Poulikakos et al., 2010; Rajakulendran et al., 2009). De plus, une kinase BRAF activée est capable d'activer une autre kinase BRAF, CRAF ou ARAF par dimérisation (Rajakulendran et al., 2009; Wan et al., 2004).

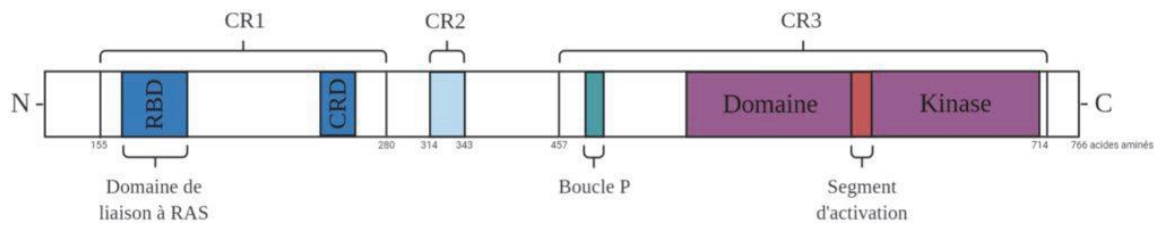


Figure 16 : Structure schématique de BRAF

C'est une protéine cytoplasmique qui possède trois régions appelées CR1, CR2 et CR3 (CR : *conserved region*) (Stefan and Bister, 2017). Ces régions sont en effet conservées parmi les membres de la famille RAF (Hanks and Hunter, 1995).

CR1 est une région localisée en N-terminal qui permet l'auto-inhibition de BRAF, l'activation de cette protéine et son recrutement à la membrane. Elle comprend en effet le domaine RBD (*ras binding domain*) et un domaine riche en cystéine le domaine CRD (*cysteine rich domain*) (Wellbrock et al., 2004a). Ces deux domaines participent à l'activation GTP dépendante de BRAF par RAS. En se liant au domaine RBD, RAS permet à BRAF de changer de conformation et ainsi d'être activée en étant dans une conformation ouverte où le domaine kinase est accessible. En l'absence de Ras, cette région CR1 permet de mettre BRAF dans une conformation inactive en bloquant la région CR3 et, ainsi, d'empêcher une activation constitutive de la protéine (Cutler et al., 1998).

La région CR2 est une région riche en sérine et thréonine, c'est une boucle essentielle à la régulation de l'activité de BRAF. Elle contient des résidus jouant un rôle important dans le recrutement de BRAF à la membrane cytoplasmique lors de son activation (Dankner et al., 2018; Stefan and Bister, 2017).

La région CR3 est la région comprenant le domaine catalytique de BRAF qui permet son activité de kinase (Stefan and Bister, 2017; Wellbrock et al., 2004a). Cette région kinase contient plusieurs domaines clés qui participent à la réaction catalytique dont la *P-loop*, c'est une boucle stabilisant le phosphate non transférable de l'ATP lors de la réaction enzymatique ; la *nucleotide binding pocket* : la poche où est retenue l'adénine de l'ATP ; le motif DFG bloquant la *nucleotide binding pocket* lorsque BRAF est inactive ; et la *catalytic loop* permettant l'activité kinase avec le transfert du phosphate (Dankner et al., 2018; Köhler et al., 2016). Le segment d'activation *A-loop* et la *P-loop* interagissent en formant des interactions hydrophobes, ce qui participe au maintien de BRAF dans une conformation inactive. Quand ce domaine est phosphorylé, ces interactions hydrophobes sont déstabilisées,

ainsi cela enclenche le passage à l'état actif de la kinase BRAF. Plus précisément, L597 et V600 de la boucle d'activation interagissent avec G466, F468 et V471 de la *P-loop* (Wan et al., 2004).

Toutes les caractéristiques de la structure de BRAF montrent que cette protéine est sujette à de nombreux mécanismes de régulations fines. Cela permet en aval une régulation très précise de l'activité de la voie de signalisation MAPK puisque BRAF interagit avec presque tous les acteurs de la voie de transduction du signal (RAS, RAF, MEK).

Par ailleurs, des études phylogénétiques ont permis de montrer que BRAF est l'isoforme la plus similaire à la seule kinase RAF Lin-45 retrouvée chez *Caenorhabditis elegans* et à la kinase D-Raf/lethal-1-polehole chez la drosophile. Cela suggère que BRAF est le prototype de la kinase RAF, tandis qu'ARAF et CRAF seraient des formes ayant évoluées et acquis de nouvelles fonctions (Desideri et al., 2015).

2. Les mutations de BRAF dans le mélanome cutané métastatique

De par les nombreux mécanismes de régulation de BRAF, il n'est pas surprenant de voir que les mutations de cette protéine entraînent une activation non contrôlée de la voie. La plupart des mutations sont retrouvées dans la région CR3, domaine kinase de la protéine (Holderfield et al., 2014).

D'ailleurs, dans le mélanome cutané, plus de 80 % des cas comportent une mutation de la voie MAPK (Bogenrieder and Herlyn, 2011), et c'est une mutation BRAF qui est retrouvée dans 36-59 % des mélanomes primaires et 42-66 % des mélanomes métastatiques. Dans la plupart des cas (80-90 %), il s'agit de la mutation BRAF V600E. Cette mutation localisée dans le segment d'activation, entraîne une augmentation de l'activité de cette protéine oncogénique, est en conséquence est également responsable d'une augmentation de l'activité ERK (Roskoski, 2018).

Les mutations somatiques du gène *BRAF* ont été décrites pour la première fois en 2002 (Davies et al., 2002 ; Gorden et al., 2003). Elles sont retrouvées dans environ 8 % des cancers (Govender and Chetty, 2012). Il est intéressant de remarquer qu'à ce jour, aucune mutation germinale du gène *BRAF* n'a été décrite. Selon une équipe de chercheurs, cela pourrait

s'expliquer par une létalité embryonnaire en présence d'une mutation BRAF (Dhomen et al., 2010). La majorité des mutations sont concentrées dans la région CR3, domaine kinase de la protéine et plus particulièrement entre la *P-loop* (exon 11) et la *A-loop*, le segment d'activation (exon 18) (figure 17) (Holderfield et al., 2014).

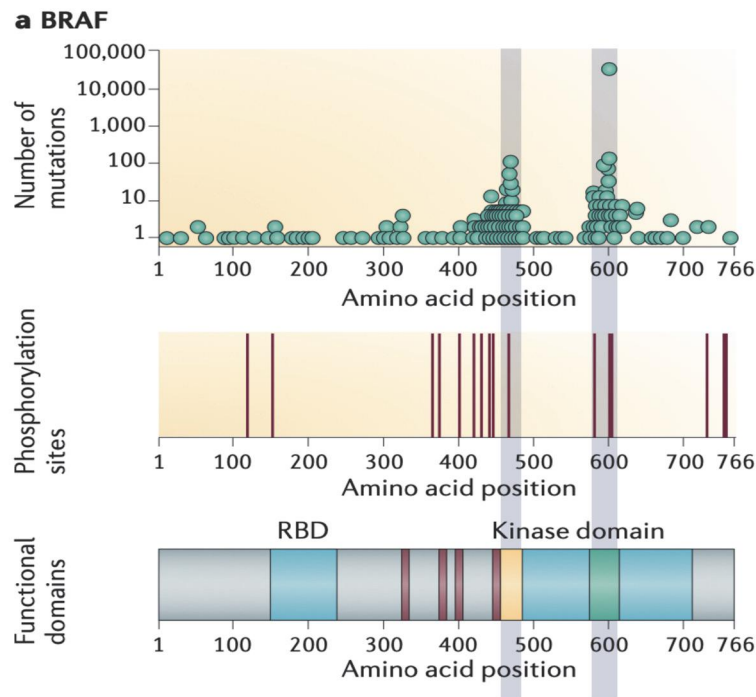


Figure 17 : Positions des mutations BRAF et sites de phosphorylation d'après Holderfield et al., 2014

Des études fonctionnelles ont montré que la plupart des mutations BRAF entraînent une forte augmentation de l'activité kinase de la protéine en comparaison à la protéine à l'état *wild type* (WT). Quelques mutations (G465E, G465V, D593V et G595R) ont cependant montré une activité réduite de BRAF *in vitro*, ils sont appelés mutants à faible activité. De façon assez inattendue, ces mutants sont également capables d'induire une hyperactivation de la voie MAPK par formation de dimères BRAF-CRAF (Heidorn et al., 2010; Wan et al., 2004). Les mécanismes moléculaires de cette interaction restent à ce jour peu compris.

Comprendre l'impact fonctionnel de ces mutations est primordial pour prédire les réponses aux thérapies ciblées existantes et en développer de nouvelles. Il a été proposé de mettre en place une classification des mutations selon l'activité kinase, la dépendance à Ras et le statut de dimérisation (Dankner et al., 2018). :

- Classe I : BRAF V600 mutation (V600E/K/D/R)

- Classe II : non BRAF V600 mutation à intermédiaire ou forte activité kinase
- Classe III : non BRAF V600 mutation à nulle ou faible activité kinase

La mutation la plus fréquente est une mutation ponctuelle activatrice où une transversion d'une thymine vers une adénine en position 1799 au niveau de l'exon 15 permet la substitution de la valine par un glutamate, c'est la mutation V600E (Davies et al., 2002). Cette mutation BRAF V600E augmente de plus de 500 fois l'activité de BRAF par rapport à son état WT (Davies et al., 2002 ; Wan et al., 2004). Cette activation constitutive de la protéine est à l'origine d'une hyperactivation de la voie MAPK et d'une prolifération non contrôlée. De plus, des expériences de culture cellulaire ont montré que des mutants BRAF sont capables d'induire la transformation de cellules NIH-3T3 en cellules tumorales (Davies et al., 2002). Ces études se confirment chez la souris où l'expression de mutant BRAF dans des mélanocytes entraîne la formation de tumeurs chez les souris *nude* (Wellbrock et al., 2004b). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle BRAF V600E est qualifié d'oncogène.

Des études structurales suggèrent que cette mutation de classe I, située dans le domaine d'activation, perturbe l'interaction inhibitrice entre la *P-loop* et la A-loop entraînant ainsi une activation non contrôlée de la voie. Cela explique pourquoi BRAF V600E ne requiert pas de dimérisation pour augmenter son activité kinase (Lavoie and Therrien, 2015 ; Röring et al., 2012).

Les mutations de classe II et III sont retrouvées de façon moins fréquente (environ 10 % des mélanomes). Les mutations de classe II sont principalement dans le segment d'activation K601, L597 ou la *P-loop* G464, G469, tandis que les mutations de classe III sont retrouvées dans la *P-loop* (G466), la boucle catalytique (N581) et le motif DFG (D594, G596)(Dankner et al., 2018).

B. Thérapies ciblées et mécanismes de résistances

1. Thérapies ciblées

L'identification de la mutation ponctuelle BRAF V600E, en 2002, responsable de l'hyperactivation de la voie MAPK a été le point clé dans la recherche et l'essor d'un inhibiteur ciblant Raf. Deux types d'inhibiteurs ont pu être développés :

- type 1 : inhibiteur qui stabilise dans une conformation active en occupant la poche ATP inhibant ainsi l'activité de la kinase ;
- type 2 : inhibiteur stabilisant RAF dans une conformation inactive en se liant à un site hydrophobe proche de la poche ATP, inhibant ainsi l'activité de la protéine.

Le premier inhibiteur, mis au point en 2000, a été le Sorafenib (Nexavar ; Bayer/Onyx Pharmaceuticals), inhibiteur pan-RAF de type 2. Avant même la découverte en 2002 des mutations BRAF dans les cancers, cet inhibiteur était à l'origine destiné à traiter les cancers Ras mutés. Par *screening*, il a été montré qu'il était capable d'inhiber également CRAF. Cependant diverses études ont montré que cet inhibiteur n'était pas spécifique à la famille RAF et pouvait avoir pour cible d'autres kinases (Wellbrock and Hurlstone, 2010). De plus, il a été montré comme non efficace en clinique pour les traitements des mélanomes BRAF mutés (Eisen et al., 2011). Ces échecs ont mis en évidence l'importance d'établir un inhibiteur ciblant spécifiquement BRAF V600E.

En 2012, le vémurafénib (ZELBORAFTM ; Roche–Genentech/Plexxikon PLX4032) inhibiteur de type I ciblant spécifiquement BRAF V600E est approuvée par la FDA (*food and drug administration*) et mis sur le marché (Tsai et al., 2008). Il s'inscrit dans la lignée des thérapies ciblées initiées par l'imatinib, première thérapie ciblée révolutionnant le traitement des leucémies myéloïdes chroniques depuis le début des années 2000.

Le développement du vémurafénib a été très rapide. En 2010, des études cliniques de phase I ont prouvé son efficacité et sa sécurité sur des mélanomes BRAF mutés (Flaherty et al., 2010). En phase II et III, le traitement a montré des améliorations significatives sur la diminution de la progression du cancer (McArthur et al., 2014 ; Sosman et al., 2012). Le vémurafénib a été une percée thérapeutique dans le traitement des patients atteints de mélanomes cutanés qui jusque-là n'avaient que les chimiothérapies pour être traités. Cet inhibiteur est spécifique des cellules mutées V600E épargnant ainsi les cellules saines non cancéreuses.

Par ailleurs, dans le même temps, un autre inhibiteur de type I a été développé : le dabrafénib (TAFINLAR^r ; GSK) (Falchook et al., 2012). Il montre des résultats similaires au vémurafénib, i.e. un taux de réponse de 60 % chez les patients mélanomes mutés BRAF, dont 7 % de réponse complète (Hauschild et al., 2012).

Ces résultats encourageants des inhibiteurs de première génération ont été le point de départ pour le développement de nouveaux inhibiteurs plus performants et moins toxiques tels que LGX818 (Novartis), le TAK-632 et MLN2480 (Takeda) (Maik-Rachline and Seger, 2016).

2. Les résistances aux thérapies ciblées dans le mélanome

En clinique, malgré le statut de la mutation V600, sur le mélanome, les inhibiteurs BRAF tels que le vémurafenib et le dabrafénib n'ont pas un taux de réponse de 100 %. En effet, dans environ certains cas, les patients ne répondent pas aux traitements, c'est ce qu'on appelle la résistance primaire ou innée. Par ailleurs, dans d'autres cas, les thérapies ciblées induisent souvent des forts taux de réponse, témoignant d'une efficacité impressionnante. Cependant, quelques mois après des résistances se développent rendant ces traitements inefficaces. C'est ce qu'on appelle des résistances secondaires ou acquises.

Les résistances innées

L'utilisation de ces inhibiteurs en clinique a mis en évidence la complexité de la voie de signalisation RAF. En 2010, trois groupes ont montré une activation paradoxale de la voie MAPK après inhibition de l'activité catalytique par anti-BRAF (figure 18) (Hatzivassiliou et al., 2010 ; Heidorn et al., 2010 ; Poulikakos et al., 2010). Cela entraîne *in vivo* une prolifération de cellules mutées RAS et, dans certains cas, une induction de la tumorigénèse. Les trois groupes ont proposé différents mécanismes expliquant cette activation paradoxale. Ces trois mécanismes, bien que différents, ont certaines similitudes. Les inhibiteurs RAF sur des cellules BRAF WT promeuvent la dimérisation des protéines RAF, ainsi qu'une dimérisation avec les protéines RAS et en conséquence une activation de la voie. En effet, les dimères BRAF-CRAF seraient plus actifs dans l'activation de MEK par rapport aux homodimères (Rushworth et al., 2006). L'utilisation d'inhibiteurs anti-BRAF serait donc responsable d'une activation paradoxale de la voie. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de ces thérapies ciblées ne doit se faire qu'après caractérisation de la tumeur chez le patient.

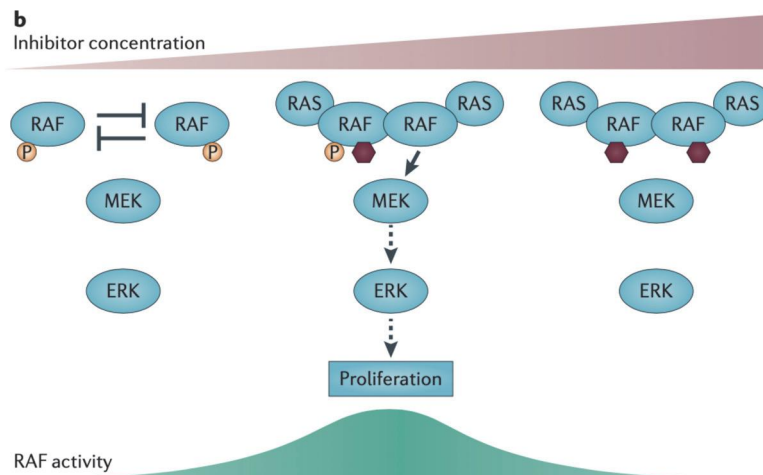


Figure 18 : activation paradoxale de BRAF d'après Holderfield et al., 2014

Malgré la présence d'une mutation V600E/K, la thérapie ciblée (vémurafenib ou dabrafénib) ne donne pas de réponse en cas de résistance innée. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer cette résistance. Tout d'abord, le microenvironnement tumoral est important pour comprendre cette résistance innée (Straussman et al., 2012). En effet, dans certaines conditions, les cellules stromales secrètent un facteur de croissance HGF (*hepatocyte growth factor*) qui agit sur le récepteur MET. Cela a pour conséquences de réactiver Erk en passant par la voie AKT/mTOR. Par conséquent, en combinaison avec l'utilisation de thérapies anti-BRAF, une inhibition de la sécrétion d'HGF permet de stopper cette résistance intrinsèque. Par ailleurs, des activations parallèles de la voie de signalisation ERK via la voie AKT peuvent avoir lieu par d'autres mécanismes, tels que la surexpression de facteurs de croissances et de récepteurs de la voie AKT-mTOR (Holderfield et al., 2014).

Les résistances acquises ou secondaires

Depuis le début de l'utilisation des thérapies ciblées anti-BRAF, les oncologues ont remarqué que la durée de la réponse est limitée par le développement de résistances. Cette réponse dure environ 6 mois à 1 an (Holderfield et al., 2014).

De nombreuses tentatives de prédiction de ces résistances ont été étudiées, en vain (Obaid et al., 2017). Et les chercheurs se sont d'abord attachés à expliquer la résistance. La plupart s'explique par une réactivation de la voie ERK. Des mutations activatrices de NRAS, MEK1/2 peuvent être responsables d'une réactivation de la voie MAPK malgré l'inhibition de BRAF (Shi et al., 2014).

De plus, la kinase MAP3K8 (COT) été montrée comme étant directement capable d'activer MEK sans passer par RAF (Johannessen et al., 2010). Un nombre élevé de copies de ce gène ainsi qu'une expression plus élevée de son ARN ont été rapportés dans les biopsies de mélanome métastatique suivant un traitement vémurafenib.

Des phénomènes de surexpression de BRAF V600 en réponse aux traitements ont aussi été retrouvés comme mécanismes de résistance aux anti-BRAF (Shi et al., 2012).

Pour finir, les résistances s'expliquent aussi par l'expression de variants d'épissage de BRAF, conférant à la protéine une capacité à se dimériser indépendamment de RAS (Poulikakos et al., 2011). Cela augmente l'activité kinase de ces protéines et l'activation conséquent de MEK. Ce mécanisme de changement de structure est l'un des premiers exemples de l'impact de l'épissage alternatif sur la capacité de la cellule à rendre une protéine résistante à un inhibiteur.

En plus des réactivations de la voie MAPK, il existe des mécanismes de résistance indépendants de la voie MAPK. Ces mécanismes sont retrouvés chez environ 30 % des patients (Shi et al., 2014). Ce sont des mécanismes identiques à ceux décrits pour les résistances innées.

De nombreux mécanismes de résistance ont été mis en évidence, mais de nombreux efforts de compréhension et de caractérisation restent à faire afin de développer de nouvelles thérapies et s'affranchir des obstacles de résistances.

PRESENTATION ET OBJECTIF DU PROJET

Contexte de l'étude

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, ces dernières années, des études ont soulevé l'importance des ARN dans la régulation des interactions protéine-protéine (Hentze et al., 2018 ; Schmitt et al., 2016). En permettant l'assemblage de complexes protéiques, les ARN non codants peuvent agir en tant que « scaffold » et ainsi favoriser et stabiliser l'interaction de ces protéines. Les ARN sont également capables d'interagir avec des protéines pour moduler leurs activités, leurs localisations ou encore leurs interactions. Cependant, le rôle potentiel des ARN dans la régulation des interactions protéine-protéine dans les principales voies de transduction du signal cytoplasmique reste largement inconnu.

Dans le cytoplasme, les voies de signalisation sont, en effet, le siège de nombreuses interactions protéiques. Ces voies constituent de véritables réseaux complexes et finement régulés. Elles sont en effet responsables de la régulation de divers phénomènes cellulaires telle que la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. La liaison d'un ligand à un récepteur membranaire déclenche une cascade de phosphorylation et d'interactions protéine-protéine qui permettent la transduction du signal.

La voie MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) fait partie des voies de signalisation les mieux connues et caractérisées, mais il subsiste de nombreuses interrogations concernant son fonctionnement. L'activité anormale de cette voie par l'augmentation de la liaison du ligand, tel que l'EGF, ou de mutations activatrices telle que la mutation V600E de BRAF, conduit à un dysfonctionnement cellulaire associé à l'initiation et à la progression tumorale.

C'est la raison pour laquelle les protéines de cette voie de signalisation constituent des cibles thérapeutiques importantes (Santarpia et al., 2012). C'est le cas de la protéine kinase oncogénique BRAF retrouvée mutée V600E dans environ la moitié des cas de mélanomes cutanés métastatiques. Les thérapies ciblées anti-BRAF (Vémurafénib) et anti-MEK (Tramétinib) développées ont permis une forte amélioration dans le traitement du mélanome cutané métastatique. Cependant, ces thérapies se retrouvent confrontées à l'émergence de résistances primaires et secondaires dont les mécanismes ne sont pas encore très bien compris, soulignant ainsi l'importance d'une étude approfondie de la voie MAPK. Une réactivation de la voie MAPK est en effet observée dans environ 70% des cas de résistance secondaire au Vémurafénib (Shi et al., 2014). L'équipe a par ailleurs montré une augmentation

significative de l'hétérodimérisation BRAF-CRAF dans les tumeurs présentant une résistance secondaire aux traitements anti-BRAF(Boussemart et al., 2016).

Objectif de la thèse

Dans ce contexte, il a donc été pertinent de s'intéresser à l'activité de liaison à l'ARN des protéines de la voie MAPK. En effet, cette voie fait intervenir de nombreuses interactions protéine-protéine qui permettent une transduction du signal efficace.

L'objectif de la thèse a consisté à :

- D'une part, rechercher et à mettre en évidence une activité de liaison directe à l'ARN de protéines impliquées dans la voie MAPK et,
- D'autre part, d'évaluer le rôle de ces interactions ARN-protéines sur la signalisation intracellulaire dans un contexte de mélanome cutané métastatique.

RESULTATS

L'objectif de la thèse a été de rechercher et de mettre en évidence une activité de liaison directe à l'ARN de protéines impliquées dans la voie MAPK et d'évaluer le rôle de ces interactions ARN-protéines sur la signalisation intracellulaire. Dans cette section, sera tout d'abord argumenté le choix des approches qui ont permis de réaliser cette étude puis d'une part, les résultats seront présentés sous la forme d'un article scientifique, d'autre part des résultats supplémentaires de l'étude seront abordés.

Choix des approches d'étude

Comme évoqué lors de l'introduction, il a été important de réfléchir à la question biologique posée afin de sélectionner les techniques d'étude des interactions protéines-ARN qui seraient pertinentes. Ici, nous nous intéressons particulièrement à l'activité de liaison potentielle à l'ARN des protéines de la voie de signalisation MAPK, sans aucune connaissance d'ARN qui serait potentiellement impliqué. Par conséquent, il a été logique de choisir une approche centrée sur nos protéines d'intérêt (Nras, Braf, Craf, MEK et KSR) et non sur un ARN d'intérêt. Les approches les plus courantes pour étudier les interactions ARN-protéines *in vivo* sont le RIP et le CLIP. La technique de CLIP, étant basée sur une irradiation UV-C à 254nm, permet de figer les interactions ARN-protéines qui sont en contact direct. Elle a donc l'avantage de démontrer le caractère direct d'une interaction protéine-ARN, contrairement aux méthodes sans crosslink tel que le RIP où l'on pourrait alors imaginer la présence d'un complexe ribonucléoprotéique et non une interaction directe ARN-protéine d'intérêt. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes orientés vers l'approche CLIP.

Par ailleurs, la voie MAPK repose sur une cascade de phosphorylations. En effet, afin d'activer la voie, les protéines RAS, RAF, MEK et ERK sont successivement phosphorylées. La protéine ERK phosphorylée pourra alors entrer dans le noyau et activer divers facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans divers processus cellulaires (e.g. prolifération, cycle cellulaire). Par conséquent, le Western Blot P-MEK et P-ERK a été la technique idéale pour monitorer l'activation de la voie MAPK.

En plus de la cascade de phosphorylations, la voie MAPK est également caractérisée par une série d'interactions protéines-protéines. La protéine BRAF est au centre de cette voie et interagit en effet avec NRAS, CRAF, MEK et KSR. De nombreuses techniques existent pour étudier les interactions protéines tels que les co-immunoprécipitations ou encore le PLA (*proximity ligation assay*). Nous nous sommes tournés vers la méthode de PLA, technique

d'immunohistochimie qui détecte des interactions *in vivo* entre deux protéines. Cette technique a l'avantage de rendre possible la visualisation des interactions puisqu'un point lumineux est le signe d'une interaction. Pour cette approche, il est nécessaire d'utiliser des anticorps primaires d'espèces différentes dirigés contre les protéines d'intérêt. Les anticorps secondaires appelés sondes PLA ont un brin d'ADN à leur extrémité. Ces anticorps secondaires vont reconnaître les primaires. Si les deux brins d'ADN sont proches, une réaction d'amplification d'ADN va avoir lieu après ajout d'enzymes (ligase et polymérase). Des sondes fluorescentes complémentaires vont pouvoir reconnaître l'ADN amplifié, l'interaction entre deux protéines sera visible par un point lumineux en microscopie.

Par conséquent, l'ensemble de ces approches nous a permis tester tout d'abord l'activité de liaison à l'ARN des protéines de la voie et d'identifier un mutant de délétion BRAF dont la liaison à l'ARN est altérée, mais également d'étudier l'activité de signalisation ainsi que les interactions protéines-protéines de la voie MAPK.

Article

An RNA binding activity of BRAF regulates the MAPK signalling pathway

Sabrina Mennour^{1,2,3}, Isabelle Girault^{4,5}, Virginie Quidville^{4,5}, Titash Sen^{1,2,3}, Hélène Malka-Mahieu^{1,2,3}, Caroline Robert^{4,5,6*}, Stéphan Vagner^{1,2,3,*}

¹Institut Curie, Université PSL, CNRS UMR 3348, INSERM U1278, Orsay, France.

²Universit e Paris-Saclay, CNRS UMR 3348, INSERM U1278, Orsay, France.

³Equipe labellis e Ligue contre le Cancer.

⁴INSERM U981, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.

⁵Universit e Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Kremlin-Bic etre, France.

⁶Dermato-Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.

*Correspondence: stephan.vagner@curie.fr, caroline.robert@gustaverousy.fr

ABSTRACT

Recent studies have underscored the importance of non-coding RNAs in the regulation of protein-protein interactions through a scaffolding activity. Oncogenic signal transduction pathways are regulated through a cascade of protein-protein interactions. Here, we demonstrate the direct RNA binding activity of proteins involved in the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) pathway, *i.e.* NRAS, BRAF (V600E) or CRAF, in BRAF (V600E)-mutated melanoma. We also show an RNA-dependent modulation of the interactions between BRAF (V600E) and CRAF or NRAS, indicating that an RNA component is involved in the stabilization of these protein-protein interactions. We specifically identify an 18 amino acids-long intrinsically disordered region located at the carboxy-terminal part of BRAF, that is necessary for RNA binding. An RNA binding deletion mutant is defective in its ability to bind CRAF and to lead to downstream MAPK pathway activation. We therefore establish here the unprecedented role of the RNA binding activity of MAPK signalling proteins in the direct modulation of the MAPK signal transduction pathway.

INTRODUCTION

In the nucleus, chromatin-bound long noncoding RNAs (lncRNAs) recruit regulatory proteins to specific loci to promote the assembly of ribonucleoprotein complexes (Sanchez Calle et al., 2018; Schmitt and Chang, 2016; Tsai et al., 2010). In the cytoplasm, multiprotein complexes constitute key molecular switches of signal transduction pathways that relay the flux of information coming from transmembrane receptors and distribute signals to a myriad of effectors. As such the regulation of protein-protein interactions is crucial in signal transduction pathways. Since cytoplasmic signaling proteins often engage in multiple protein-protein interactions, we hypothesize that lncRNAs may have a scaffolding function in cytoplasmic signaling functions.

The MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway is one of the best known and characterized signalling pathways. Commonly, the binding of an external ligand, such as a growth factor, to a transmembrane receptor triggers a cascade of phosphorylation and cytoplasmic protein-protein interactions that transduces the signal from the cell membrane to the nucleus. Following upstream signal sensing, RAS proteins are activated and can phosphorylate and recruit RAF proteins for subsequent MEK and ERK activation. Phosphorylated ERK can then enter the nucleus in order to activate a host of transcription factors regulating gene expression and diverse cellular processes (cell cycle, proliferation, migration, differentiation). This linear and basic view of the MAPK pathway has been challenged in the past few years, and many questions on the regulation of this pathway remain unanswered. Indeed, several isoforms exist for each protein of the pathway, leading to a high level of regulation complexity. Moreover, other proteins such as KSR, that act as a scaffold protein optimizing the activation process of the pathway by interacting with RAS, RAF and MEK allowing them to be located in the same cell space in close proximity to each other (Clapéron and Therrien, 2007), are also involved in the regulation of the pathway. In addition,

the abnormal activity of this pathway through increased binding of ligand, such as EGF, or activating mutations such as BRAF V600E mutation, leads to cellular dysfunctions associated with tumor initiation and progression. For that reason, proteins of this signaling pathway are critical therapeutic targets (Santarpia et al., 2012). This is particularly true in the case of the oncogenic mutated V600 BRAF protein kinase present in about 50% of the cases of metastatic cutaneous melanomas (Davies et al., 2002). This protein has been described as a central oncogenic protein involved in many protein-protein interactions in the MAPK signaling pathway (Zaman et al., 2019). The targeted anti-BRAF therapies (vemurafenib, dabrafenib or encorafenib), now combined with anti-MEK (cobimetinib, trametinib and binimetinib respectively) have led to a strong improvement in the treatment of metastatic melanoma. However, these therapies are confronted with the emergence of primary and secondary resistances with half of the patients relapsing after 12 to 15 months. In about 70% of cases of resistance to BRAF inhibitor vemurafenib, a reactivation of the MAPK pathway is observed (Shi et al., 2014). This MAPK pathway reactivation can result from additional RAS, or MEK activating mutations. In addition, a significant increase in BRAF-CRAF heterodimerization is observed in tumours of patients presenting secondary resistance to anti-BRAF treatments (Boussemart et al., 2016).

Several studies reported the large-scale identification of RNA binding proteins (Baltz et al., 2012; Castello et al., 2012; Conrad et al., 2016). No proteins from the MAPK pathway could be discovered in these studies. Only one study reported an RNA binding activity in KRAS (Siprashvili et al., 2015). KRAS interaction with small nucleolar RNAs (snoRNAs) SNORD50A and SNORD50B was shown to decrease KRAS activity because of reduced KRAS prenylation. In addition KSR contains a SAM (sterile alpha motif) domain (Koveal et al., 2012) that is able to bind RNA in other proteins (Kim and Bowie, 2003). Nonetheless, there is no reported evidence of RNA binding activity for KSR.

In this study, aiming at investigating the *in vivo* RNA binding activity of several MAPK proteins, we show that BRAF (V600E or WT), NRAS and CRAF are RNA binding proteins. We demonstrate that several MAPK protein-protein interactions partially depend on an RNA component. Finally our data indicate that a 18 amino acid-long region in the C-terminal part of BRAF is necessary for RNA binding activity and for activation of the MAPK pathway.

RESULTS AND DISCUSSION

Several MAPK signalling proteins are RNA binding proteins

Protein-RNA interactions can be studied using biochemical methods, but these approaches do not address RNA binding in its native cellular context. Initial attempts to study protein-RNA complexes in their cellular environment employed affinity purification or immunoprecipitation combined with differential display or microarray analysis (RIP-CHIP). These approaches were prone to identifying indirect or non-physiological interactions. In order to increase the specificity and positional resolution, a strategy referred to as CLIP (UV cross-linking and immunoprecipitation) was developed (Ule et al., 2005). In a CLIP strategy (Lee and Ule, 2018), the ability of proteins to directly bind to RNA is analysed following irradiations of cells by UV light of 254 nm (known to crosslink the naturally photoreactive nucleotide bases, especially pyrimidines, and specific amino acids (Phe, Trp, Tyr, Cys, and Lys). UV therefore covalently couples proteins to RNAs to which they are covalently bound *in vivo*, and does not promote protein-protein crosslinking (Greenberg, 1979 ; Pashev et al., 1991; Suchanek et al., 2005). The ability of several proteins of the MAPK signalling pathway to directly bind to RNAs was analyzed following UV irradiation of plasmid-transfected HEK293T cells. Immunoprecipitates (IP) of epitope-tagged versions of NRAS, BRAF, CRAF, KSR and MEK2 were radiolabeled with T4 polynucleotide kinase (PNK) and $\gamma^{32}\text{P}$ ATP, subjected to SDS-PAGE, transferred to a membrane and detected by either autoradiography or western blot (Fig.

1A and 1B). We observed a sharp radioactive band at the size of Myc-tagged NRAS in the UV-irradiated sample. This band was absent when the procedure was performed with non-UV exposed cells, even if Myc-tagged NRAS was present in the IP. This result indicates that NRAS is a protein that directly interacts with RNA. We could not observe any radioactive signal in both UV and non-UV irradiated cells for HA-tagged MEK2, despite the fact that the IP worked in both conditions, indicating that MEK2 shows no evidence of RNA binding activity (Fig. 1B). Strong radioactive bands at the size of GFP-tagged BRAF V600E, GFP-CRAF and GFP-KSR were observed in both UV and non-UV irradiated cells (Fig. 1C). A radioactive signal in the non-UV-irradiated cells is unusual in CLIP experiments since T4-PNK phosphorylates the 5' ends of RNA. In non-UV irradiated cells, the RNA is not covalently crosslinked to the protein and should be removed with stringent IP washes. It has however been observed that T4 PNK can occasionally phosphorylate proteins. In order to understand the presence of a radioactive signal in the non-UV exposed cells for BRAF V600E and CRAF, we extracted RNAs from ³²P-labelled RNA-BRAF complexes, RNA-CRAF complexes and RNA-NRAS complexes both in UV and non-UV-irradiated cells where a signal was present (Fig. 1A). We loaded the extracted RNA on a denaturing TBE-Urea gel and revealed the radioactive signal by autoradiography (Fig. 1D). We found that nucleic acids migrating as a smear of about 10-100 nucleotides were extracted from the UV irradiated samples. In contrast, no signal was detected in the non-UV irradiated conditions, indicating that the proteins were directly labelled by T4 PNK. To investigate whether BRAF, CRAF and NRAS interact with RNA in the UV-treated condition, we used RNase A, an endoribonuclease that preferentially cleaves single-stranded RNAs specifically on the 3' side of pyrimidine residues. The smear totally disappeared following RNase A treatment showing that these entities are indeed RNAs (Fig. 1D). These data demonstrate that the tagged versions of BRAF V600, CRAF and NRAS are covalently crosslinked to RNAs following UV irradiation. Of note, the pattern of radioactive signals for

KSR was too complex to perform the RNA extraction experiments and to conclude on the RNA binding activity of KSR.

To further investigate the RNA binding activity of these proteins with an alternative approach, we performed complex capture (2C) experiments that use the property of silica matrices to strongly and specifically retain negatively-charged molecules and covalently-bound complexes (Asencio et al., 2018) (Fig. 1A). Both BRAF V600E and BRAF, similarly to the well characterized RNA binding protein HuR, were retained on the silica matrix in a UV-dependent manner (Fig. 1E). H3, a protein that is not expected to bind RNAs, was not retained on the column. Sensitivity of the signal to RNase A treatment prior to loading on the column supports the conclusion that BRAF V600E and BRAF are RNA binding proteins. Since the CLIP experiments were not conclusive for KSR, we also performed the 2C experiment with KSR. We found that KSR was poorly retained on the column, albeit in an RNase A-dependent manner.

Altogether, BRAF V600E, BRAF, CRAF and NRAS are RNA binding proteins, while MEK2 shows no evidence of RNA binding activity. A definitive conclusion on the RNA binding activity of KSR cannot be reached. Regarding BRAF, our results indicate that the RNA binding activity is not dependent on the BRAF V600E mutational status.

BRAF V600E directly interacts with RNA in melanoma cell lines

We next intended to focus on BRAF and to study the interaction of endogenous BRAF-V600E to RNA in BRAF-V600 mutated melanoma cell lines. We performed CLIP experiments in human MALME3M-R which expressed high levels of BRAF-V600E protein (Boussemart et al., 2016) (Fig. 2A). We observed a sharp radioactive band at the expected size of BRAF when cells were UV irradiated and the extract was treated with high doses of RNase A (Fig. 2A). No

signal was detected when cells were not exposed to UV and therefore no RNA-protein crosslinks are formed (Fig. 2A). In the low RNase A treatment condition, the radioactive signal appears as a low intensity smear, which is due to spreading of the signals, the protein being crosslinked to RNA fragments of varying lengths. This experiment shows that endogenous BRAF-V600E, similarly to ectopically expressed GFP-BRAF-V600E is an RNA binding protein.

To further demonstrate the ability of endogenous BRAF-V600E to bind RNA, we used the alternative OOPS (orthogonal organic phase separation) approach to study RNA-protein interactions in another (A375) human BRAF-V600 mutant melanoma cell line. OOPS is an unbiased technique based on the use of acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC: commercially available as TRIzol) where RNA-UV crosslinked proteins are enriched in the aqueous-organic interphase because they share the physico-chemical properties of both RNA and protein (ref). We observed a strong signal for both BRAF-V600E and HuR in the UV-exposed cells (Fig 2B). Sensitivity of the signal to RNase A treatment prior the OOPS confirms that BRAF V600E is an RNA binding protein. No differences were seen in the MEK2 signal obtained in the different conditions showing the specificity of the approach. Overall these results validate the RNA binding activity of endogenous BRAF in several melanoma cell lines.

The interaction between BRAF V600E and several of its protein partners partially depends on an RNA component

As described in the introduction, the role of RNA-protein interactions in MAPK signalling proteins could be to stabilize protein-protein interactions. To evaluate if RNA entities are involved in the stabilization of the interaction between BRAF and its protein partners, we first used an *in situ* analysis of BRAF-CRAF interactions using a Proximity Ligation Assay (PLA) technology (Boussemart et al., 2014, 2016). Cell permeabilization of living cells was followed

by a short RNase A treatment to monitor the dependency of the protein-protein interaction on RNAs. We observed that RNase A treatment led to a 2-fold decrease in BRAF-V600E/CRAF interactions in the three tested BRAF-V600E mutated cell lines (MALME3M-R, MALME3M-S and A375) (Fig. 3). This effect is specific since RNase H, an endoribonuclease that catalyzes the cleavage of RNA in an RNA/DNA hybrids had no effect on this interaction, and since RNase A had no effect on the interaction between eIF4E and 4EBP1 that was used as a control. BRAF is involved in many protein-protein interactions in the MAPK pathway. We therefore assessed whether, beyond the interaction between BRAF-V600E and CRAF, RNAs are involved in the interactions between BRAF-V600E and either CRAF, MEK1/2, NRAS or KSR. PLA experiments in the presence or not of increasing doses of RNase A indicated that RNase A treatment led to a decrease in the interaction between BRAF, NRAS or KSR, but not between BRAF and MEK1 or MEK2 (Fig. 4). Of note, these RNA dependencies for protein-protein interactions with BRAF-V600E are in agreement with the results obtained on RNA binding activities of the tested proteins since CRAF, NRAS and probably KRS interact with RNA, while MEK2 and probably MEK1 do not interact with RNA. Overall, these data indicate that RNAs stabilize the interaction between BRAF-V600E and NRAS, CRAF or KSR and suggest that they might have important roles in the activation of the MAPK pathway.

The amino-terminal half of BRAF-V600E is not involved in RNA binding

In order to study the role of the RNA binding activity of BRAF in the MAPK signalling pathway, we set up to find a BRAF deletion mutant impaired in its ability to bind RNA. We therefore generated a series of plasmids expressing partially deleted versions of BRAF (Fig. 5A) and performed CLIP experiments on plasmid-transfected HEK293T. We tested the impact of deleting the first 150 amino acids (containing the BRS domain) (Δ N150) or the first 360

amino acids from the N-terminal part of BRAF-V600E (containing the RAS binding domain (CR1)) (Δ N360). As for the full length BRAF-V600E protein, strong radioactive bands at the expected size of Δ N150 and Δ N360 were observed in both UV and non-UV irradiated cells (Fig. 4B). RNAs were present in the radioactive band obtained in the UV+ condition, but not in the UV- condition (Fig. 5C), showing that both Δ N150 and Δ N360 interact with RNAs. We next deleted a short region at the C-terminal part of BRAF-V600E in the Δ N360 construct (Δ N150-C718). We could not observe any radioactive signal at the expected size of Δ N360-C718 in both UV and non-UV irradiated cells, despite the fact that the IP worked in both conditions, indicating that Δ N360-C718 shows no evidence of RNA binding activity (Fig. 5B). These conclusions were confirmed by 2C experiments. As for the full length BRAF-V600 protein, Δ N150 and Δ N360, but not Δ N360-C718, were retained on the silica matrix in a UV-dependent manner (Fig. 5D). Sensitivity of the signal to RNase A treatment prior to loading on the column (Fig. 5D) supports the conclusion that Δ N150, Δ N360, but not Δ N360-C718, are RNA binding proteins.

These data demonstrate that the N-terminal half of BRAF-V600E containing the Ras binding domain is not necessary for RNA binding, and points to a role of the extreme C-terminal part (48 amino acids) in RNA binding.

An 18 amino acid-long region located in the C-terminal part of BRAF is necessary for RNA binding

To ascertain that deletion of the C-terminal 48 residue-long region of BRAF-V600E prevents RNA binding in the context of the full-length protein, we generated the Δ C718 construct (Fig. 5A). We also tested a construct expressing a slightly less truncated (29 residues) BRAF-V600E (Δ C735). We observed a sharp radioactive band at the expected size of Δ C735, but not Δ C718,

when cells were UV irradiated and the extract was treated with high doses of RNase A (Fig. 5E). Altogether these results indicate that an 18 amino acid-long region (ARSLPKIHRSASEPSNLR) located at the C-terminal part of BRAF is necessary for RNA binding.

The RNA binding activity of BRAF V600E is involved in the activation of the MAPK signalling pathway

To understand the role of the RNA binding activity of BRAF in the MAPK signalling pathway, we explored the level of activation of the MAPK pathway by analyzing (i) the interaction between the truncated BRAF proteins and CRAF and (ii) the phosphorylation of MEK and ERK.

PLA was used to assess the interactions between the different BRAF deletion mutants and CRAF following transfection of corresponding plasmids in A2058 melanoma cell line (Fig. 6A). We didn't observe differences in the number of PLA spots for all interactions tested between endogenous CRAF and transfected full-length, $\Delta C735$ or $\Delta C718$ BRAF-V600 proteins (Fig. 6A). This does not mean that preventing RNA binding activity has no effect on the stability of BRAF-CRAF interactions because the number of dots will highly depend on the transfection efficiencies. We therefore analyzed the dependency on RNAs for the interactions. We showed that RNase A treatment led to a decrease in BRAF-CRAF and $\Delta C735$ -CRAF interactions (Fig. 6A). Thus, RNA entities are able to modulate these protein-protein interactions when BRAF is able to interact with RNA. In contrast, RNase treatment had no effect on $\Delta C718$ -CRAF interactions (Fig. 6A). This is fully consistent with the lack of RNA binding activity in the $\Delta C718$ protein. This set of experiments validated the relevance of the constructs to study the influence of RNA binding on the activation of the MAPK pathway.

We therefore set up to analyze the activation of the MAPK pathway in the BRAF WT HEK-293 cell line. Expression of BRAF-V600E led to increased phosphorylation of ERK and MEK, as observed by western blot (Fig. 6B). Expression of the Δ C718 truncated BRAF protein, which harbors no RNA binding activity, did not lead to increased ERK/MEK phosphorylation. Expression of the Δ C735 protein, that is able to bind RNAs, led to an increased MEK phosphorylation and a moderate ERK phosphorylation. Altogether these results demonstrate that the RNA binding activity of BRAF stabilizes several BRAF-CRAF interactions and is necessary for the activation of the MAPK pathway.

In conclusion, we found that several MAPK proteins (*i.e.* NRAS, BRAF, CRAF, KSR) are RNA-binding proteins while some others (*i.e.* MEK2) are not. Although a definitive conclusion on KSR cannot be reached on CLIP experiments, the 2C experiment indicate that KSR is an RNA binding protein. Our data on NRAS is consistent with a published study demonstrating that its homolog KRAS is an RNA-binding protein that interacts with 2 snoRNAs (Siprashvili et al., 2015). The role of the KRAS-snoRNAs interaction was however not related a scaffolding function, since snoRNAs were shown to inhibit KRAS prenylation and activity.

Importantly, our study demonstrates that RNAs modulate protein-protein interactions in the MAPK pathway, indicating that RNAs, acting as scaffolds, are involved in the stabilization and regulation of several protein-protein interactions (BRAF-CRAF, BRAF-NRAS, BRAF-KSR) in the MAPK pathway. It is striking to note that the RNA dependence on protein-protein interactions was only observed for proteins demonstrating an RNA binding activity (NRAS, CRAF, KSR) but not for the BRAF-MEK interaction. This suggests that RNAs could stabilize certain protein-protein interactions, thus supporting their roles as scaffolds.

Focusing on BRAF, we identified a BRAF deletion mutant impaired in its RNA binding activity. Supporting the scaffolding hypothesis, the BRAF deletion mutant–CRAF interaction is not decreased by RNase treatment.

The BRAF deletion mutant impaired in RNA binding is missing 18 amino acids in the C-ter region that lacks canonical RNA binding domains. It only includes a disordered region that can constitute an RNA binding domain (Järvelin et al., 2016). Disordered RNA binding domains show strong adaptability, bind to several RNA targets and are able to form RNA-protein granules during phase separation phenomena. We can thus anticipate that BRAF can interact with several different RNA targets and promote the clustering in the same cell space of several proteins (BRAF, NRAS, KSR, CRAF) similar to what happens during phase separation phenomena (Ceballos et al., 2018). In this context, RNAs could act as a scaffold forming an architectural platform stabilizing protein-protein interactions in a precise subcellular space, that we could consider as a "signalling body".

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

HEK293T, A2058 and Malme-3M cell lines used in this study were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Cancer cell lines were maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. A2058 and HEK293T were respectively grown in MEM or DMEM growth media both supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine. The Malme-3M resistant cells were grown in IMDM media supplemented with 20% FBS. Malm-3M cells were treated with BRAF inhibitor Vemurafenib 1 μM (Selleckchem S1267).

Plasmid cloning

NRAS-myc and MEK2-HA plasmid constructs were kindly given by the Eychène team (Institut Curie). BRAF-GFP, CRAF-GFP, KSR-GFP and BRAF multiple deletions constructs were designed and cloned using the Gateway™ cloning technology (Gateway™ Vivid Colors™ pcDNA™6,2/Vecteur C-EmGFP-DEST - V35520 - Thermofisher) following manufacturers' instructions.

Plasmid transfections

Plasmid transfections were performed using Jet PEI (Polyplus Transfection 101-10N) according to manufacturer's instructions. In brief, transfections were performed in 10 cm dishes containing 40% confluent HEK293 cells in 10 mL DMEM, 5% FBS, and 2 mM L-glutamine to which 600 μL of the transfection mix of 150 mM NaCl containing 3 μg plasmid with 6 μl Jet PEI, were added. Braf deletion plasmids were designed using the Gateway™ cloning technology (Gateway™ Vivid Colors™ pcDNA™6,2/Vecteur C-EmGFP-DEST - V35520 - Thermofisher).

Cell lysis

Total cell extracts were prepared by harvesting cells in cold PBS and lysed for 1h in RIPA buffer (50 mM Tris- HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate) for CLIP and Western Blot experiments, in co-IP buffer (50mM Tris-Cl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% NP40, 1mM EDTA) for co-IP experiments or in HMGN150 buffer (20 mM Hepes, pH 7.5; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0.5% NP-40; and 10% glycerol) for 2C experiments. Lysis buffers were supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche) and a phosphatase inhibitor cocktail (Thermo) before the addition to the cell pellet. Protein concentration was estimated by the BCA method (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, USA) using the BCA Protein Assay Kit (Thermofisher).

Crosslinking and immunoprecipitation (CLIP)

Cells were irradiated with UV-C light at 254nm, lysed in RIPA buffer and immunoprecipitated with GFP trap dynabeads (ref), myc-tagged dynabeads beads(ref), or HA-tagged dynabeads(ref) beads. Immunocomplexes were washed twice with RIPA-S buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate) and twice with a PNK buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2% Tween 20). Then, crosslinked complexes were radiolabelled using ATP, [γ -³²P] (PerkinElmer) and T4 polynucleotide kinase (Thermofisher). Following the labelling, samples were washed twice with RIPA-S buffer and twice with PNK buffer. Elution of immunocomplexes was performed using LDS 1X buffer (LDS 4X and reducing agent 10X (Thermofisher) in PNK buffer)). Protein-RNA complexes were loaded on a SDS- PAGE gel, then the gel was dried and complexes were visualized by exposure to a phosphoimager screen. In the case where RNA was extracted, RNA-proteins complexes were transferred onto a nitrocellulose membrane 0.45 μ m and complexes were visualized by exposure to a phosphoimager screen. The nitrocellulose membrane was cut out at the expected molecular weight of the radiolabelled protein of interest.

Nitrocellulose pieces were treated with proteinase K (1 mg/ml) in 200 μ l of PK buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA), once without urea for 20 min and then once with urea 7M for 20 min. RNA was purified with one volume (400 μ l) of phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 (Sigma) and then precipitated by adding Glycoblue, sodium acetate and 100% ethanol overnight. After centrifugation and washes (80% ethanol), RNA pellet was resuspended in water and divided into two conditions. One condition without treatment, one with RNase A treatment (1 μ l at 10 mg/ml). They were loaded on a denaturing polyacrylamide gel (TBE-Urea gel, 6%, ThermoFisher). After the migration, the gel was dried and RNA was visualized by exposure to a phosphorimager screen.

SDS-PAGE and Western blot assays

Cells were harvested into an ice-cold PBS and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes at 4°C. The cell pellet was resuspended in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Roche) and a cocktail of phosphatase inhibitors (ThermoFisher). Protein concentration was estimated by BCA method, equal amount was taken for each sample. LDS 1X and reducing agent 1X were added to lysates. The samples were heated at 70°C for 10 min before separation in polyacrylamide gels by SDS- PAGE. Following the migration, proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (0.45 μ m) using the dry blotting system (iBlot from ThermoFisher) and detected by using specific primary antibodies, listed below. After washing the membrane, the secondary antibodies (HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG from Sigma) were used. Proteins were detected using ECL (Bio-Rad Laboratories). H3 antibody was used as a marker of equal loading. The ImageLab software was used for contrast adjustment of the images.

Antibodies:

- Anti-GFP Roche 11814460001
- MEK1/2 antibody Cell Signalling technology #9122
- Phospho MEK1/2 (Ser217/221) Cell Signalling technology #9154
- P44/42 MAPK (Erk1/2) antibody Cell Signalling technology #9102
- Monoclonal Anti-MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated ERK-1&2) antibody Sigma #M8159
- Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary mouse and rabbit antibodies were purchased from Sigma.

2C Complex capture

2C experiments were performed using commercial buffers and silica-based columns from the Zymo Research “Quick-RNA Midiprep Kit” #1056 following manufacturers’ instructions and following recommendations from “Extraction of nucleic acid-bound proteins by 2C” Claudio Asencio, Aindrila Chatterjee, Matthias W Hentze. Life Science Alliance Jun 2018, 1 (3) e201800088; DOI: 10.26508/lsa.201800088.

Proximity Ligation assay (PLA)

PLA is an immune straining method that allows the specific detection of protein-protein interactions in cells when the target proteins are in close proximity (within 40nm). The protein-protein interactions are visualized as an individual fluorescent spot. Interactions between Braf and Craf (Braf-Craf), Braf and Nras (Braf-Nras), Braf and MEK1 (Braf-Mek1), Braf and Mek2 (Braf-Mek2), Braf and Ksr (Braf-Ksr), or eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIFG4G) were detected by in situ proximity ligation assay (PLA) in Malme-3M melanoma cell lines. The BRAF-GFP deletion constructs –CRAF interaction was detected by PLA in the A2058 melanoma cell line

after a 48h transfection using JetPEI. RNase A treatments (2 min at 37°C) were performed after a permeabilization step on lived cells. Then PLAs were performed on fixed and permeabilized cells.

The PLA protocol was followed according to the manufacturers' instructions (Sigma), with incubation of the primary antibodies at 37°C for 1h. After blocking, the antibodies were used at the following concentrations: for eIF4E (mouse, clone A-10, #SC-271480, Santa Cruz Biotechnology, 1:200); for eIF4G (rabbit, #2498; Cell Signalling Technology, 1:200), for CRAF (rabbit, Invitrogen, 1:500) and for GFP (mouse, #11814460001, Roche), 1:2000. PLA minus and PLA plus probes (containing the secondary antibodies conjugated to oligonucleotides) were added and incubated for 1h at 37°C. Ligase was used to join the two hybridized oligonucleotides into a closed circle. The DNA was then amplified by a polymerase with a rolling circle amplification, and detection of the amplicons was carried out using the Far Red detection kit for fluorescence. Cell membranes were stained using phalloidin (alexa fluor 488, Invitrogen). Then the slides were mounted with Olink Mounting Medium containing 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain cell nuclei.

The first results (figure 3) were visualized by an Olympus VS120 microscope and the number of PLA signals per cell was counted by the image analyse software from Olympus (VS-ASW-FL, Olympus). The second slides results (figure 4) were visualized using a Nikon Eclipse Ti microscope and analyzed using an acquisition image software (NIS Elements AR, NIKON).

Microfluidic western blotting

Microfluidic western blotting was performed using the Simple Western size-based protein assay (Wes ProteinSimple), a combination of capillary electrophoresis and immunodetection techniques, following the manufacturer's protocols.

Briefly, 0.1% of input and total 2C elute were mixed at a 4:1 ratio with a 5X fluorescent master mix containing SDS, DTT (40 mM) and fluorescent molecular weight standards, and heated at 95 °C for 5 min. Samples and biotinylated molecular weight standards were loaded along with blocking reagent, primary antibodies against GFP (1:200, Roche), HRP-conjugated secondary antibodies, wash buffer and chemiluminescent substrate into a microplate prefilled with staking and separation matrices. Fully automated western blotting was performed: proteins were separated by electrophoresis at 375 V for 25 min, immobilized to the capillary by UV crosslinking and incubated with primary and secondary antibodies for 30 min each. Chemiluminescent signal was captured by a CCD (charge-coupled device) camera and the resulting image was analyzed by Compass software (ProteinSimple) and expressed as synthetic bands.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Several MAPK signalling proteins are RNA binding proteins. **A.** Experimental scheme. **B. and C.** Upper panels: SDS-PAGE autoradiography of the CLIP experiments performed with the indicated proteins in non-UV (-) and UV (+) irradiated HEK293T transfected cells. Lower panels: corresponding western blot; IP: immunoprecipitation and input (10%). The arrow indicates the position of the expected migration for each protein. **D.** Left panel: RNA extraction of NRAS UV+ signal from the CLIP experiment (A) in UV Middle panel: RNA extraction of BRAF V600E both UV- and UV+ signal from the CLIP experiment (B). Right panel: RNA extraction of CRAF both UV- and UV+ signal from the CLIP experiment (B). **E.** Western blot of 2C experiments in both UV and non-UV irradiated HEK293T transfected cells (BRAF-V600E, BRAF or KSR). The RNA-binding protein HuR was used as a positive control, and the RNase treatment of cell lysate prior 2C is used as a negative control.

Figure 2. BRAF V600E directly interacts with RNA in melanoma cell lines. **A.** Upper panel: SDS-PAGE autoradiography of endogenous BRAF V600E CLIP in UV-exposed (UV+) and untreated (UV-) Malm 3M BRAF V600E melanoma cells. The arrow indicates the expected size of BRAF V600E. Lower panel: western blot of endogenous BRAF V600E in the IP and the input (10%). **B.** Western blot of OOPS experiment in both UV-exposed (UV+) and untreated (UV-) A375 BRAF V600E melanoma cells. RNA-binding protein HuR was used as a positive control, and the RNase treatment of cell lysate prior to loading to the column is used as a negative control as well as MEK1/2.

Figure 3. An RNA component is involved in stabilizing BRAF-CRAF interaction. BRAF-CRAF interaction visualized by PLA in MALM 3M S, MALM 3M R and A375 cells treated with RNase A, H or left untreated (mock). Each red dot corresponds to one BRAF-CRAF interaction outside of the DAPI-stained nuclei. The white numbers indicate the mean +/- s.d. The eIF4E-4EBP1 interaction is used as a control.

Figure 4. The interaction between BRAF V600E and several of its protein partners partially depends on an RNA component. A. BRAF-CRAF, BRAF-MEK1, BRAF-MEK2, BRAF-KSR interaction visualized by PLA in MALM 3M R cells treated or not with RNase A. Each yellow dot represents one interaction. Cell nucleus are stained in blue (DAPI) and cell membrane in green (phalloidin). The white numbers indicate the mean of dots per cell after counting with image analysis software (Nikon). The eIF4E-4EBP1 interaction is used as a control. B. Quantification of the effects of increasing RNase A concentrations on protein-protein complexes involving BRAF determined by PLA.

Figure 5. An 18 amino acid-long region located in the C-terminal part of BRAF is necessary for RNA binding. A. Schematic representation of the BRAF V600E deletion constructs used for transient expression in HEK293T cells. B. Upper panel: SDS-PAGE autoradiography of BRAF V600E (Full length), Δ N150, Δ N360 and Δ N360-C718 CLIP in UV-exposed (UV+) and untreated (UV-) HEK293T transfected cells. The arrow indicates the expected size of the migration for each protein. Lower panel: western blot of IP and input 10%. C. RNA extraction of BRAF Full-length, Δ N150, Δ N360 for both UV- and UV+ signals from the CLIP experiment (B). D. Western blot of 2C experiments in both UV-exposed (UV+) and untreated (UV-) HEK293T transfected cells (BRAF Full-length, Δ N150, Δ N360 and Δ N360-C718). RNase A treatment of cell lysate prior 2C is used as a control. E. SDS-PAGE

autoradiography of $\Delta C718$ and $\Delta C735$ CLIP in UV-exposed (UV+) and untreated (UV-) HEK293T transfected cells. The arrow indicates the expected size of the proteins. Lower panel: western blot of IP and input 10%.

Figure 6. The RNA binding activity of BRAF V600E is involved in the activation of the MAPK signalling. **A.** Scatter plot of the number of dots corresponding to BRAF full length-CRAF, $\Delta C735$ -CRAF and $\Delta C718$ -CRAF in PLA experiments performed in A2058 transfected cells treated with or not with RNase A. The significance for the difference between RNase A treated and untreated values was derived from the Mann-Whitney statistical test. Bars represent the median (numbers above) and 95% CI. **** $p < 0.0001$. ns : not significant. **B.** Western blot analysis of MAPK signalling activity with antibodies specific for phosphorylated (P-) or total proteins as indicated in HEK293 transfected cells. H3 is used as a loading control.

REFERENCES

- Asencio, C., Chatterjee, A., and Hentze, M.W. (2018). Silica-based solid-phase extraction of cross-linked nucleic acid-bound proteins. *Life Sci. Alliance* 1, e201800088.
- Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., et al. (2012). The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Mol. Cell* 46, 674–690.
- Boussemart, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., Thomas, M., Basmadjian, C., Ribeiro, N., Thuaud, F., et al. (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* 513, 105–109.
- Boussemart, L., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Mateus, C., Routier, E., Rubington, M., Kamsu-Kom, N., Thomas, M., Tomasic, G., Agoussi, S., et al. (2016). Secondary tumors arising in patients undergoing BRAF inhibitor therapy exhibit increased BRAF-CRAF heterodimerization. *Cancer Res.* 76, 1476–1484.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., et al. (2012). Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* 149, 1393–1406.
- Ceballos, A.V., McDonald, C.J., and Elbaum-Garfinkle, S. (2018). *Methods and Strategies to Quantify Phase Separation of Disordered Proteins* (Elsevier Inc.).
- Clapéron, A., and Therrien, M. (2007). KSR and CNK: Two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene* 26, 3143–3158.
- Conrad, T., Albrecht, A.S., De Melo Costa, V.R., Sauer, S., Meierhofer, D., and Ørom, U.A. (2016). Serial interactome capture of the human cell nucleus. *Nat. Commun.* 7, 1–11.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 409, 949–954.

Greenberg, J.R. (1979). *Nucleic Acids Research*. 6, 715–732.

Järvelin, A.I., Noerenberg, M., Davis, I., and Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun. Signal*. 14.

Kim, C.A., and Bowie, J.U. (2003). SAM domains: Uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem. Sci.* 28, 625–628.

Koveal, D., Schuh-Nuhfer, N., Ritt, D., Page, R., Morrison, D.K., and Peti, W. (2012). A CC-SAM, for coiled coil-sterile α motif, domain targets the scaffold KSR-1 to specific sites in the plasma membrane. *Sci. Signal*. 5, 1–14.

Lee, F.C.Y., and Ule, J. (2018). Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol. Cell* 69, 354–369.

Sanchez Calle, A., Kawamura, Y., Yamamoto, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2018). Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. *Cancer Sci.* 109, 2093–2100.

Santarpia, L., Lippman, S.M., and El-Naggar, A.K. (2012). Targeting the MAPKRASRAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 103–119.

Schmitt, A.M., and Chang, H.Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* 29, 452–463.

Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* 4.

Siprashvili, Z., Webster, D.E., Johnston, D., Shenoy, R.M., Ungewickell, A.J., Bhaduri, A.,

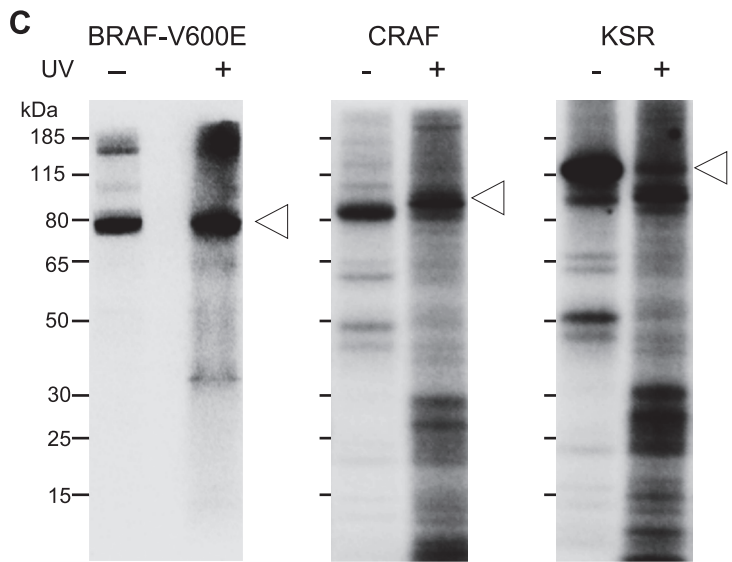
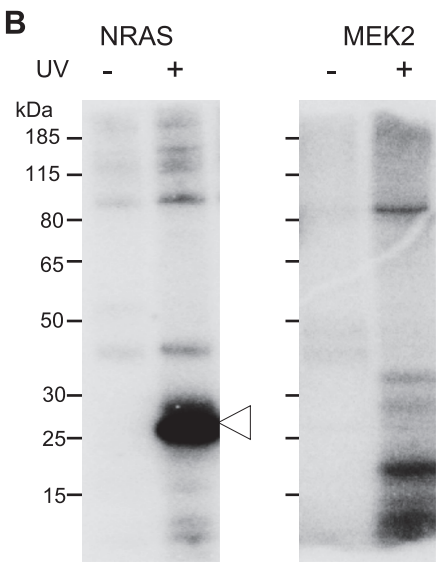
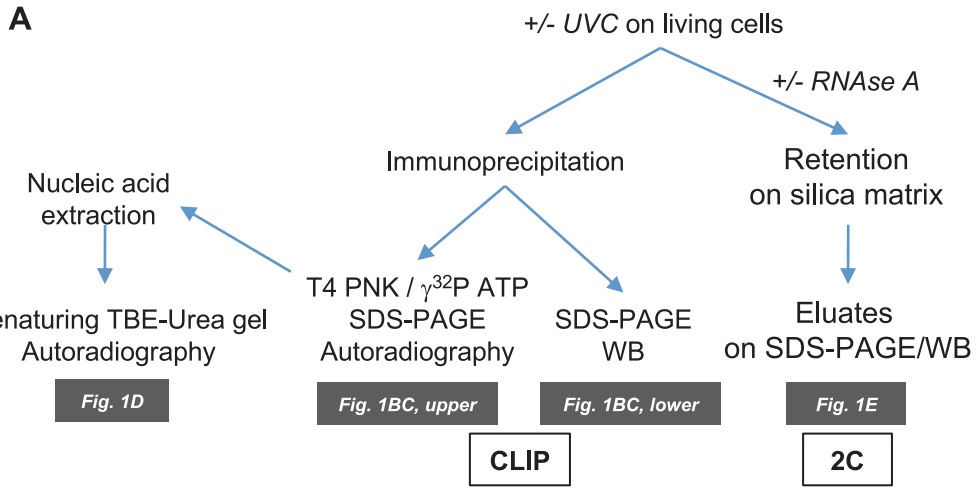
Flockhart, R., Zarnegar, B.J., Che, Y., Meschi, F., et al. (2015). The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. *Nat. Genet.* 48, 53–58.

Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* (80-.). 329, 689–693.

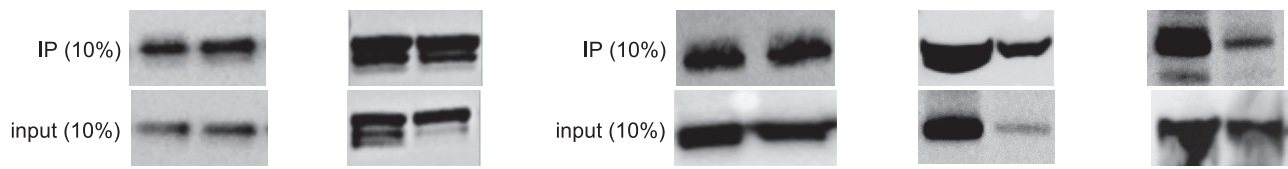
Ule, J., Jensen, K., Mele, A., and Darnell, R.B. (2005). CLIP: A method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* 37, 376–386.

Zaman, A., Wu, W., and Bivona, T.G. (2019). Targeting oncogenic braf: Past, present, and future. *Cancers (Basel)*. 11.

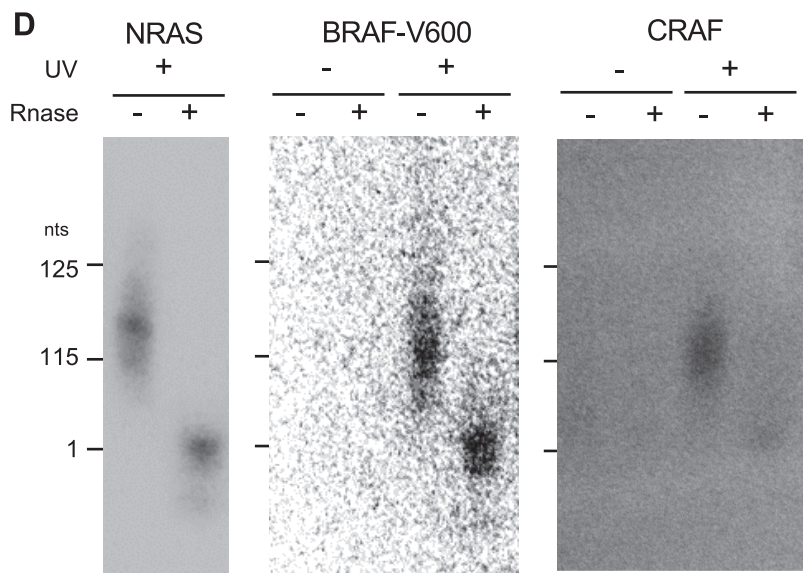
Figure 1



CLIP (SDS-PAGE-autoradiography)



Western Blot



Denaturing TBE-urea gel-autoradiography

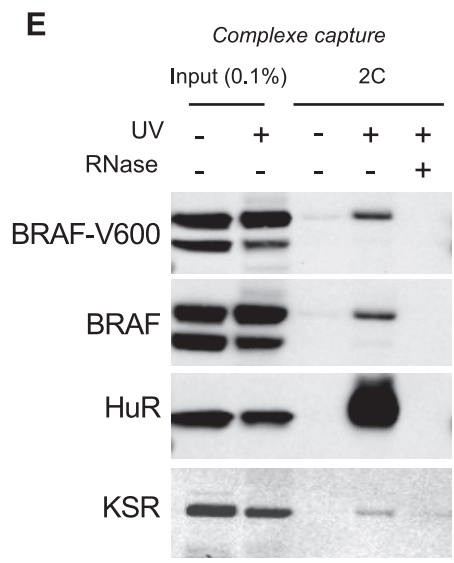


Figure 2

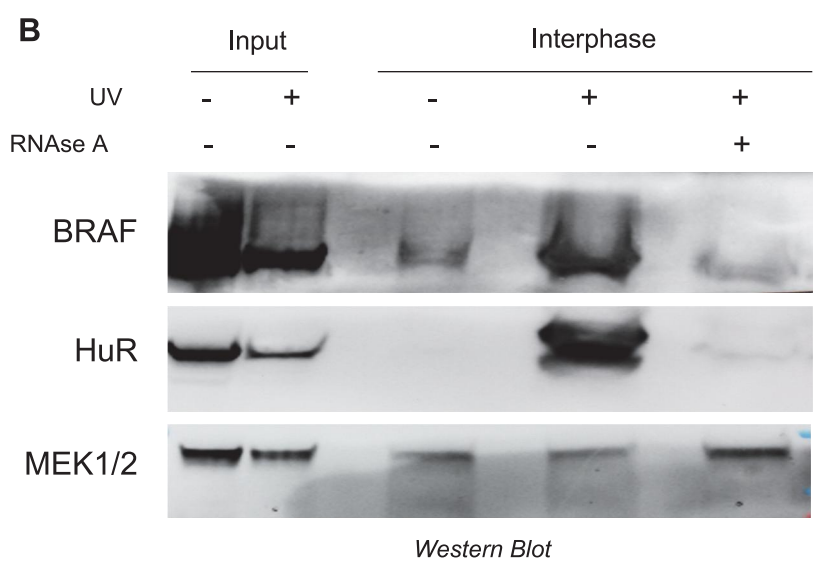
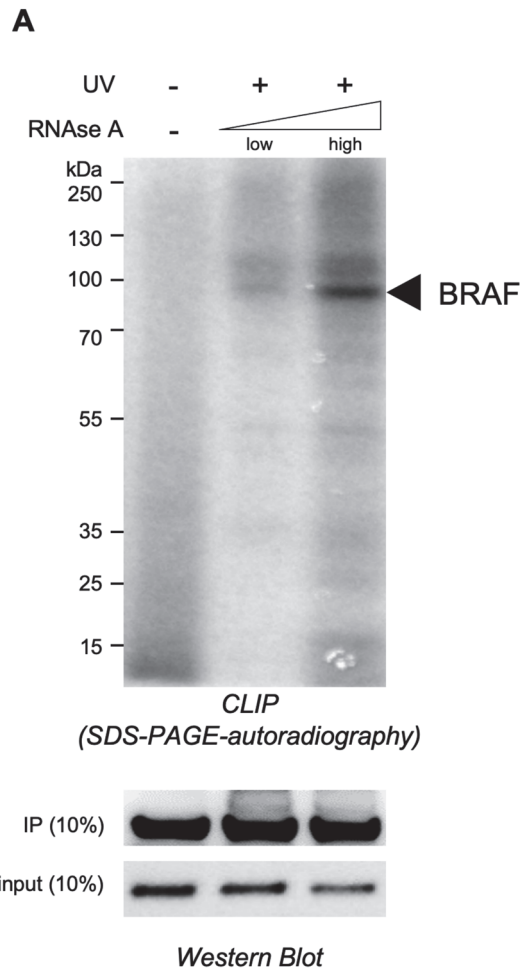


Figure 3

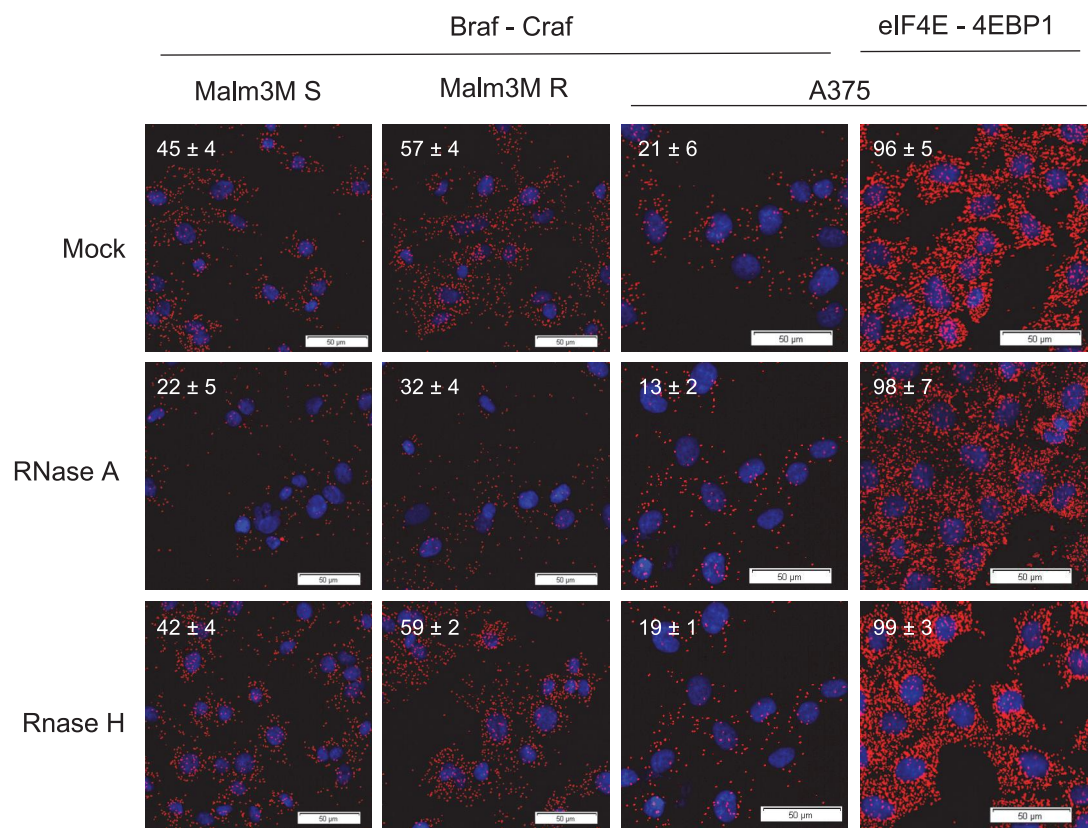


Figure 4

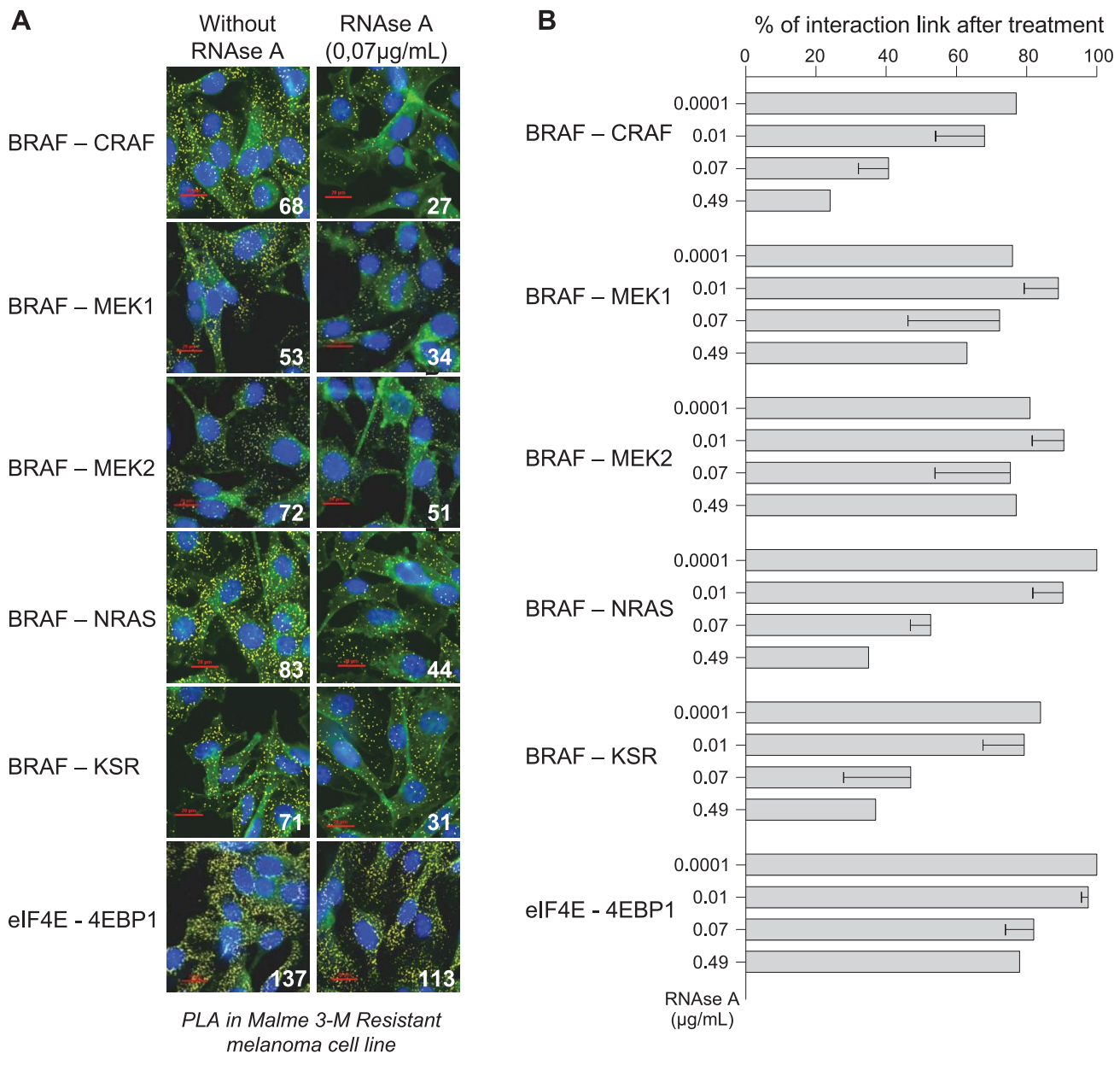


Figure 5

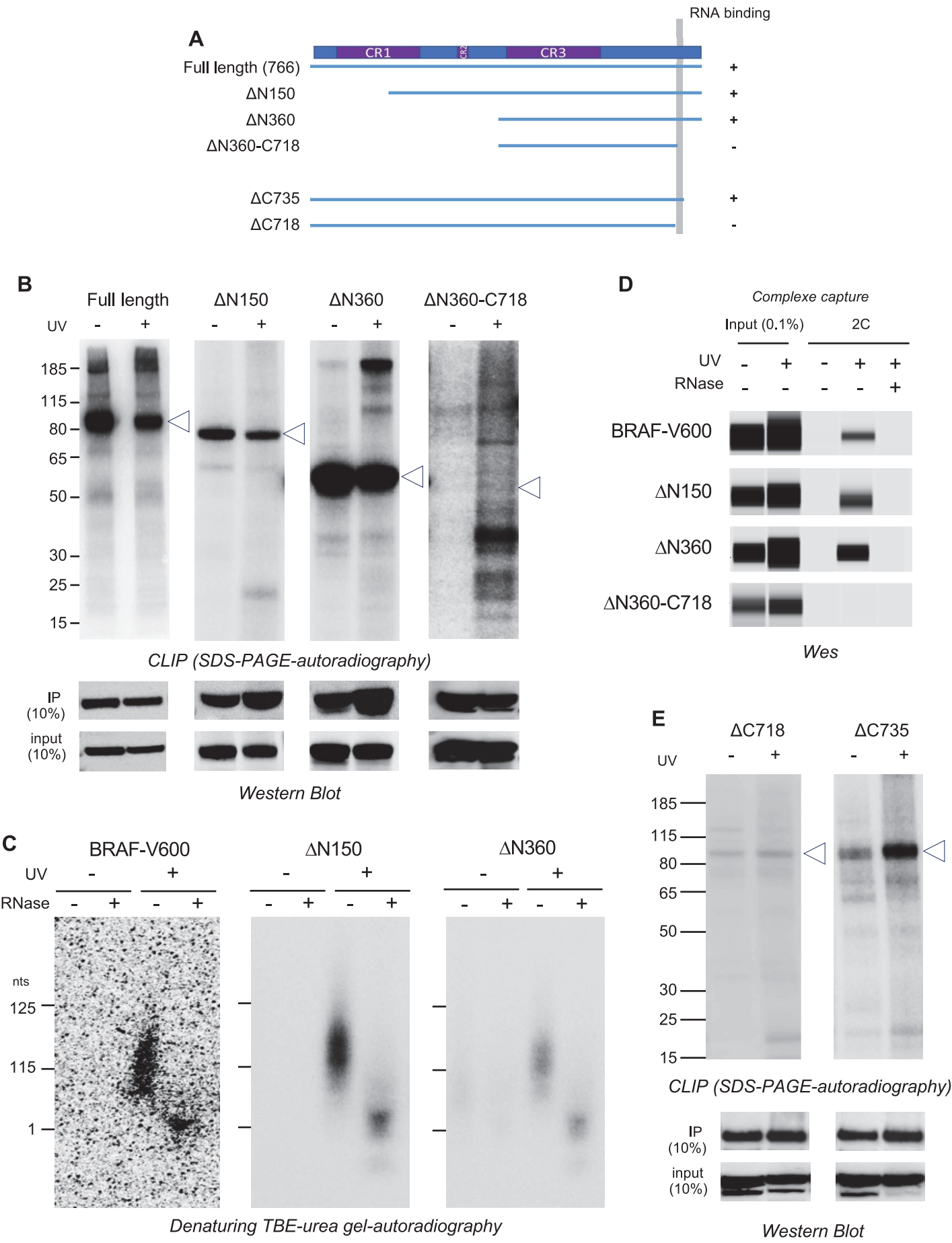
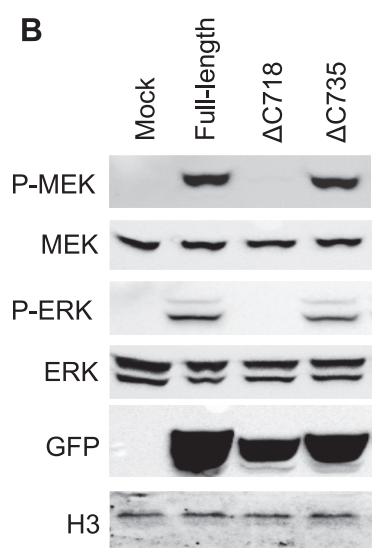
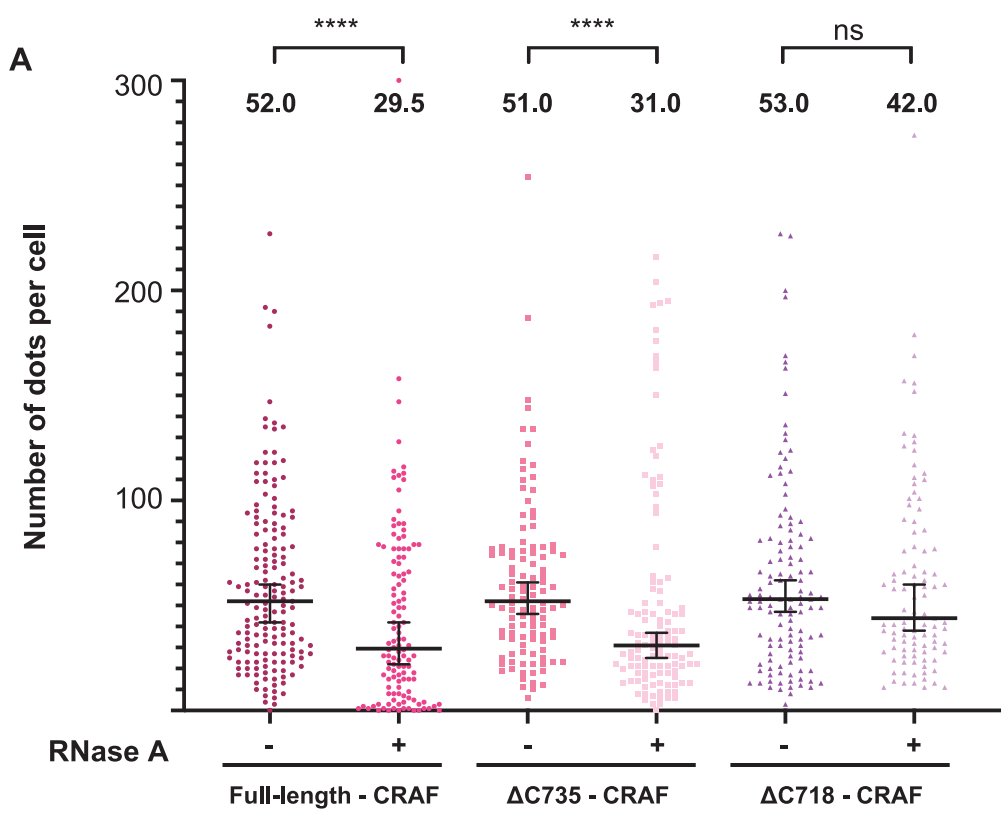


Figure 6



Résultats supplémentaires

L'ensemble des résultats présentés dans l'article suggère que plusieurs protéines de la voie MAPK sont capables d'interagir avec l'ARN et qu'une composante ARN est d'ailleurs impliquée dans la régulation de la voie et de ses interactions protéine-protéine.

En conséquence, la question qui s'est ensuite posée a été : quels sont les ARN capables d'interagir avec les protéines de liaison aux ARN de la voie MAPK (NRAS, BRAF, CRAF et KSR) ?

Afin d'identifier ces ARN, nous avons établi une collaboration avec l'équipe d'Hervé le Hir à l'ENS (Paris). Deux iCLIP de la protéine BRAF ont ainsi pu être réalisées sur la lignée MALM-3M-R exprimant fortement BRAF V600E (Boussemart et al., 2016).

L'iCLIP est une technique de CLIP-seq améliorée, tout comme le CLIP, elle repose sur l'utilisation des UV-C à 254nm pour figer les interactions directes ARN-protéines. Une digestion partielle du lysat à la RNase A est réalisée, puis les complexes ARN-BRAF sont purifiés par immunoprécipitation. Des adaptateurs sont ligués sur les ARN du complexe, la protéine BRAF est éliminée par une digestion à la protéinase K. Ensuite, les ARN sont purifiés, reverse transcrit en cDNA et enfin séquencés à haut débit par RNA seq. Les fragments d'ARN obtenus qu'on appelle « reads », sont ensuite mappés sur le transcriptome, et ainsi les ARN peuvent être identifiés.

Ces deux sets d'expériences à grande échelle ont généré chacune environ 2-3 millions de « reads » et nous a permis d'obtenir une liste d'environ 150 candidats retrouvés enrichis dans les CLIP-seq BRAF par rapport au contrôle « 2 % *input* » (SM-input : *Size matched input*) qui correspond au « bruit de fond ». La plupart des *reads* sont majoritairement situés dans les régions 5'UTR, mais également dans les séquences codantes (CDS) (figure 19 ci-dessous). Sur les 150 candidats obtenus, il est intéressant de remarquer qu'un seul long ARN non codant a été retrouvé (LINC00304).

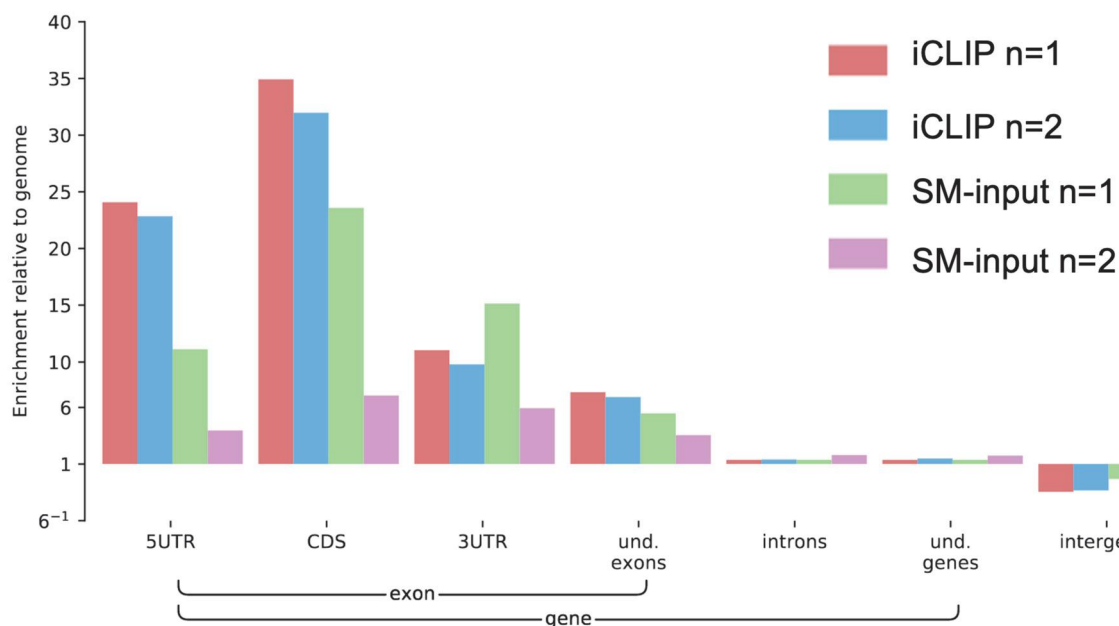


Figure 19 : Enrichissement des différentes catégories de « reads » normalisé par la taille du génome

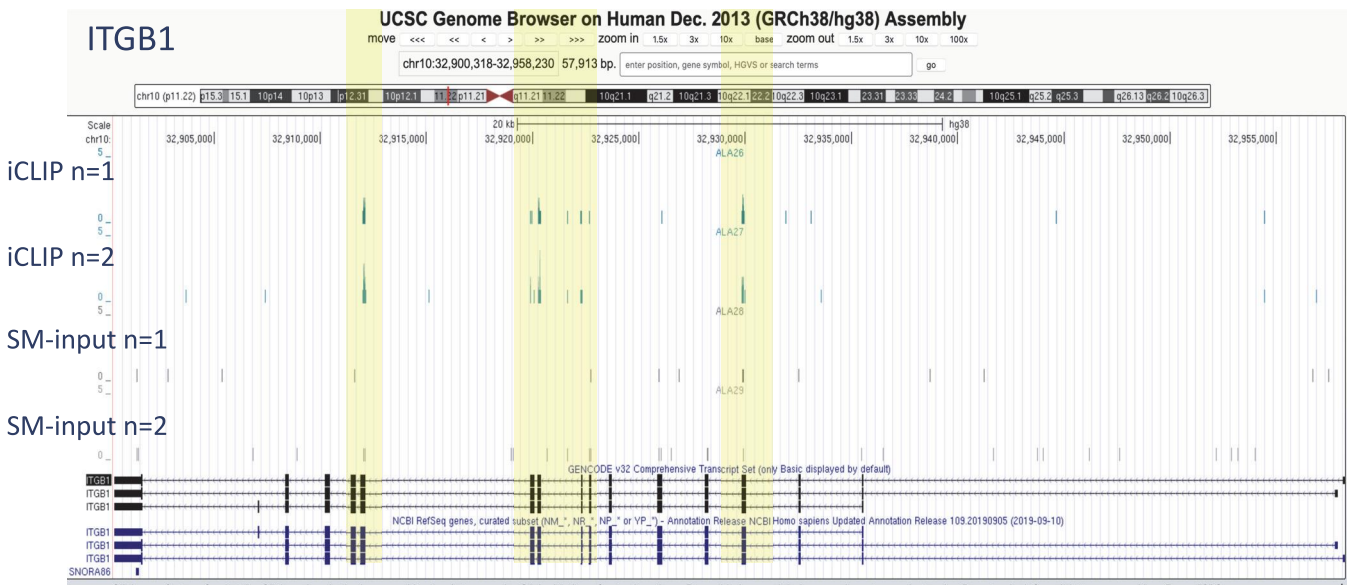
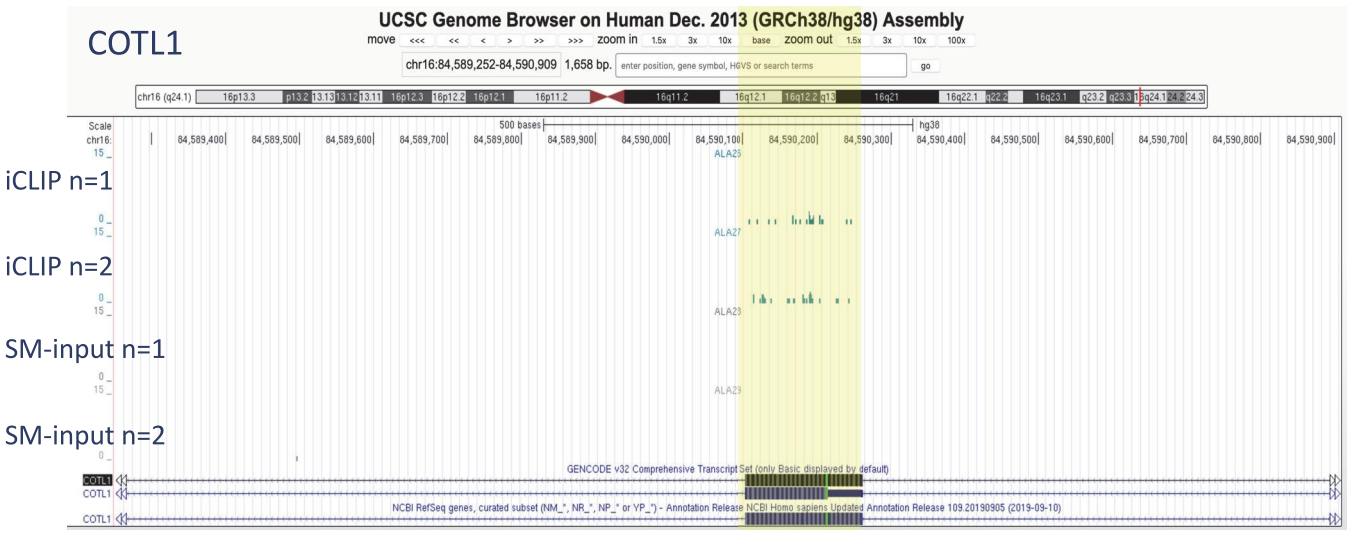
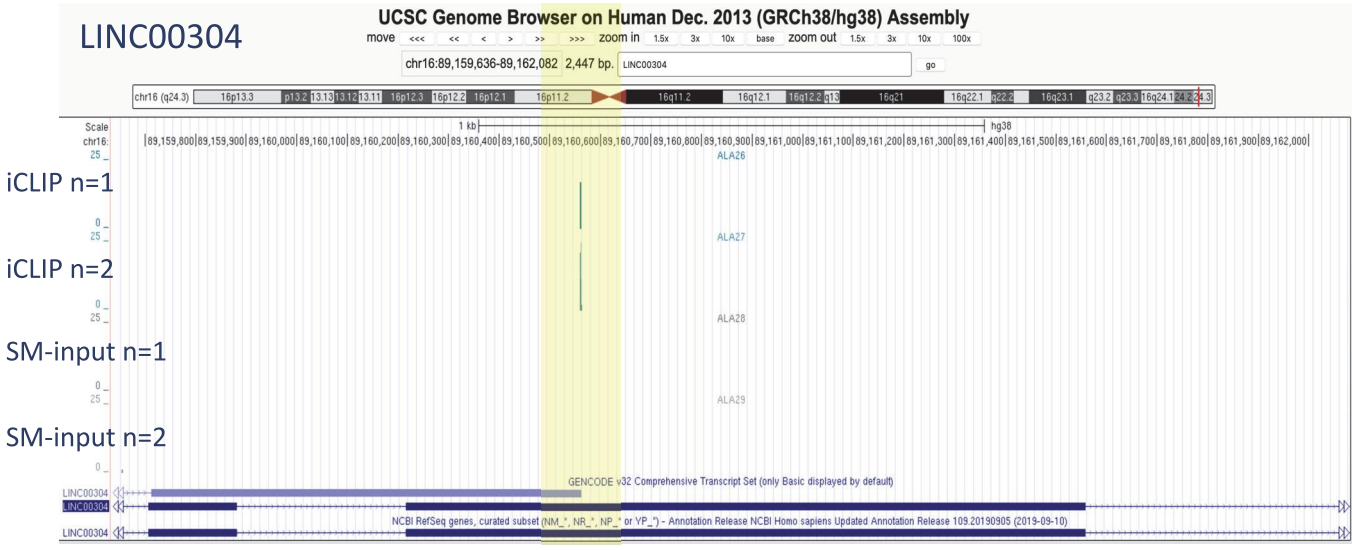
Afin de valider les interactions ARN-BRAF parmi ces 150 candidats, nous avons sélectionné 4 ARN qui représentent les meilleurs candidats en termes de « reads » mappés par rapport au SM-input ($\log_2(\text{moyenne reads iCLIP} / \text{moyenne reads SM-input}) > 3$) (figure 20).

gene_id	gene_name	biotype	iCLIP n=1	iCLIP n=2	SM-input n=1	SM-input n=2	Moyenne iCLIP	Moyenne SM-input	Log 2 Rapport
ENSG00000180422	LINC00304	lincRNA	17	21	0	0	19	0	nd
ENSG00000103187	COTL1	protein_coding	24	31	4	1	27,5	2,5	3,459431619
ENSG00000150093	ITGB1	protein_coding	67	122	7	12	94,5	9,5	3,314314911
ENSG00000106948	AKNA	protein_coding	20	27	0	2	23,5	1	4,554588852

Figure 20 et 20 bis : Tableau des candidats sélectionnés pour la visualisation CLIP q-PCR et visualisation des pics de reads

Il est intéressant de souligner que les *reads* correspondent aux fragments d'ARN retrouvés comme interagissant avec BRAF (figure 20 bis). Ils permettent ainsi d'identifier une zone d'interaction de la protéine sur l'ARN. En effet, les échantillons étant traités à la RNase, les fragments d'ARN restant sont ceux protégés par la protéine. Pour ces candidats, les *reads* retrouvés sont globalement regroupés sur des zones assez précises, et non dispersés sur le transcriptome. De plus, ces *reads* ne sont pas retrouvés sur les échantillons SM-input, suggérant une spécificité d'interaction de BRAF avec ces ARN.

Figure 20 bis : visualisation des reads sur le génome pour chaque candidat

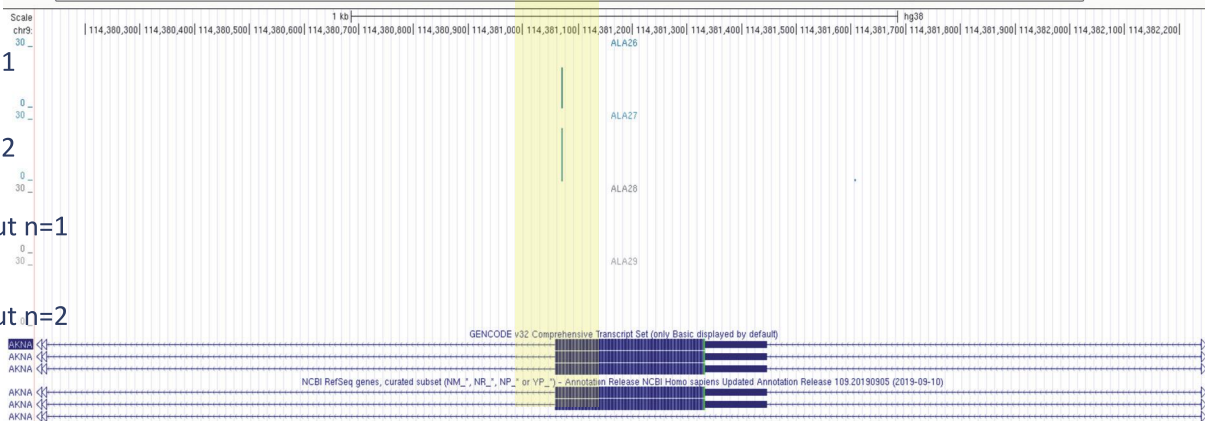


iCLIP n=1

iCLIP n=2

SM-input n=1

SM-input n=2



Nous avons donc réalisé un CLIP q-PCR en suivant les mêmes conditions techniques que les CLIP-seq. Une immunoprécipitation de la protéine BRAF a été réalisée sur des lysats cellulaires de MALME-3M_R après couplage covalent aux UV-C à 254 nm. Un Western Blot a été effectué avec 10 % de cette immunoprécipitation dans le but de vérifier que les protéines d'intérêt ont été immunoprécipitées (figure 21). Une IP contre la protéine de liaison aux ARN HuR sert de contrôle positif, et une IP IgG sert de contrôle négatif.

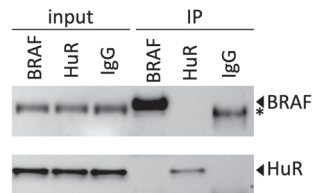
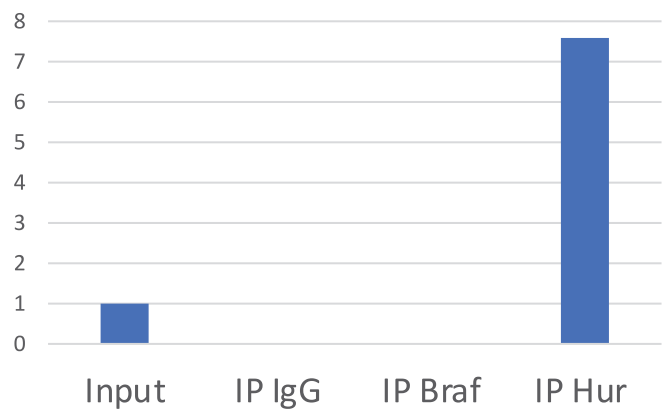


Figure 21 et 21 bis : Western blot de validation des IP (* bande non spécifique) et résultats de CLIP-qPCR

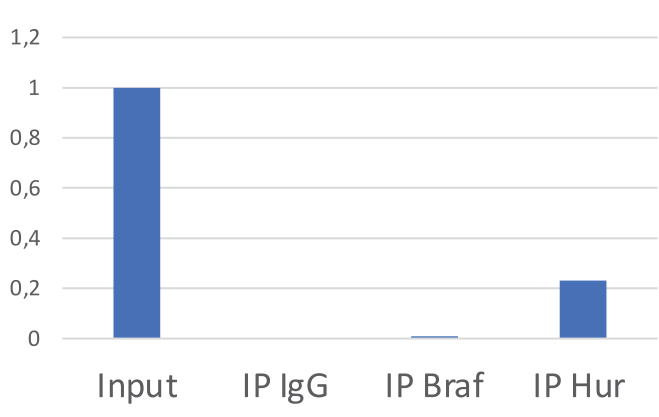
Une extraction d'ARN est ensuite exécutée sur les 90 % de l'immunoprécipitation restante. Ces ARN sont purifiés et reverse transcrit en cDNA. Puis, une qPCR est réalisée. On remarque un fort enrichissement de l'ARNm CENPN dans l'IP HuR par rapport à l'input, c'est notre contrôle positif, cet ARN étant connu pour interagir avec HuR (Dutertre et al., 2014). On remarque aussi une absence d'enrichissement de l'ARNm HPRT dans l'IP HuR, cet ARN n'interagissant pas avec HuR, c'est notre contrôle négatif. Pour finir, il est intéressant de remarquer que l'IP IgG, contrôle de la spécificité des anticorps, ne montre aucun enrichissement pour toutes les cibles. L'ensemble de ces éléments indique que techniquement le CLIP qPCR fonctionne. Cependant, aucun des candidats sélectionnés ne montre un enrichissement dans l'IP BRAF (figure 21 bis).

Figure 21 bis : visualisation des résultats des CLIP-qPCR pour chaque candidat

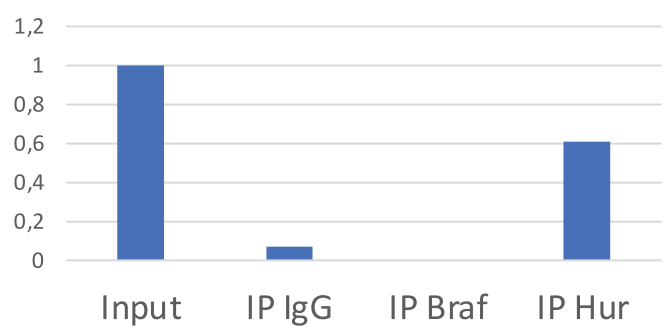
CLIP- qPCR (CENPN)



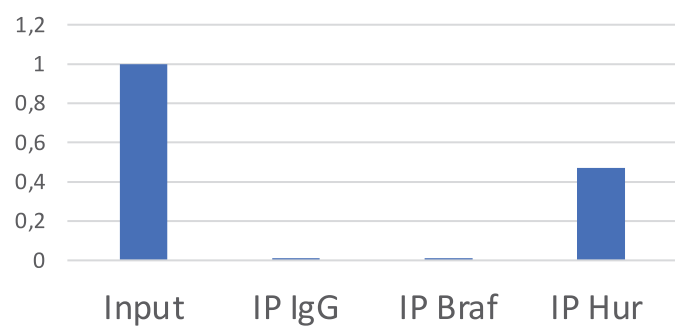
CLIP-qPCR (HPRT)



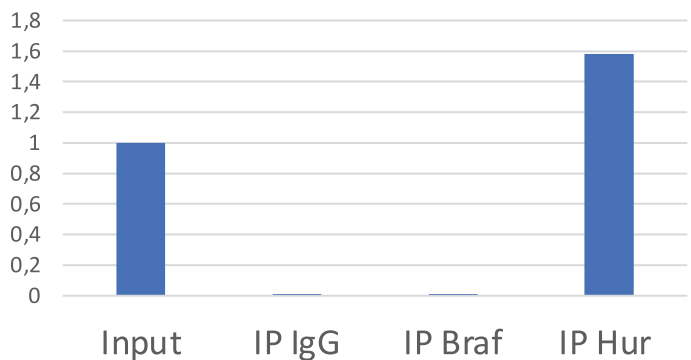
CLIP- qPCR (LINC00304)



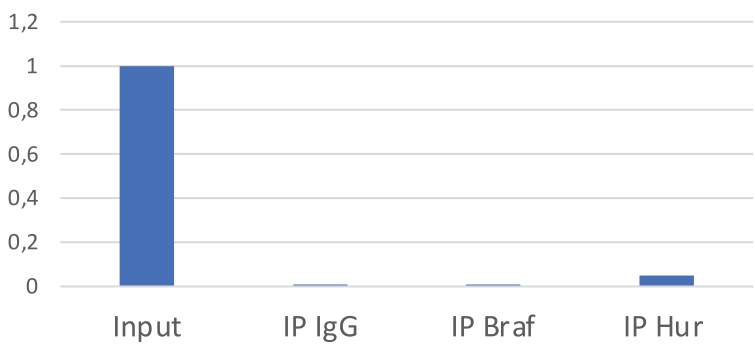
CLIP- qPCR (COTL1)



CLIP- qPCR (ITGB1)



CLIP-qPCR (AKNA)



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats indique que plusieurs protéines de la voie MAPK sont des protéines de liaison aux ARN (NRAS, BRAF, CRAF). Par ailleurs, nous avons identifié un mutant de délétion BRAF qui présente un défaut dans son activité de liaison à l'ARN ainsi qu'une activité de signalisation réduite. Cela suggère que l'activité de liaison à l'ARN est capable de réguler l'activité de la voie MAPK. Nous avons également montré une modulation des interactions protéine-protéine dépendante de l'ARN dans la voie MAPK, indiquant ainsi qu'une composante ARN serait impliquée dans la stabilisation et la régulation de ces interactions protéine-protéine.

Dans cette partie, seront discutés ces résultats. Des perspectives seront également abordées afin de proposer des hypothèses pour le reste de cette étude.

Des protéines de la voie MAPK sont des protéines de liaison à l'ARN

Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer par plusieurs techniques (CLIP, 2C, OOPS) que certaines protéines de la voie MAPK interagissent avec l'ARN (BRAF, NRAS, CRAF). Ce phénomène ne semble pas concerner toute la voie puisque MEK2 ne montre aucune évidence de liaison à l'ARN. Pour KSR, une conclusion définitive ne peut être donnée.

Diverses études démontrent un rôle important des ARN non codants dans les voies de signalisation, comme abordé dans l'introduction et détaillé dans la revue en annexe. Cependant, il n'existe que très peu de données concernant ce rôle dans la voie MAPK, et plus particulièrement dans la régulation des interactions protéine-protéine des voies de signalisation. Une étude réalisée en 2015 (Siprashvili et al., 2015) démontre que KRAS est une protéine de liaison à l'ARN qui interagit avec les snoARN SNORD50A et SNORD50B. Ces derniers inhibent l'activité de KRAS et sont d'ailleurs fréquemment retrouvés sous-exprimés dans les cancers. La déplétion de ces snoARN accroît l'activation de KRAS en augmentant sa prénylation. Dans cette étude, la liaison de NRAS aux snoARN a aussi été démontrée par CLIP-qPCR. Les données obtenues avec NRAS dans notre étude indiquent que plusieurs membres de la famille RAS interagissent avec les ARN. Il est cependant peu probable d'imaginer que ces snoARN soient impliqués dans une stabilisation de l'interaction BRAF-NRAS car (i) ces snoARNs n'ont pas été retrouvés dans les CLIP-seq de la protéine BRAF, (ii) le domaine d'interaction de BRAF avec NRAS ne semble pas être nécessaire à l'activité de liaison à l'ARN de BRAF.

En ce qui concerne la famille RAF, nous avons démontré que 2 membres de sa famille, BRAF et CRAF (dont les séquences sont très conservées (Anton and Wennogle, 1998)), sont des protéines de liaison aux ARN. D'ailleurs, la zone d'interaction de BRAF à l'ARN que nous avons défini, située en C-ter, est fortement conservée dans les protéines BRAF et CRAF, mais aussi dans le troisième membre de la famille, ARAF (environ 77% de conservation dans cette zone, figure 22). Il ne serait donc pas surprenant de constater que tous les membres de la famille RAF soient des protéines de liaison à l'ARN.

```

HUMAN A-RAF LS CLKFQREERPLFPQILATIELLQRSLPKIERSASEPSLHR.T.QADELPACLLSAARLVp.....
585 HUMAN C-RAF VADCVKKVKEERPLFPQILSSIIEQLQHSLPKINRSASEPSLHRAA.HTEDINACTLTTSPRLpVF.....
HUMAN B-RAF MAECLKKKRDERPLFPQILASIELLARSLPKIHRSASEPSLNRAGFQTEDFSLYA.CASPKTpIQAGGYGAFPVH

```

Figure 22 : Alignement de séquence des trois isoformes RAF au niveau de la zone C-terminale.

Les acides aminés identiques sont en rose, les substitutions conservées sont en bleu, et les non conservées sont en noir, encadré en rouge les 18 acides aminés nécessaires à l'activité de liaison à l'ARN (modifié de Anton and Wennogle, 1998).

Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant, d'une part, de tester l'activité de liaison à l'ARN de la protéine ARAF afin de savoir si la liaison à l'ARN est commune à ces trois isoformes et, s'autre part, d'effectuer des expériences de CLIP-seq sur la protéine CRAF (et éventuellement ARAF), mais aussi NRAS, afin de savoir si les ARN retrouvés sont similaires à ceux trouvés pour BRAF.

L'activité de liaison à l'ARN de BRAF, un nouveau mécanisme de régulation de l'activité de la voie MAPK

BRAF est mutée dans de nombreux cancers. En particulier, plus de 50% des cas de mélanomes cutanés comportent une mutation de la valine en position 600 (V600E) (Bogenrieder and Herlyn, 2011). Cette mutation rend la protéine constitutivement active et entraîne une activation de la voie MAPK. Nous avons montré que BRAF V600E, mais également BRAF WT, sont des protéines de liaison à l'ARN. Le mécanisme de liaison à l'ARN ne serait donc pas dépendant du statut de mutation BRAF V600E. A noter aussi que le domaine de liaison à l'ARN de BRAF, à l'extrémité C-terminale de BRAF, ne se situe pas dans la zone de la Valine 600.

L'analyse de la séquence protéique de BRAF montre qu'il n'existe aucun domaine canonique connu de liaison à l'ARN. Cependant, comme évoqué dans l'introduction, des régions désordonnées peuvent agir en tant que véritables domaines de liaison à l'ARN (Järvelin et al., 2016). L'avantage de ces domaines est leur adaptabilité de liaison à l'ARN, puisqu'ils peuvent se lier à plusieurs cibles ou encore former des granules ARN-protéine lors des phénomènes de séparation de phase (figure 23). C'est pour ces raisons que nous avons tenté de savoir si la structure de BRAF comportait des régions désordonnées. Des outils de prédiction des régions désordonnées tels que l'outil PROFBval de « predictprotein.org » (Schlessinger et al., 2006) ou encore PrDOS (*Protein DisOrder prediction System* (Ishida and Kinoshita, 2007)) montrent que l'extrémité C-terminale de BRAF constitue une région désordonnée. D'ailleurs, les acides aminés alanine, acide glutamique, proline, sérine, entre autres, ont été montrés comme favorisant l'état désordonné (Campen et al., 2008; Kumari et al., 2015). On pourrait ainsi muter ces acides aminés dans la région des 18 nécessaires à l'interaction avec l'ARN de BRAF et tester cette activité de liaison à l'ARN, ainsi que l'activité de la voie. De plus, il serait envisageable d'échanger cette région C-ter désordonnée de BRAF par des domaines de liaison canonique à l'ARN (tel que le RRM, KH domaine, etc.) pour vérifier si l'activité de liaison à l'ARN ainsi que l'activité de la voie MAPK est retrouvée ou si ce mécanisme est strictement exclusif à l'aspect désordonné de la région C-ter.

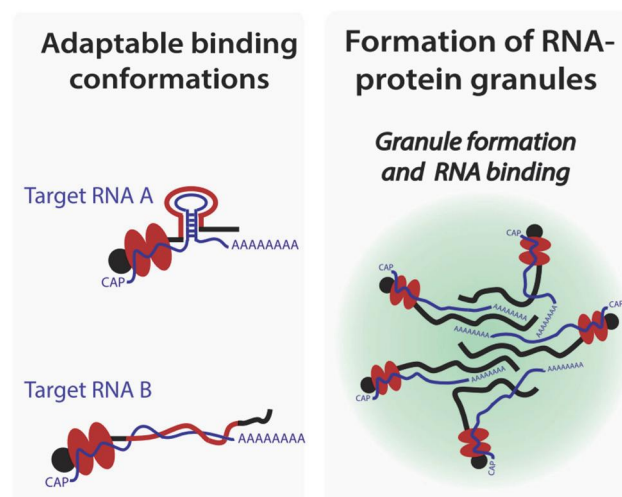


Figure 23 : Interactions des régions désordonnées avec l'ARN (modifié de Järvelin et al., 2016)

L'un des exemples les mieux étudiés de ce phénomène de séparation de phase régulé par l'ARN concerne l'ARN non codant NEAT1. NEAT1 est capable d'interagir avec de nombreuses protéines de liaison à l'ARN, induisant une séparation de phase et la formation d'organelles

dépourvus de membranes, les *paraspeckles*, lors d'un stress cellulaire (Clemson et al., 2009). L'interaction faible de NEAT1 avec des domaines à faible complexité a été montrée comme un élément crucial de ces phénomènes de séparation de phase. Cet ARN long non codant sert en fait de plateforme pour le regroupement de plusieurs RBP, nécessaire pour induire une séparation de phase.

Ces aspects de séparation de phase et de régions désordonnées sont assez fascinants. Et nous pourrions peut-être les relier à certains de nos résultats difficiles à interpréter. En effet, nous n'avons pas pu valider les données générées lors du CLIP-seq. Le CLIP-seq est une technique plus sensible que le CLIP-qPCR. En effet si l'ARN est très faiblement associé à BRAF, il sera difficilement détectable en qPCR. Nous pouvons ainsi imaginer que grâce à son fort niveau d'adaptabilité, la région désordonnée de BRAF pourrait interagir avec plusieurs ARN et peut-être promouvoir un regroupement dans un même espace cellulaire de plusieurs RBP comme lors des phénomènes de séparation de phase. Il serait donc intéressant de tester l'implication des protéines dans les phénomènes de séparation de phase à l'aide de diverses techniques récentes décrites dans le chapitre de « *Methods and Strategies to Quantify Phase Separation of Disordered Proteins* » (Ceballos et al., 2018), comme la purification des condensats *in vitro*. Ces techniques sont assez complexes et laborieuses à mettre en place d'autant plus si les protéines ont besoin de différents partenaires afin d'induire des séparations de phase. Il serait alors plus intéressant de rechercher et d'essayer de visualiser ces condensats en microscopie avec les techniques de recherche des *droplets* ou condensats (Ceballos et al., 2018; McSwiggen et al., 2019) en utilisant une protéine étiquetée (fluorescente par exemple). Cependant des études récentes soulignent que les phénomènes de séparation de phase sont très particuliers et dépendent de nombreux paramètres dont la concentration en protéines. Ainsi, au lieu de former des condensats de séparation de phase, les protéines et ARN/ADN pourraient constituer des « hubs » permettant de rassembler les protéines dans une localisation cellulaire donnée (Chong et al., 2018). Chong S et al., ont mis en évidence l'importance de la concentration des protéines en montrant que certains facteurs de transcription en concentration endogène assez faible (100 nM) formaient des hubs avec de l'ADN pour favoriser la transcription. Ce même phénomène testé en condition de surexpression avec des concentrations de l'ordre du μM montre la formation de condensats de séparation de phase (figure 24).

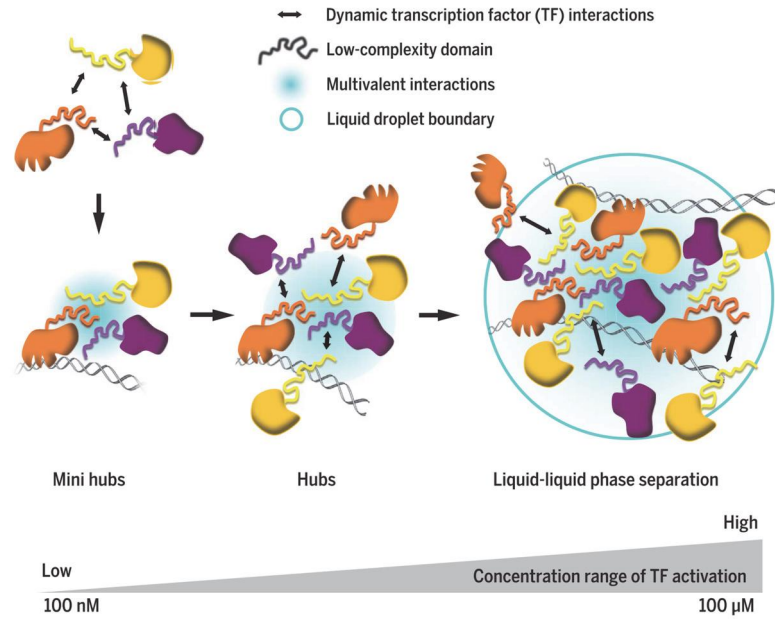


Figure 24 : Des hubs à la séparation de phase (d'après Chong et al., 2018)

La séparation de phase et les hubs peuvent donc être particulièrement utiles pour favoriser des interactions entre protéines dans un même espace cellulaire, ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte des voies de transduction du signal. Les ARN pourraient alors agir en tant que *scaffold*, plateforme architecturale stabilisant ainsi les interactions protéine-protéine. D'ailleurs, par PLA, nous avons pu montrer une diminution significative des interactions BRAF-protéine de la voie MAPK uniquement pour les protéines démontrant une activité de liaison à l'ARN (BRAF, CRAF et éventuellement KSR) alors que les interactions BRAF-MEK ne montraient aucune modulation après traitement à la RNase. Cela suggère que l'ARN favoriserait les interactions protéine-protéine, supportant ainsi l'hypothèse du rôle de « scaffold ». Cette conclusion est également appuyée par le fait que l'interaction du mutant de délétion BRAF avec CRAF ne semble pas être affectée par le traitement à la RNase. Il serait également intéressant d'étudier l'interaction de ce mutant de délétion BRAF avec les autres protéines de la voie (i.e. NRAS, MEK et KSR).

La limitation de la technique due à l'impossibilité de normaliser les différences d'efficacité de transfection ne nous permet pas de conclure sur des différences d'interactions avec CRAF entre les différents mutants de délétions BRAF. Pour pallier à ces problèmes de normalisation, des lignées stables par CRISPR/Cas9 exprimant les différents mutants de délétions pourraient être générées. Ainsi il serait possible de comparer les différentes interactions, mais également de tester les différents traitements anti-BRAF ou anti-MEK sur ces lignées.

Bien que l'activité de liaison à l'ARN de BRAF ne soit pas dépendante du statut mutationnel, il n'est pas impossible d'exclure l'hypothèse que l'activité de liaison à l'ARN soit impliquée dans la régulation de l'activité de la protéine et ainsi dans les phénomènes d'activation de la voie. En effet, 25 % des cas de résistance aux thérapies ciblées anti-BRAF et anti-MEK restent inexpliqués et plus de 50 % des cas sont dus à une réactivation de la voie MAPK dont les mécanismes restent peu compris (Shi et al., 2014; Zaman et al., 2019). La zone C-terminale, où se situe le domaine de liaison à l'ARN de BRAF, est aussi le siège de quelques mutations que l'on retrouve chez les patients (figure 25). Les mutations des patients ayant été rapportées au niveau du domaine de liaison à l'ARN de BRAF que nous avons identifiées sont les suivantes : H725Y, R726C, P731S, L733F, N734S, R735W (d'après les études TCGA pan-cancer sur cBioportal (<https://www.cbioportal.org>)). Les acides aminés tyrosine, cystéine, phénylananine et tryptophane ont été montrés comme promouvant l'état « ordonnée » d'une région (Campen et al., 2008; Kumari et al., 2015). Il est intéressant de constater que globalement les acides aminés mutés dans cette zone sont substitués par des acides aminés qui pourraient bouleverser cette région C-terminale désordonnée. Il serait donc pertinent de reproduire ces mutations pour savoir si elles modifient l'aspect désordonné de la région en C-terminale, la liaison à l'ARN et l'activation de la voie.

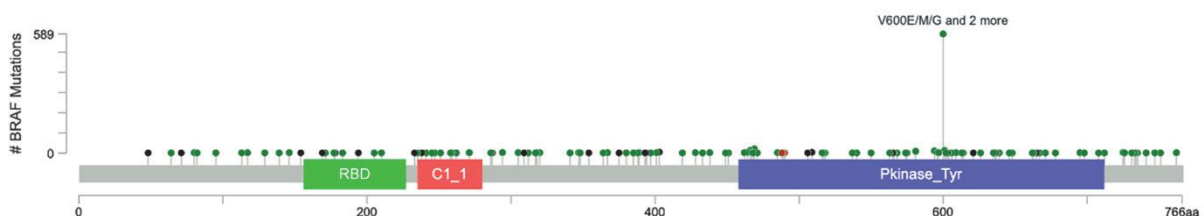


Figure 25 : Spectre de mutations BRAF dans les cancers (d'après Zaman et al., 2019).

Les mutations en vert représentent des mutations faux sens.

Des « hubs » ou « signalling bodies », vers un nouveau mode de régulation dynamique des voies de transduction du signal

Ces dernières années, un rôle important des ARN non codants dans la régulation des voies de signalisation et la régulation par « *scaffolding* » semble apparaître comme un mécanisme permettant de moduler et stabiliser les complexes protéines-protéines, ce qui est

particulièrement intéressant dans les voies de signalisation (cf. revue en annexe). Ces interactions protéines-protéines sont en effet le socle de régulation de l'activité de la voie. Des protéines « *scaffold* », telles que KSR, sont d'ailleurs déjà connues pour permettre de faciliter la présence des protéines dans un même espace cellulaire. Les ARN, et plus globalement l'activité de liaison à l'ARN, pourraient permettre d'ajouter une dynamique supplémentaire pour faciliter ou orienter la réaction de la cellule face à son environnement cellulaire, en réponse à un stress par exemple, ce qui reste le but des voies de signalisation. On pourrait imaginer l'existence de « *signalling bodies* » de la même manière que les *p-bodies*, qui se formeraient par rassemblement des protéines de signalisation ayant une activité de liaison à l'ARN, en réponse à un signal activant la voie de signalisation et permettant ainsi l'optimisation de la transduction de ce signal.

REFERENCES

Achsel, T., Stark, H., and Lührmann, R. (2001). The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3685–3689.

Andersson, S., Wallin, K.L., Hellström, A.C., Morrison, L.E., Hjerpe, A., Auer, G., Ried, T., Larsson, C., and Heselmeyer-Haddad, K. (2006). Frequent gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 in cervical adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* *95*, 331–338.

Anton, Y., and Wennogle, L.P. (1998). The RAF family: An expanding network of post-translational controls and protein-protein interactions. *Cell Res.* *8*, 81–98.

Asencio, C., Chatterjee, A., and Hentze, M.W. (2018). Silica-based solid-phase extraction of cross-linked nucleic acid-bound proteins. *Life Sci. Alliance* *1*, e201800088.

Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriantseva, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat-containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* (80-.). *318*, 798–801.

Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., et al. (2012). The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Mol. Cell* *46*, 674–690.

Bava, F.A., Eliscovich, C., Ferreira, P.G., Miñana, B., Ben-Dov, C., Guigó, R., Valcácel, J., and Méndez, R. (2013). CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation. *Nature* *495*, 121–125.

Beckmann, B.M., Horos, R., Fischer, B., Castello, A., Eichelbaum, K., Alleaume, A.M., Schwarzl, T., Curk, T., Foehr, S., Huber, W., et al. (2015). The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat. Commun.* *6*.

Beckmann, B.M., Castello, A., and Medenbach, J. (2016). The expanding universe of ribonucleoproteins: of novel RNA-binding proteins and unconventional interactions. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *468*, 1029–1040.

Benjamin, D., and Moroni, C. (2007). mRNA stability and cancer: An emerging link? *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 1515–1529.

Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2011). The molecular pathology of cutaneous melanoma. *Cancer Biomarkers* 9, 267–286.

Boussemart, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., Thomas, M., Basmadjian, C., Ribeiro, N., Thuaud, F., et al. (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* 513, 105–109.

Boussemart, L., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Mateus, C., Routier, E., Rubington, M., Kamsu-Kom, N., Thomas, M., Tomasic, G., Agoussi, S., et al. (2016). Secondary tumors arising in patients undergoing BRAF inhibitor therapy exhibit increased BRAF-CRAF heterodimerization. *Cancer Res.* 76, 1476–1484.

Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., and Willard, H.F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349, 38–44.

Campen, A., Williams, R., Brown, C., Meng, J., Uversky, V., and Dunker, A. (2008). TOP-IDP-Scale: A New Amino Acid Scale Measuring Propensity for Intrinsic Disorder. *Protein Pept. Lett.* 15, 956–963.

Del Campo, M., and Lambowitz, A.M. (2009). Structure of the Yeast DEAD Box Protein Mss116p Reveals Two Wedges that Crimp RNA. *Mol. Cell* 35, 598–609.

Carlino, M.S., Long, G. V., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2015). Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96, 385–398.

Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., et al. (2012). Insights into RNA Biology from an

Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* 149, 1393–1406.

Castello, A., Fischer, B., Frese, C.K., Horos, R., Alleaume, A.M., Foehr, S., Curk, T., Krijgsveld, J., and Hentze, M.W. (2016). Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol. Cell* 63, 696–710.

Ceballos, A.V., McDonald, C.J., and Elbaum-Garfinkle, S. (2018). Methods and Strategies to Quantify Phase Separation of Disordered Proteins (Elsevier Inc.).

Cerezo, M., Guemiri, R., Druillennec, S., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Shen, S., Allard, D., Martineau, S., Welsch, C., Agoussi, S., et al. (2018). Translational control of tumor immune escape via the eIF4F–STAT1–PD-L1 axis in melanoma. *Nat. Med.* 24, 1877–1886.

Chand, S.N., Zarei, M., Schiewer, M.J., Kamath, A.R., Romeo, C., Lal, S., Cozzitorto, J.A., Nevler, A., Scolaro, L., Londin, E., et al. (2017). Posttranscriptional regulation of PARG mRNA by HuR facilitates DNA repair and resistance to PARP inhibitors. *Cancer Res.* 77, 5011–5025.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.

Chang, C.-K., Hsu, Y.-L., Chang, Y.-H., Chao, F.-A., Wu, M.-C., Huang, Y.-S., Hu, C.-K., and Huang, T.-H. (2009). Multiple Nucleic Acid Binding Sites and Intrinsic Disorder of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein: Implications for Ribonucleocapsid Protein Packaging. *J. Virol.* 83, 2255–2264.

Chong, S., Dugast-Darzacq, C., Liu, Z., Dong, P., Dailey, G.M., Cattoglio, C., Heckert, A., Banala, S., Lavis, L., Darzacq, X., et al. (2018). Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science* (80-). 361.

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.

Collier, S.P., Collins, P.L., Williams, C.L., Boothby, M.R., and Aune, T.M. (2012). Cutting Edge: Influence of Tmevpg1 , a Long Intergenic Noncoding RNA, on the Expression of Ifng by Th1 Cells . *J. Immunol.* *189*, 2084–2088.

Connerty, P., Lock, R.B., and de Bock, C.E. (2020). Long Non-coding RNAs: Major Regulators of Cell Stress in Cancer. *Front. Oncol.* *10*, 285.

Conrad, T., Albrecht, A.S., De Melo Costa, V.R., Sauer, S., Meierhofer, D., and Ørom, U.A. (2016). Serial interactome capture of the human cell nucleus. *Nat. Commun.* *7*, 1–11.

Corley, M., Burns, M.C., and Yeo, G.W. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Mol. Cell* *78*, 9–29.

Cui, H., Xie, N., Tan, Z., Banerjee, S., Thannickal, V.J., Abraham, E., and Liu, G. (2014). The human long noncoding RNA Inc-IL7R regulates the inflammatory response. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2085–2095.

Cutler, R.E., Stephens, R.M., Saracino, M.R., and Morrison, D.K. (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9214–9219.

Dankner, M., Rose, A.A.N., Rajkumar, S., Siegel, P.M., and Watson, I.R. (2018). Classifying BRAF alterations in cancer: New rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* *37*, 3183–3199.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *415*, 949–954.

Desideri, E., Cavallo, A.L., and Baccarini, M. (2015). Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs. *Cell* *161*, 967–970.

Dhomen, N., Da Rocha Dias, S., Hayward, R., Ogilvie, L., Hedley, D., Delmas, V., McCarthy, A., Henderson, D., Springer, C.J., Pritchard, C., et al. (2010). Inducible expression of V600EBraf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 112–120.

Dutertre, M., and Vagner, S. (2017). DNA-Damage Response RNA-Binding Proteins (DDRBP): Perspectives from a New Class of Proteins and Their RNA Targets. *J. Mol. Biol.* *429*, 3139–3145.

Dutertre, M., Chakrama, F.Z., Combe, E., Desmet, F.O., Mortada, H., Espinoza, M.P., Gratadou, L., and Auboeuf, D. (2014). A recently evolved class of alternative 3'-terminal exons involved in cell cycle regulation by topoisomerase inhibitors. *Nat. Commun.* *5*, 1–12.

Eisen, T., Marais, R., Affolter, A., Lorigan, P., Robert, C., Corrie, P., Ottensmeier, C., Chevreau, C., Chao, D., Nathan, P.D., et al. (2011). Sorafenib and dacarbazine as first-line therapy for advanced melanoma: Phase i and open-label phase II studies. *Br. J. Cancer* *105*, 353–359.

English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* *253*, 255–270.

Falchook, G.S., Long, G. V., Kurzrock, R., Kim, K.B., Arkenau, T.H., Brown, M.P., Hamid, O., Infante, J.R., Millward, M., Pavlick, A.C., et al. (2012). Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* *379*, 1893–1901.

Fang, Y., and Fullwood, M.J. (2016). Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* *14*, 42–54.

Flockhart, R.J., Webster, D.E., Qu, K., Mascarenhas, N., Kovalski, J., Kretz, M., and Khavari, P.A. (2012). BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration (*Genome Research* (2012) *22*, (1006-1014)). *Genome Res.* *22*, 1382.

Gerstberger, S., Hafner, M., and Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins.

Nat. Rev. Genet. *15*, 829–845.

Gesualdo, F. Di, Capaccioli, S., and Lulli, M. (2014). A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget* *5*, 10976–10996.

Gong, C., and Maquat, L.E. (2011). LncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* *470*, 284–290.

Gong, C., Li, Z., Ramanujan, K., Clay, I., Zhang, Y., Lemire-Brachat, S., and Glass, D.J. (2015). A Long Non-coding RNA, LncMyoD, Regulates Skeletal Muscle Differentiation by Blocking IMP2-Mediated mRNA Translation. *Dev. Cell* *34*, 181–191.

Gorden, A., Osman, I., Gai, W., He, D., Huang, W., Davidson, A., Houghton, A.N., Busam, K., and Polsky, D. (2003). Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* *63*, 3955–3957.

Govender, D., and Chetty, R. (2012). Gene of the month: BRAF. *J. Clin. Pathol.* *65*, 986–988.

Greenberg, J.R. (1979). Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res.* *6*, 715–732.

Gu, W., Katz, Z., Wu, B., Park, H.Y., Li, D., Lin, S., Wells, A.L., and Singer, R.H. (2012). Regulation of local expression of cell adhesion and motility-related mRNAs in breast cancer cells by IMP1/ZBP1. *J. Cell Sci.* *125*, 81–91.

Guan, H., Zhu, T., Wu, S., Liu, S., Liu, B., Wu, J., Cai, J., Zhu, X., Zhang, X., Zeng, M., et al. (2019). Long noncoding RNA LINC00673-v4 promotes aggressiveness of lung adenocarcinoma via activating WNT/ β -catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 14019–14028.

Guttman, M., and Rinn, J.L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* *482*, 339–346.

Haemmerle, M., and Gutschner, T. (2015). Long non-coding RNAs in cancer and development: Where do we go from here? *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 1395–1405.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1. *FASEB J.* *9*, 576–596.

Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J.C., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., et al. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* *464*, 431–435.

Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Kaempgen, E., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* *380*, 358–365.

Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., et al. (2010). Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell* *140*, 209–221.

Hentze, M.W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 327–341.

Hockensmith, J.W., Kubasek, W.L., Evertsz, E.M., Mesner, L.D., and Von Hippel, P.H. (1993).

Laser cross-linking of proteins to nucleic acids. II. Interactions of the bacteriophage T4 DNA replication polymerase accessory proteins complex with DNA. *J. Biol. Chem.* *268*, 15721–15730.

Hogg, J.R., and Collins, K. (2007). RNA-based affinity purification reveals 7SK RNPs with distinct

composition and regulation. *Rna* 13, 868–880.

Holderfield, M., Deuker, M.M., McCormick, F., and McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 14, 455–467.

Hu, L., Wu, Y., Tan, D., Meng, H., Wang, K., Bai, Y., and Yang, K. (2015). Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34, 1–13.

Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A.M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., et al. (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 142, 409–419.

Hung, T., Wang, Y., Lin, M.F., Koegel, A.K., Kotake, Y., Grant, G.D., Horlings, H.M., Shah, N., Umbricht, C., Wang, P., et al. (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat. Genet.* 43, 621–629.

Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., and Toyoshima, K. (1988). B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2651–2654.

Ishida, T., and Kinoshita, K. (2007). PrDOS: Prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* 35, 460–464.

Järvelin, A.I., Noerenberg, M., Davis, I., and Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun. Signal.* 14.

Jeong, S. (2017). SR proteins: Binders, regulators, and connectors of RNA. *Mol. Cells* 40, 1–9.

Jiang, C., Li, Y., Zhao, Z., Lu, J., Chen, H., Ding, N., Wang, G., Xu, J., and Li, X. (2016). Identifying and functionally characterizing tissue-specific and ubiquitously expressed human lncRNAs.

Oncotarget 7, 7120–7133.

Jiang, R., Tang, J., Chen, Y., Deng, L., Ji, J., Xie, Y., Wang, K., Jia, W., Chu, W.M., and Sun, B. (2017). The long noncoding RNA Inc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion. *Nat. Commun.* 8, 1–15.

Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968–972.

Jonas, K., Calin, G.A., and Pichler, M. (2020). Rna-binding proteins as important regulators of long non-coding rnas in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21.

Khorshidi, A., Dhaliwal, P., and Yang, B.B. (2016). Noncoding RNAs in Tumor Angiogenesis. Long Short Non-Coding RNAs *Cancer Biol.* 927, 217–241.

Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G.P. (2010). Noncoding RNA Gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci. Signal.* 3, 1–16.

Kitagawa, M., Kotake, Y., and Ohhata, T. (2012). Long Non-Coding RNAs Involved in Cancer Development and Cell Fate Determination. *Curr. Drug Targets* 13, 1616–1621.

Köhler, M., Röring, M., Schorch, B., Heilmann, K., Stickel, N., Fiala, G.J., Schmitt, L.C., Braun, S., Ehrenfeld, S., Uhl, F.M., et al. (2016). Activation loop phosphorylation regulates B-Raf in vivo and transformation by B-Raf mutants. *EMBO J.* 35, 143–161.

Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., and Xiong, Y. (2011). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene* 30, 1956–1962.

Kramer, K., Sachsenberg, T., Beckmann, B.M., Qamar, S., Boon, K.L., Hentze, M.W.,

Kohlbacher, O., and Urlaub, H. (2014). Photo-cross-linking and high-resolution mass spectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins. *Nat. Methods* *11*, 1064–1070.

Kumari, B., Kumar, R., and Kumar, M. (2015). Low complexity and disordered regions of proteins have different structural and amino acid preferences. *Mol. Biosyst.* *11*, 585–594.

Lau, C.K., Bachorik, J.L., and Dreyfuss, G. (2009). Gemin5-snRNA interaction reveals an RNA binding function for WD repeat domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 486–491.

Lavoie, H., and Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 281–298.

Lee, F.C.Y., and Ule, J. (2018). Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol. Cell* *69*, 354–369.

Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., et al. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature* *531*, 518–522.

Li, C., Wang, S., Xing, Z., Lin, A., Liang, K., Song, J., Hu, Q., Yao, J., Chen, Z., Park, P.K., et al. (2017). A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nat. Cell Biol.* *19*, 106–119.

Li, S.P., Xu, H.X., Yu, Y., He, J.D., Wang, Z., Xu, Y.J., Wang, C.Y., Zhang, H.M., Zhang, R.X., Zhang, J.J., et al. (2016a). LncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway. *Oncotarget* *7*, 42431–42446.

Li, Y., Wang, Z., Shi, H., Li, H., Li, L., Fang, R., Cai, X., Liu, B., Zhang, X., and Ye, L. (2016b). HBXIP and LSD1 scaffolded by lncRNA hotair mediate transcriptional activation by c-Myc. *Cancer Res.* *76*, 293–304.

Lin, A., Li, C., Xing, Z., Hu, Q., Liang, K., Han, L., Wang, C., Hawke, D.H., Wang, S., Zhang, Y., et al. (2016). The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 α signalling in triple-negative breast cancer. *Nat. Cell Biol.* *18*, 213–224.

Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., Li, J., Ye, Y., Yao, J., Liang, K., et al. (2017). The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P₃ to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. *Nat. Cell Biol.* *19*, 238–251.

Linder, P., and Jankowsky, E. (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 505–516.

Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., Lin, L., Yao, H., Su, F., Li, D., et al. (2015). A Cytoplasmic NF- κ B Interacting Long Noncoding RNA Blocks I κ B Phosphorylation and Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell* *27*, 370–381.

Long, J.C., and Cáceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: Master regulators of gene expression. *Biochem. J.* *417*, 15–27.

Lu, K. hua, Li, W., Liu, X. hua, Sun, M., Zhang, M. ling, Wu, W. qin, Xie, W. ping, and Hou, Y. yi (2013). Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer* *13*.

Maik-Rachline, G., and Seger, R. (2016). The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. *Drug Resist. Updat.* *25*, 1–12.

Malka-Mahieu, H., Girault, I., Rubington, M., Leriche, M., Welsch, C., Kamsu-Kom, N., Zhao, Q., Desaubry, L., Vagner, S., and Robert, C. (2016). Synergistic effects of eIF4A and MEK inhibitors on proliferation of NRAS-mutant melanoma cell lines. *Cell Cycle* *15*, 2405–2409.

Malka-Mahieu, H., Newman, M., Désaubry, L., Robert, C., and Vagner, S. (2017). Molecular pathways: The eIF4F translation initiation complex-new opportunities for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* *23*, 21–25.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.

Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F.H.T. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 272, 2118–2131.

Mark, G.E., and Rapp, U.R. (1984). Primary Structure of v-raf : Relatedness to the src Family of Oncogenes. *Science* (80-.). 224, 285–289.

Mayr, C., and Bartel, D.P. (2009). Widespread Shortening of 3'UTRs by Alternative Cleavage and Polyadenylation Activates Oncogenes in Cancer Cells. *Cell* 138, 673–684.

McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., et al. (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): Extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* 15, 323–332.

McSwiggen, D.T., Mir, M., Darzacq, X., and Tjian, R. (2019). Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes Dev.* 33, 1619–1634.

Michalik, K.M., You, X., Manavski, Y., Doddaballapur, A., Zörnig, M., Braun, T., John, D., Ponomareva, Y., Chen, W., Uchida, S., et al. (2014). Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ. Res.* 114, 1389–1397.

Mohibi, S., Chen, X., and Zhang, J. (2019). Cancer the'RBP'eutics–RNA-binding proteins as therapeutic targets for cancer. *Pharmacol. Ther.* 203.

Morchikh, M., Cribier, A., Raffel, R., Amraoui, S., Cau, J., Severac, D., Dubois, E., Schwartz, O., Bennasser, Y., and Benkirane, M. (2017). HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. *Mol. Cell* 67, 387-399.e5.

Mourtada-Maarabouni, M., Pickard, M.R., Hedge, V.L., Farzaneh, F., and Williams, G.T. (2009). GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 28, 195–208.

Mowel, W.K., Kotzin, J.J., McCright, S.J., Neal, V.D., and Henao-Mejia, J. (2018). Control of Immune Cell Homeostasis and Function by lncRNAs. *Trends Immunol.* 39, 55–69.

Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., Baker, J.C., Grützner, F., and Kaessmann, H. (2014). The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature* 505, 635–640.

Ng, L.J., Cropley, J.E., Pickett, H.A., Reddel, R.R., and Suter, C.M. (2009). Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. *Nucleic Acids Res.* 37, 1152–1159.

Nie, Y., Liu, X., Qu, S., Song, E., Zou, H., and Gong, C. (2013). Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival. *Cancer Sci.* 104, 458–464.

Nowak, T., Januszkiewicz, D., Zawada, M., Pernak, M., Lewandowski, K., Rembowska, J., Nowicka, K., Mankowski, P., and Nowak, J. (2006). Amplification of hTERT and hTERC genes in leukemic cells with high expression and activity of telomerase. *Oncol. Rep.* 16, 301–305.

Obaid, N.M., Bedard, K., and Huang, W.Y. (2017). Strategies for overcoming resistance in tumours harboring BRAF mutations. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47.

Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological

functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183.

Pereira, B., Billaud, M., and Almeida, R. (2017). RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends in Cancer* 3, 506–528.

Pérez-Guijarro, E., Karras, P., Cifdaloz, M., Martínez-Herranz, R., Canón, E., Granã, O., Horcajada-Reales, C., Alonso-Curbelo, D., Calvo, T.G., Gómez-López, G., et al. (2016). Lineage-specific roles of the cytoplasmic polyadenylation factor CPEB4 in the regulation of melanoma drivers. *Nat. Commun.* 7.

Phan, A.T., Kuryavyi, V., Darnell, J.C., Serganov, A., Majumdar, A., Ilin, S., Raslin, T., Polonskaia, A., Chen, C., Clain, D., et al. (2011). Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 796–804.

Piserà, A., Campo, A., and Campo, S. (2018). Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and its role in cancer development and treatment. *J. Genet. Genomics* 45, 13–24.

Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465, 1033–1038.

Ponting, C.P., Oliver, P.L., and Reik, W. (2009). Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* 136, 629–641.

Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427–430.

Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387–390.

Qin, H., Ni, H., Liu, Y., Yuan, Y., Xi, T., Li, X., and Zheng, L. (2020). RNA-binding proteins in tumor progression. *J. Hematol. Oncol.* *13*, 1–23.

Queiroz, R.M.L., Smith, T., Villanueva, E., Marti-Solano, M., Monti, M., Pizzinga, M., Mirea, D.M., Ramakrishna, M., Harvey, R.F., Dezi, V., et al. (2019). Comprehensive identification of RNA–protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (OOPS). *Nat. Biotechnol.* *37*, 169–178.

Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F., and Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* *461*, 542–545.

Ramanathan, M., Majzoub, K., Rao, D.S., Neela, P.H., Zarnegar, B.J., Mondal, S., Roth, J.G., Gai, H., Kovalski, J.R., Siprashvili, Z., et al. (2018). RNA–protein interaction detection in living cells. *Nat. Methods* *15*, 207–212.

Ramanathan, M., Porter, D.F., and Khavari, P.A. (2019). Methods to study RNA–protein interactions. *Nat. Methods* *16*, 225–234.

Redon, S., Reichenbach, P., and Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* *38*, 5797–5806.

Ribeiro, D.M., Zanzoni, A., Cipriano, A., Ponti, R.D., Spinelli, L., Ballarino, M., Bozzoni, I., Tartaglia, G.G., and Brun, C. (2018). Protein complex scaffolding predicted as a prevalent function of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* *46*, 917–928.

Röring, M., Herr, R., Fiala, G.J., Heilmann, K., Braun, S., Eisenhardt, A.E., Halbach, S., Capper, D., Von Deimling, A., Schamel, W.W., et al. (2012). Distinct requirement for an intact dimer interface in wild-type, V600E and kinase-dead B-Raf signalling. *EMBO J.* *31*, 2629–2647.

Roskoski, R. (2018). Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* *135*, 239–258.

Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2262–2272.

Sanchez Calle, A., Kawamura, Y., Yamamoto, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2018). Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. *Cancer Sci.* *109*, 2093–2100.

Schlessinger, A., Yachdav, G., and Rost, B. (2006). PROFbval: Predict flexible and rigid residues in proteins. *Bioinformatics* *22*, 891–893.

Schmitt, A.M., and Chang, H.Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* *29*, 452–463.

Schoeftner, S., and Blasco, M.A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* *10*, 228–236.

Shepard, P.J., and Hertel, K.J. (2009). The SR protein family. *Genome Biol.* *10*, 242.

Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., et al. (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies V600E B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat. Commun.* *3*, 724–728.

Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* *4*.

Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., and Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett.* *339*, 159–166.

Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif. *Nucleic Acids Res.* *21*, 1193–1198.

Siprashvili, Z., Webster, D.E., Johnston, D., Shenoy, R.M., Ungewickell, A.J., Bhaduri, A.,

Flockhart, R., Zarnegar, B.J., Che, Y., Meschi, F., et al. (2015). The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. *Nat. Genet.* *48*, 53–58.

Slack, F.J., and Chinnaiyan, A.M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* *179*, 1033–1055.

Smith, K.C., and Meun, D.H.C. (1968). Kinetics of the Photochemical Addition of [35S] Cysteine to Polynucleotides and Nucleic Acids. *J. Biol. Chem.* *243*, 1033–1037.

Song, M.S., Carracedo, A., Salmena, L., Song, S.J., Egia, A., Malumbres, M., and Pandolfi, P.P. (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* *144*, 187–199.

Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., et al. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N. Engl. J. Med.* *366*, 707–714.

Stefan, E., and Bister, K. (2017). MYC and RAF: Key Effectors in Cellular Signaling and Major Drivers in Human Cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* *487*, 500–504.

Strein, C., Alleaume, A.M., Rothbauer, U., Hentze, M.W., and Castello, A. (2014). A versatile assay for RNA-binding proteins in living cells. *Rna* *20*, 721–731.

Sun, X., Thorne, R.F., Zhang, X.D., He, M., Li, J., Feng, S., Liu, X., and Wu, M. (2020). Lnc RNA GUARDIN suppresses cellular senescence through a LRP 130- PGC 1 α - FOXO 4-p21-dependent signaling axis. *EMBO Rep.* *21*, 1–14.

Tanaka, I., Chakraborty, A., Saulnier, O., Benoit-Pilven, C., Vacher, S., Labiod, D., Lam, E.W.F., Bièche, I., Delattre, O., Pouzoulet, F., et al. (2020). ZRANB2 and SYF2-mediated splicing programs converging on ECT2 are involved in breast cancer cell resistance to doxorubicin. *Nucleic Acids Res.* *48*, 2676–2693.

Tang, J., Li, Y., Sang, Y., Yu, B., Lv, D., Zhang, W., and Feng, H. (2018). LncRNA PVT1 regulates triple-negative breast cancer through KLF5/beta-catenin signaling. *Oncogene* *37*, 4723–4734.

Therrien, M., Michaud, N.R., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev.* *10*, 2684–2695.

Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M.W., and Krijgsveld, J. (2019). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell* *176*, 391-403.e19.

Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., et al. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3041–3046.

Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamarast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science (80-.)*. *329*, 689–693.

Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A., and Robert, B. (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science (80-.)*. *302*, 1212–1215.

Ule, J., Jensen, K., Mele, A., and Darnell, R.B. (2005). CLIP: A method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* *37*, 376–386.

Uversky, V.N. (2019). Intrinsically disordered proteins and their “Mysterious” (meta)physics. *Front. Phys.* *7*, 8–23.

Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J.*

275, 2712–2726.

Vigneau, S., Rohrlich, P.-S., Brahic, M., and Bureau, J.-F. (2003). Tmevpg1, a Candidate Gene for the Control of Theiler's Virus Persistence, Could Be Implicated in the Regulation of Gamma Interferon. *J. Virol.* *77*, 5632–5638.

Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Project, C.G., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* *116*, 855–867.

Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* *43*, 904–914.

Wang, C., Wang, L., Ding, Y., Lu, X., Zhang, G., Yang, J., Zheng, H., Wang, H., Jiang, Y., and Xu, L. (2017a). LncRNA structural characteristics in epigenetic regulation. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.

Wang, L., Yang, F., Jia, L.T., and Yang, A.G. (2017b). Missing Links in Epithelial-Mesenchymal Transition: Long Non-Coding RNAs Enter the Arena. *Cell. Physiol. Biochem.* *44*, 1665–1680.

Wellbrock, C., and Hurlstone, A. (2010). BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 561–567.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004a). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 875–885.

Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. (2004b). V599EB-RAF is an Oncogene in Melanocytes. *Cancer Res.* *64*, 2338–2342.

Wu, X.S., Wang, X.A., Wu, W.G., Hu, Y.P., Li, M.L., Ding, Q., Weng, H., Shu, Y.J., Liu, T.Y., Jiang, L., et al. (2014). MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway. *Cancer Biol. Ther.* *15*, 806–814.

Xue, M., Chen, L. yi, Wang, W. jia, Su, T. ting, Shi, L. hong, Wang, L., Zhang, W., Si, J. min, Wang, L. jing, and Chen, S. jie (2018). HOTAIR induces the ubiquitination of Runx3 by interacting with Mex3b and enhances the invasion of gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 21, 756–764.

Yang, B., Zhang, L., Cao, Y., Chen, S., Cao, J., Wu, D., Chen, J., Xiong, H., Pan, Z., Qiu, F., et al. (2017). Overexpression of lncRNA IGFBP4-1 reprograms energy metabolism to promote lung cancer progression. *Mol. Cancer* 16, 1–14.

Yang, F., Zhang, H., Mei, Y., and Wu, M. (2014). Reciprocal Regulation of HIF-1 α and LincRNA-p21 Modulates the Warburg Effect. *Mol. Cell* 53, 88–100.

Yang, Z., Zhou, L., Wu, L.M., Lai, M.C., Xie, H.Y., Zhang, F., and Zheng, S. Sen (2011). Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 1243–1250.

Yoon, J.H., Abdelmohsen, K., Kim, J., Yang, X., Martindale, J.L., Tominaga-Yamanaka, K., White, E.J., Orjalo, A. V., Rinn, J.L., Kreft, S.G., et al. (2013). Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination. *Nat. Commun.* 4, 1–14.

Zaman, A., Wu, W., and Bivona, T.G. (2019). Targeting oncogenic braf: Past, present, and future. *Cancers (Basel)*. 11.

Zhang, A., Zhao, J.C., Kim, J., Fong, K. wing, Yang, Y.A., Chakravarti, D., Mo, Y.Y., and Yu, J. (2015). LncRNA HOTAIR Enhances the Androgen-Receptor-Mediated Transcriptional Program and Drives Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Rep.* 13, 209–221.

Zhang, Z., Theler, D., Kaminska, K.H., Hiller, M., De La Grange, P., Pudimat, R., Rafalska, I., Heinrich, B., Bujnick, J.M., Allain, F.H.T., et al. (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 285, 14701–14710.

Zhou, X., Liu, S., Cai, G., Kong, L., Zhang, T., Ren, Y., Wu, Y., Mei, M., Zhang, L., and Wang, X.

(2015). Long non coding RNA MALAT1 promotes tumor growth and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 5, 1–10.

ANNEXE

LncRNA-mediated protein-protein scaffolding in intracellular signal transduction pathways

Titash Sen^{1,2,3,*}, Sabrina Mennour^{1,2,3*}, Patricia Uguen^{1,2,3}, Stephan Vagner^{1,2,3,#}

1 Institut Curie, PSL University, CNRS UMR 3348, F-91401 Orsay cedex, France.

2 University Paris-Saclay, CNRS UMR 3348, F-91401 Orsay cedex, France.

3 Equipe labellisée Ligue contre le Cancer.

* Equal contribution

#Correspondence to stephan.vagner@curie.fr

Keywords:

lncRNA; scaffold; signalling; RNA therapies

Abbreviations used:

DDR, DNA Damage Response; lncRNA, long noncoding RNA; RBP, RNA Binding Protein; RNA Pol II, RNA Polymerase II;

Abstract:

RNA scaffolding is an important regulatory mechanism through which lncRNAs mediate their functions. It is well established that protein complexes assembled with long ncRNAs are essential components of the machineries regulating the complex dynamic of chromatin states in response to cellular inputs. In contrast, regulation of other biological processes by lncRNAs acting as scaffolds has received much less attention. Several recent studies have focused on

the functional and structural importance of lncRNAs in the regulation of protein-protein interactions during intracellular cell signalling. In this review, we present an integrated analysis of the emerging field of lncRNA-mediated scaffolding during signal transduction cascades, from signal sensing to downstream cellular responses. Multiple evidences emphasize the role of ncRNAs-mediated scaffolds in various physiological and pathological contexts as well as its relevance in human diseases, including cancer. A better understanding of the architectural function of scaffolding ncRNAs will bring new perspectives for exploiting the emerging use of RNA therapeutics.

Introduction

Non coding RNAs (ncRNAs) are defined as RNAs with little or any known coding function. Abundance of ncRNAs has been underestimated for a long time, but recent advances in high-throughput RNA sequencing technologies, allowing the extensive study of the transcriptome, showed that ncRNAs represent more than 60 % of the genome [1]. Every year the identification of new ncRNA is increasing, their understanding has been greatly improved in the past ten years, nevertheless, characterizing their role still remains an ongoing challenge for scientists.

Many types of ncRNAs have been described, highlighting their vast diversity. In 1958, characterization of transfer RNA (tRNA), was the first ncRNA discovery [2] followed in 1973 by ribosomal RNA which are core components of the ribosome [3]. Then, snoRNA, piRNA, miRNA, circRNA, lncRNA and others have been described more recently. It appears that their roles are as diverse as their types. Several studies have shown that ncRNA have a role in the epigenetic marking of many genes, in transcription, in translation, in stress response, and in diseases such as cancer. ncRNA have been able to regulate these biological processes by the virtue of their interaction with DNA, RNA and also proteins (RNA-binding proteins: RBP) through diverse mechanisms. Long non coding RNA (lncRNA) which are defined as ncRNAs more than 200nts in length, transcribed by RNA Polymerase II (RNA Pol II), comprising of exons and introns, harbouring 5' cap and 3' poly A tail but lacking coding potential and often arising from intergenic regions of the genome has particularly emerged as key players in many of these biological processes. A number of studies have shown that often lncRNA are less expressed compared to mRNA and their expression is tissue-specific or cell type specific related to the process they are regulating [4]. They can act through three main mechanisms: guide, scaffold, decoy. Operating as guide, lncRNA can recruit protein to a specific localization [5]. To downregulate some processes, such as the regulation of the DNA damage response, lncRNA are able to turn into a decoy and sequester RNA or RBP away from their target [6].

LncRNAs can also serve as molecular scaffolds in multicomponent cellular complexes. It can indeed play a structural role by allowing the assembly of complexes. In fact, the lncRNAs are often at an advantage over protein based regulatory scaffolds because of several reasons. Firstly, lncRNAs can function immediately upon synthesis unlike protein scaffold which need to be exported to cytoplasm and translated. Secondly, owing to the greater flexible and more degenerate nature of lncRNA structure than a protein-based scaffold, a lncRNA molecular scaffold can undergo multiple conformational changes and provide multiple interfaces for assembly and activation in biological complexes. Thirdly, as described before, lncRNAs are highly specific in their expression domain, thereby providing avenue of more stringent regulatory potential. A recent high throughput RNA-Seq study across different mammalian organs by Sarropoulos et al. [7] estimated that around 51-63% of all mammalian lncRNAs are tissue specific in their expression. Interestingly, it has also been demonstrated that RNA scaffolding not only concerns protein complexes but DNA as well [8] with increased evidence of specific interactions of lncRNA with DNA to form triple helix (triplex) [9]. This allows the recruitment of proteins complexes to specific DNA regions to regulate gene expression. Moreover, the role of lncRNA in the formation of ribonucleoprotein (RNP) condensates through phase separation has been described recently, and lncRNA appears as an important structural scaffold to assemble RNP condensates such as paraspeckles or p-bodies [10–12]. By establishing a new approach called ArtiGranule (ArtiG), the authors determine the contribution of scaffold RNA to the formation of phase-separated condensates in a living system [11]. Their studies demonstrate a key regulator role of scaffold RNA in the formation of phase-separation condensates assembly since RNA could be the starting point of condensate nucleation by offering molecular scaffolding signals to organise the development of RNP assemblies.

While most of the classical assays used to uncover scaffolding function of lncRNA have relied on a combination of molecular biology techniques like CLIP (CrossLinking immunoprecipitation), iCLIP (individual CLIP), PAR CLIP (Photoactivable ribonucleoside-

enhanced CLIP), eCLIP (enhanced CLIP) [13,14], computational tools could help us to accelerate our understanding in this aspect. Examples of computational approaches to predict lncRNA function were adapted from *catRAPID* method [15,16]. A pioneering large-scale computational study to predict protein scaffolding function of lncRNA was undertaken by Ribeiro et al. [17]. Using a *catRAPID* omics algorithm which predicts RNA-protein interactions between human canonical proteome and Gencode lncRNAs based on physicochemical properties of molecules and expression data, their study predicted that almost 5% of the long non-coding transcriptome (847 lncRNAs) had the potential to scaffold key protein-protein interactions in cell signalling networks. Their predicted data showed significant overlap with independent eCLIP datasets thereby adding confidence to the analysis. Overall, this study indicated that RNA mediated scaffolding of protein complexes may be a dominant and widespread function of lncRNA [17].

In a recent study, the authors [18] integrated RNA-binding (eCLIP) data along with transcriptome (RNA-Seq), subcellular localization (fractional RNA-Seq and immunofluorescence), epigenetic activity and enhancer landscape (Histone ChIP-Seq), genome architecture and chromatin interaction (CHIA PET/HiC) information to devise a statistically defined prediction scores for lncRNA functions. Their resulting pipeline - Predicting lncRNA Activity through Integrative Data-driven Omics and Heuristics - (PLAIDOH) not only validated classical lncRNA-protein target interactions from publicly available cancer (TCGA) or ENCODE datasets but also successfully identified biologically coherent functions for lymphoma associated lncRNA RP11-960 L18.1 [18]. Other prominent examples of such comprehensive studies include lncMAP [19], Cancer lncRNA Census [20].

Cells are able to respond to their environment thanks to cell signalling which implies the transmission of a chemical signal from a sending cell to a receiving cell. Four main types of chemical signalling have been described: autocrine signalling : the sending cell is the same as the receiving cell; endocrine signalling : the sending cell uses the bloodstream to send its signal, often hormones, to the receiving cells which can be localized far away from the sending

cell; direct signalling when the sending cell uses direct connection to transmit its signal (gap junctions, complementary receptor); paracrine signalling : the sending cell releases chemical compounds which can be sensed by receiving cells in the same environment. In all the cases, the receiving cells which sense the signal activate an appropriate signal transduction pathway in response. Indeed, in response to an external or internal stimulus, signalling pathways such as MAPK, PI3k- AKT-mTOR are activated and can impact multiple cellular processes (proliferation, differentiation, mobility, apoptosis). The activation of cell signalling pathways trigger a cascade of phosphorylations and protein-protein interactions in order to transduce the signal from the cell membrane to the nucleus and then act on gene regulation as a downstream cellular response. Emerging evidence suggests that lncRNA are involved in signalling network and particularly in cancer where many signalling pathways are found dysregulated [21]. Their ability to form scaffold is particularly relevant in the context of signalling cascade of protein-protein interactions and lncRNAs begin to appear as regulators of signalling pathways. Besides, dysregulations of signalling pathways often correlate with almost every type of cancer and tumorigenesis. Next-generation sequencing showed through many studies that lncRNA and more generally ncRNA are strongly dysregulated in many diseases including cancer [22,23]. Finding a link between cell signalling, ncRNA and cancer could be one of the missing pieces in the understanding of molecular mechanisms of multifactorial diseases like cancer, and for designing of novel therapies.

In this review, we aim to focus on the emerging field of lncRNA mediated scaffolding in intracellular signalling. We discuss molecular events highlighting the scaffolding role of lncRNAs during distinct stages of cell signalling: signal sensing, signal transduction and downstream cellular responses (Fig. 1) with implications in various physiological and pathological contexts like cancer. Finally, we discuss existing avenues and further opportunities to use these vast repertoire of lncRNA as targets for therapeutic intervention.

Signal Sensing

In this section, we discuss about the role of scaffolding lncRNAs during signal sensing which is the first step in signal transduction pathways. This biological event can occur in the cytoplasm, nucleus or other cellular compartments and often involves protein-protein and protein-lipid interactions. Several lncRNAs have been demonstrated to scaffold such protein-protein and protein-lipid interactions and lncRNA association was found to be necessary for triggering a 'conformational change' in the complexes which subsequently led to activation of downstream cascades or 'signal transduction' (Fig. 2). An elegant example of this early signal sensing function has been demonstrated for lncRNA, Link A in triple negative breast cancer tissues (TNBC) [24]. Upon extracellular signal -EGF stimulation, Link A acted as a scaffold by directly binding phospholipid PtdIns(3,4,5)P₃ (or PIP₃) and protein kinase AKT. Abrogation of the scaffolding function by ASO (antisense oligonucleotides) silencing of Link A prevented a conformational change in AKT which was required for subsequent cascade activation. Notably, Link A also scaffolds key protein-protein interactions in the Hypoxia Inducible factors (HIFs) transcriptional program under normoxic conditions in TNBC cells [24]. Thus these two examples strongly establish Link A as a scaffolding lncRNA mediating key conformational changes in lipid-protein and protein-protein interactions during early events of signal sensing. The Wnt/ β -catenin pathway is also subjected to regulation by scaffolding lncRNA MUF (Mesenchymal Stem Cells Upregulated Factor) in hepatocellular carcinoma cells (HCC) [25]. In the Wnt-OFF state, glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) phosphorylates and degrades β -catenin through the ubiquitin-proteasome system. Annexin 2 (ANXA2) which is particularly over expressed in Mesenchymal stem cells and metastatic samples of HCC could disrupt GSK-3 β / β -catenin interaction [25] (Fig. 2). lncRNA MUF binds both proteins GSK-3 β and ANXA2 through distinct but partially overlapping domains. The lncRNA MUF association positively stimulated the disruption of GSK-3 β / β -catenin interactions by ANXA2, leading to activation of Wnt/ β -catenin pathway and consequently to an up regulation of β -catenin and other pro-EMT

(Epithelial Mesenchymal Transition) protein levels in nucleus and cytosol [25]. In similar mechanism, LINC00673-v4 lncRNA was shown to act as a scaffold bringing together proteins DDX3 and casein kinase 1 ϵ (CK1 ϵ) in lung adenocarcinoma cells [26] (Fig. 2). Here again, LINC00673-v4 binding led to stimulation of CK1 ϵ kinase activity and phosphorylation of dishevelled protein (Dvl) which then caused activation of Wnt/ β -catenin pathway. Silencing of LINC00673-v4 activity prevented the activation of Wnt/ β -catenin pathway in metastasizing lung adenocarcinoma cells [26].

On the other hand, signal sensing in the nucleus involves interaction with nucleic acids (DNA, RNA, chromatin) and sub-nuclear compartments. Here the stimuli can be an extracellular stimulus like UV radiation leading to DNA damage, or a diffusing protein/nucleic acid signal from the cytoplasm initiating changes in chromatin modification or DNA modification patterns or transcription programs. Initial signal sensing events upon induction of DNA double stranded breaks (DSBs) include the binding of RNA Pol II to the MRE11/RAD50/NBS1 complex and synthesis of damage-induced long non-coding RNAs (dilncRNAs) [27]. This scaffolding activity of dilncRNAs together with DICER and DROSHA synthesised small ncRNAs (DDRNs) promote DNA Damage Response (DDR) foci formation and lead to recruitment of other DNA damage sensor proteins like 53BP1. Abrogation of this lncRNA-small ncRNA pairing using antisense oligonucleotides diminished foci formation in a sequence dependent manner [27]. Interestingly, here the scaffolding function of dilncRNAs is mediated by the mechanism of phase separation [28] (discussed subsequently under section -Downstream cellular response).

Signal transduction

The transmission of the signal sensed by cell signalling receptors is made possible by a series cascade of molecular events: mostly phosphorylation cascades catalysed by kinases of the pathway and series of protein-protein interactions. This process is called signal transduction. Recently lncRNA have been identified as new actors able to regulate the signal transduction through their scaffolding role (Fig. 3). They can promote protein-protein interactions and thus have a direct impact on transduction cell signalling.

In triple negative breast cancer, lncRNA PVT1 has been shown to be able to act as a scaffold in the cytosol by directly binding KLF5 protein at two sites and increasing BAP1 stability which consequently lead to β -catenin overexpression [29]. This mechanism is responsible for a higher magnitude in signal transduction. The authors demonstrate that this β -catenin signalling regulation through lncRNA PVT1 is particularly critical for tumor growth and cell proliferation since lncRNA PVT1 depletion led to inhibition of cell proliferation and tumor growth in two different triple negative breast cancer cell lines [29]. Similar scaffolding function of lncRNA MAYA (MST1/2-antagonizing for YAP activation) has been noted during bone metastasis signalling through a cross talk between ROR1-HER3 and Hippo-YAP pathways [30] (Fig. 3). The authors showed that lncRNA MAYA provides multiple protein binding sites to form a RNA-protein complex containing HER3, LLGL2 and NSUN6 which can control the methylation of Hippo/MST1. The authors highlight the importance of secondary structure of lncRNA and new RNA binding domains recently discovered [31] which make lncRNA efficient regulatory scaffold in signal transduction. By allowing formation of complexes, scaffolding RNA can positively regulate the cell signalling pathway. Another example is lncRNA CRNDE (Colorectal Neoplasia Differentially Expressed) which directly binds DMBT1 (deleted in malignant brain tumors 1) and c-IAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) proteins by operating as molecular scaffold [32] (Fig. 3). Through an RNA pull-down assay, the authors found that lncRNA CRNDE, as a scaffold was able to bind DMBT1 and c-IAP1 which ultimately

leads to c-IAP1 stabilization. This RNA-protein complex has been shown to stimulate gallbladder carcinoma carcinogenesis by activating signal transduction PI3K-AKT pathway. Hence, these three examples illustrate the ability of scaffolding RNA to mediate protein-protein interactions, to regulate the signal transduction and thus to promote tumor growth. These concepts highlight the necessity for a better understanding of molecular mechanisms of protein-protein interaction mediated by scaffolding RNA.

On another note, it has been found that ncRNA can adopt a specific secondary structure and act as modular scaffold in order to regulate specific cell transduction signalling such as differentiation. For example, a study by Xue et al. [33] shows that the secondary structure of the lncRNA braveheart interacts with CNBP (cellular nucleic acid protein) through the binding site "AGIL" (Asymmetric G-rich internal loop), a small region of 11 nucleotides in a 5' asymmetric G-rich loop located on the lncRNA which is required for cardiomyocyte differentiation. The authors illustrate the importance of studying secondary structures of ncRNA by presenting how AGIL, a small binding motif of 11 nucleotides in braveheart is able to regulate cardiomyocyte signalling. Despite their weak sequence conservation between species, lncRNA are often highly conserved in terms of secondary structure, which suggests a crucial role for their function [34,35].

An interesting aspect of scaffold function of ncRNA is also that they appear to be involved in protein ubiquitination processes [36,37]. Perhaps, the famous example of this category of regulation is the lncRNA HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) which has been found associated with E3 ubiquitin ligases and their substrates, both containing RNA binding domains. lncRNA HOTAIR was one of the first scaffold RNA discovered [38] and it is able to assemble an epigenetic complex in order to regulate chromatin state. By possessing binding domains for a demethylase LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) and a methylase PRC2 (polycomb-repressive complex 2), lncRNA HOTAIR can regulate epigenetic inheritance. In the context of protein ubiquitination pathways, lncRNA HOTAIR seems to be necessary to control protein levels by inducing ubiquitin-mediated proteolysis. Elevated lncRNA HOTAIR level was

found to be responsible for a decay of its targets Ataxin-1 and Snurportin-1 by promoting their ubiquitylation and therefore stimulate senescence [37]. As the same role of platform for ubiquitination in gastric cancer, lncRNA HOTAIR is associated with an upregulation of cell invasiveness and tumor metastasis, by inducing Runx3 proteolysis. The authors highlight the possibility of using this interaction HOTAIR-Runx3 as a potential therapeutic target to treat gastric cancer. All these findings on scaffolding protein complexes by lncRNA HOTAIR suggest importance of lncRNA scaffolding in both physiological and pathological state.

In addition to their scaffolding role on signal transduction link to many cancers, lncRNA can also participate to innate immunity by acting as a scaffolding mediator in response to inflammasome stimuli [39]. lncRNA NEAT1 (Nuclear paraspeckle assembly transcript) illustrates this ability in mouse macrophages since it can promote the activation of inflammasomes by associating with them and consequently triggering pro-caspase-1 processing. Upon an inflammasome activating signal, lncRNA NEAT is released from paraspeckles and translocates to cytoplasm to participate in signal transduction of inflammasome activity. Their study supports a direct role of lncRNA NEAT1 in regulation inflammation.

Altogether these recent findings illustrate the crucial role of scaffolding RNA in the signal transduction from many diverse biological processes in not only physiological but also in pathological states. Scaffolding lncRNA can thus act as critical platform to guide and amplify the signal transduction.

Downstream cellular response

Final stage of signalling events often occurs in the nucleus and leads to changes in gene expression, nuclear organisation or DNA metabolism. Scaffolding lncRNAs can influence these molecular events at various levels including chromatin remodelling, transcription initiation and DNA damage response. Thus, here too, these specific lncRNAs bring together nucleic acids molecules and proteins to form architectural complexes like chromatin remodelers, transcription factor complexes or DNA damage foci. Here we discuss recently described lncRNAs which are able to bind to diverse effectors leading to different cellular answers. We do not detailed the historical examples of ribosomal and spliceosomal complexes since they have been already extensively reviewed elsewhere.

Many lncRNAs regulate activity of chromatin-modifying complexes through scaffolding properties as part of the various downstream, cellular responses of different signalling cascades. The most well known example of this category of lncRNA is lncRNA Xist which has been extensively reviewed [40], therefore here instead we will focus on the other less discussed examples. For example, lncRNA ROCK1 (Regulator of Cytokines and Inflammation) or named lnc-MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C) has been described as a positive regulator of innate immune function during pathogen infection in human. Indeed, after TLR activation, lncRNA ROCK1 interacts with APEX1 (apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1) to build a ribonucleoprotein complex binding to MARCKS promoter and then facilitating the recruitment of the histone deacetylase HDAC1 which removes acetylation on histone H3K27 [41] (Fig. 4). This complex decreases MARCKS promoter activity and Ca²⁺ signalling, but it activates inflammatory cytokine and chemokine production. By a very similar mechanism, the lncRNA HOTAIR regulates expression of c-Myc target genes in breast cancer cells [42]. HOTAIR serves as a platform to facilitate the recruitment of the chromatin-modifying enzyme LSD1 which demethylates histone H3 on K4, leading to the activation of c-Myc target genes [42]. More precisely, the authors found that HBXIP (Mammalian hepatitis B X-interacting protein) and LSD1 are scaffolded by HOTAIR to bring c-

Myc at the promoter of c-Myc target genes. This explains why c-Myc has carcinogenesis activity. Although HOTAIR usually interacts with PRC2 by its 5' end, in addition to LSD1 which interacts with the 3' end of HOTAIR, in this study, they did not detect interaction of HOTAIR with PRC2. Another interesting example is lincRAM which remodels the SWI/SNF chromatin remodelling complex to modify the chromatin at the promoter of MyoD target genes during the myogenic differentiation for muscle development and regeneration [43]. In that case, lincRAM interacts with MyoD to favor the formation of the MyoD-Baf60c-Brg1 complex which then activates the transcription of MyoD target genes through SWI/SNF chromatin modifier [43]. In the case of the MiCEE (Mirlet7d-C1D-EXOSC10- EZH2) complex, there is again a role of silencing of gene transcription mediated by a ribonucleoprotein complex. Singh et al. have demonstrated that the microRNA mirlet7d binds to lincRNA and then to C1D to silence certain bidirectionally expressed genes [44]. To enable this effect, the exosome complex degrades the ncRNA and then, the subunit EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) of PRC2 will transcriptionally silence the bidirectional gene locus by methylation of histone H3 on K27. This ribonucleoprotein complex is named MiCEE and it regulates expression of genes targeted to the perinucleolar region. In addition, the same group found recently [45] that reduced MIRLET7D in idiopathic pulmonary fibrosis alters epigenetic gene silencing driven by MiCEE complex. The lincRNA NEAT1 has an oncogenic function by promoting B-catenin nuclear transport followed by increased growth and invasion, in glioblastoma [46]. lincRNA NEAT1 is thus another case of scaffold to PRC2 via EZH2 binding to silence the promoter of negative effectors of the Wnt pathway such as Axin2, ICAT, GSK3 [46]. In the upstream events of the pathway, NEAT1 expression is activated by EGFR stimulation. Indeed STAT3 and NF- κ B bind to NEAT1 promoter to stimulate its expression. Although the 7SK RNA is very well known as regulator of RNA Pol II-dependant P-TEFb transcription (see below regulation transcription section), it is also implicated in chromatin remodeling at enhancers loci by interacting with BAF, a chromatin-remodelling complex [47]. BAF binds to the stem-loop 3 (SL3) of 7SK RNA where HEXIM interacts, but not exactly at the same locus. 7SK performs the role of platform and it

drives interaction with proteins to regulate transcription at enhancers via BAF and at promoters via P-TEFb.

Apart from chromatin remodelling complexes, certain lncRNAs are also directly associated with scaffolding transcription initiation complexes (Fig. 4). An interesting example of this category of scaffolding lncRNAs is 7SK RNA, as it employs its scaffolding function to network with different interacting proteins thereby activating different transcriptional programmes depending on the cellular condition [48]. Under basal conditions, when 7SK is bound to HEXIM, it facilitates the recruitment of P-TEFb to form the P-TEFb inactive complex leading to the pause of the promoter proximal transcription of many genes [49]. During genotoxic stress, activated kinase p38 increases the binding of RBM7 protein with the SL3 of 7SK RNA. This interaction in turn triggers the release of P-TEFb from 7SK snRNP complex, but without dissociation of HEXIM from 7SK. These alterations in RNA-protein interactions promote activation of RNA Pol II transcription of specific DDR genes, leading to a pro-survival transcriptional programme [50]. Recent data have shown that 7SK RNA is also able to bind to Ku protein [51] which is a sensor of the double strand breaks and thus activates the non-homologous end-joining DNA repair pathway. Ku binds to the G-rich loop of the SL1 of 7SK RNA and recent data suggests that it is bound to the inactive P-TEFb complex [51]. However, the underlying mechanism which governs the choice of partner of 7SK RNA leading to opposing downstream responses still remains to be elucidated. Transcription can be regulated by intronic circular RNA, such as Circ-CTNNB1 which is mostly expressed in the nucleus. The target genes of circ-CTNNB1 are associated with the Wnt signalling pathway which explains the over-expression of β -catenin in cancer cells. Circ-CTNNB1 is upregulated in cancer tissues and cell lines and it is also described to be associated with unfavorable outcomes in patients with gastric cancer. It binds to the DDX3 protein (Dead-box polypeptide 3) and so facilitating the direct interaction with the transcription factor YY1 (Yin Yang 1) followed by its transactivation [52]. In addition, the authors have shown that blocking interaction between DDX3 and CTNNB1 inhibits growth and cancer progression. The lncRNA gardin inhibits

cellular senescence since it is a platform to stabilize LRP130 and PGC1alpha heterodimers formation at FOXO4 promoter to repress its activation and then inhibiting p21 transcription [53]. Consistent with this mechanism, guardian expression, although being p53-independent, is activated by rapamycin, which is an agent known to be suppressor of cell senescence. FOSL2 (FOS-like antigen 2) protein is a repressor of guardian transcription. Low levels of FOSL2 are observed after rapamycin exposition and thereby increased expression of guardian. In the contrary, A-ROD (Activating Regulator of DKK1) is a lncRNA which regulates the Wnt signalling pathway in many tissues and in breast cancer [54]. This lncRNA is transcribed 130Kb downstream to DKK1 (Dickkopf homolog 1) on the opposite strand, it is spliced and polyadenylated. It facilitates the recruitment of the transcriptional factor EBP1 at the DKK1 promoter. Furthermore, transcriptional enhancement of DKK1 is dependent to the release of A-ROD from the chromatin. The necessity to be dissociated to the chromatin to act is a novel property of lncRNA.

Some lncRNA are involved in the DNA damage response (DDR) by modulating interaction between effectors of the DDR (Fig. 4). The lncRNA guardian is crucial for genomic stability in steady state cells and under genotoxic stress. It plays role both in the telomere formation and in the repair of double strand breaks. Firstly, it sequesters microRNA mir23a which normally binds to Telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2) mRNA : guardian acts as a sponge of mir23a [55]. This allows TRF2 to prevent the chromosome end-to-end fusion and thus protects telomere formation. The second action of lncRNA guardian is to form a platform to facilitate heterodimerization of BRCA1 (Breast cancer 1) and BARD1 (BRAC1-associated RING domain protein 1) which are important effectors of Homologous recombination process to repair double strand breaks. Both proteins bind to guardian through different structural domains. It is important to note that expression of guardian is p53-dependent. HITT (HIF-1alpha inhibitor at translation level) is an another lncRNA involves in the HR repair [56]. After DSBs, EGR1 (Early Growth Response 1) is increased and activates transcription of lncRNA HITT which interacts with ATM at the HEAT repeats domain. At basal level, the presence of HITT

does not inhibit ATM function. However, after genotoxic stress, there is a competition between HITT and binding of NBS1 (MRN subunit) with ATM leading to decrease HR activity and then promote apoptosis. Thus HITT is the first example of RNA directly binding ATM to regulate DDR. The lncRNA NORAD (non-coding RNA activated by DNA damage) is required for genomic stability [57]. Indeed it forms a complex with many proteins involved in DNA replication and repair, in steady state cells and it is localised in the nucleus after replication stress or DNA damage. NORAD interacts with RBMX, a protein involved into HR repair, and controls its ability to form a ribonucleoprotein complex named NARC1 (NORAD-activated ribonucleoprotein complex 1). NARC1 contains TOPO1 (topoisomerase I), ALREF and the PRPF19-CDC5L complex, all those proteins playing essential role into DNA replication and genomic stability. NORAD, via RBMX, is a scaffold to the NARC1 formation involves into genomic stability. The dilncRNA (damage-induced long non-coding RNAs) are bidirectionally synthesized de novo at DSB sites by RNA Pol II and they are further cleaved into shorter DDRNA (DDR RNA) by Drosha and Dicer [27] which are necessary to the DDR focus formation [58]. At resected ends, dilncRNA form an DNA-RNA hybrids named R-loop that could be a scaffold to the rapid recruitment of DDR factors to realize homologous recombination. Thus dilncRNA function is to bring to close proximity many DDR proteins. However both the biogenesis and the role of RNAs present at the DSB sites are still under investigation [28].

Another function in which lncRNA is also implicated is the molecular organization of the nucleus, and more precisely, they are involved into the liquid-liquid phase separation that leads to the creation of membraneless compartments (Fig. 4). These uncommon compartments are really important to add another layer of physical separation of processes in the nucleus. Paraspeckles are membraneless-organelle and they are one type of nuclear bodies induced by stress and they contain up to 40 RBP around to the longer isoform of the lncRNA NEAT1 which is a necessary structural factor for the paraspeckles formation [59]. NEAT1 thus allows the recruitment of many RBP by RNA-protein interactions to built paraspeckles that regulate gene expression. The presence of NEAT1 is important to the liquid-liquid phase separation

phenomenon that is observed in the paraspeckles. The low complexity of domains named “prion-like domain” are present in two third of the proteins [60] and it is crucial to liquid-liquid phase separation. Low-complexity domains and disordered regions of the RBP allow formation of weak interaction between molecules to promote phase separation. Thus NEAT1 would be a platform to condensate RBPs necessary to induce phase separation. Regarding to diIncRNA, the authors [28] found that diIncRNA molecules, with γ H2AX, promote liquid-liquid phase separation of 53BP1 to form the DDR foci. This then allows a local concentration of DDR factors to build at the proximity of DSBs foci and then mount a rapid response to repair DNA.

Conclusions, perspectives and future directions

To conclude the ever increasing body of evidence implicating lncRNAs with cancer and other diseases, there needs to be an implementation of standardised tools to screen potential scaffolding lncRNA for diagnostic, prognostic or therapeutic targets.

Cancer immunotherapy which involves administration of antibodies targeting Immune checkpoint inhibitors (ICs) like CTLA4, PD-1, PD-L1 signalling pathways and ultimately causing activation of cytotoxic T cell response against cancer cells is one of the most current promising avenues of cancer treatment [61,62] (Fig. 5). Additionally recent studies have revealed that administration of pro-inflammatory cytokines like IL-6 in conjunction with PD-L1 inhibitors can enhance the efficacy of treatment in certain models [63]. IL-6 has been shown to be regulated directly and indirectly by several lncRNAs including DILC, HOTAIR, GAS5, RP1-445 H22.4, H19 which impinge on the NFkB pathway resulting in distinct outcomes [64]. While majority of these lncRNAs exert their effects by acting as competing endogenous RNAs (ceRNAs) or pseudogenes, more mechanistic studies are needed for therapeutic intervention. Using lncRNA and genomic data from a cohort of 348 bladder cancer patients (IMvigor210 trial) and 71 melanoma patients (TCGA) subjected to immunotherapy, Yu et al. [65] used a multiomics pipeline taking into account specific lncRNA signature, tumor alteration burden, PD-L1 expression, and Cytotoxic T Cell infiltration rates. Based on their analysis, they could divide the patients into four different subclasses with respect to overall survival rate. Interestingly, patients who belonged to the most immune immune class characterised by immune-functional lncRNA signature and high CTL infiltration had the highest overall survival rate. These emerging studies underscore the potential of lncRNAs to be used as biomarkers for cancer immunotherapy [65]. Similar integrative computational analysis has also been done for identifying tumor-infiltrating immune-related lncRNAs (TILncRNA) as predictive biomarkers for prognosis and immunotherapy response in NSCLC tumors by molecular profiling of purified immune cells, cancer cell lines and bulk cancer tissues [66]. In this context, modified Proximity

Ligation Assays which can detect RNA:protein interactions can also be used to score patients with solid tumors for lncRNAs which has been established as reliable markers for different cancers. Similarly, recent advances in single molecule live-imaging methods like fluorogenic oligonucleotide-based probe based molecular beacons which can convert RNA target hybridization into a quantifiable fluorescence signal can greatly expedite our understanding of the highly cell and tissue type specific lncRNA localization patterns and spatial dynamics [67].

The emerging world of RNA therapeutics has made targeting the possibility of drugging a lncRNA with the same efficiency as that of a protein target. This is especially significant for disorders resulting from errors in cell signalling pathways. Since an RNA therapeutic in principle targets the original RNA or protein which is responsible for the disease condition, RNA therapies have a better chance of success in patients rather than other small molecule inhibitors which target or block downstream biological pathways. Antisense oligonucleotides (ASOs) which are typically 16-22nt long synthetic single-stranded DNA analogs, often harbouring sugar and phosphorothioate backbones, that selectively bind to cognate complementary RNA targets. ASOs have the potential to reduce, restore, or modify RNA and protein expression by multiple mechanisms including the RNase H1 pathway and splicing (Fig. 5). Thus these strategies can be utilised to selectively target lncRNAs arising from intronic segments of genes. In recent years, ASOs based therapies have shown better dose dependent responses and reversible effects of target gene expression compared to siRNA approaches. These advantages of ASOs has led to a number of preclinical studies which targeted lncRNAs and demonstrated a significant amelioration in the disease condition as in the case of Wisp2 super-enhancer-associated lncRNA (WISPER) for cardiac fibrosis and LUNAR1 for human T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) [68,69]. It is to be noted that lncRNAs in general often show poor sequence conservation between species [70]. This often imposes limitations in preclinical studies with other model organisms. In spite of these difficulties, preclinical studies for lncRNA CHROME and H19 was undertaken in animal models of cardiovascular disease [71,72]. At a molecular level, Zalatan et al. [73] designed CRISPR associated RNA scaffolds

which could be targeted to specific genomic locus and be used to engineer specific transcriptional cascades. Such strategy opens up new possibilities for metabolic rewiring as a therapeutic strategy for oncogenic signalling and metabolic diseases (Fig. 5). In yet another strategy, synthetic in vitro transcribed lncRNAs containing an inverted SINEB2 repeat element (SINEUPs) were designed to increase Glial Cell Derived Neurotrophic Factor (Gdnf) protein levels by increasing translation initiation efficiency [74]. Interestingly, this procedure had no effect on Gdnf mRNA levels thereby making a possible therapeutic procedure more robust to cellular feedback [74] (Fig. 5).

Peptide Nucleic Acids (PNA) which consist of a neutral charged peptide backbone that is conjugated to nucleic acids can be yet another interesting approach to target lncRNAs especially scaffolding lncRNAs which mediate RNA-protein and protein-protein interactions [75] (Fig. 5). The PNA backbone can modify by pH-low insertion peptide (pHLIP) specific target lncRNAs in the low pH tumor immune microenvironment. Studies performed in mice harboring platinum resistant xenografts of ovarian cancer, show that the administration of PNA targeting single stranded region of scaffolding lncRNA HOTAIR perturbed its interaction with PRC2. This leads to NF- κ B cascade activation and ultimately re-sensitising the tumor to chemotherapy [75].

Notably, not only the cell specific expression of lncRNAs but also epitranscriptomic signatures on the lncRNAs could modulate their influence in oncogenic signalling. In the last decade, several high throughput studies have identified methylation, pseudouridylation, modifications in lncRNAs [76,77]. Further developments in 3rd generation sequencing, mass spectrometry and other methodologies will enable dissection of each RNA modification in cellular context [78].

Acknowledgments

SV is supported by the 'Centre National de Recherche Scientifique', the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale', the 'Ligue Nationale contre le Cancer'. The schemes have been created by BioRender.com.

References

- [1] S. Djebali, C.A. Davis, A. Merkel, A. Dobin, T. Lassmann, A. Mortazavi, et al, Landscape of transcription in human cells, *Nature*. 489 (2012) 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>.
- [2] M.B. Hoagland, M.L. Stephenson, J.F. Scott, L.I. Hecht, P.C. Zamecnik, A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis ?, *J Biol Chem*. 231 (1958) 241–257. <http://www.jbc.org/>.
- [3] G. Fox, C. Woese, 5S RNA secondary structure, *Nature*. 256 (1975) 505–507.
- [4] T. Derrien, R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, et al, The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression, *Genome Res*. 22 (2012) 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>.
- [5] K.C. Wang, Y.W. Yang, B. Liu, A. Sanyal, R. Corces-Zimmerman, Y. Chen, et al, A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression, *Nature*. 472 (2011) 120–126. <https://doi.org/10.1038/nature09819>.
- [6] M. Li, H. Gou, B.K. Tripathi, J. Huang, S. Jiang, W. Dubois, et al, An Apela RNA-Containing Negative Feedback Loop Regulates p53-Mediated Apoptosis in Embryonic Stem Cells, *Cell Stem Cell*. 16 (2015) 669–683. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.002>.
- [7] I. Sarropoulos, R. Marin, M. Cardoso-Moreira, H. Kaessmann, Developmental dynamics of lncRNAs across mammalian organs and species, *Nature*. 571 (2019) 510–514. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1341-x>.
- [8] F. Wang, P. Chainani, T. White, J. Yang, Y. Liu, B. Soibam, Deep learning identifies genome-wide DNA binding sites of long noncoding RNAs, *RNA Biol*. 15 (2018) 1468–1476. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1551704>.

- [9] C.C. Kuo, S. Hänzelmann, N. Sentürk Cetin, S. Frank, B. Zajzon, J.P. Derks, et al, Detection of RNA-DNA binding sites in long noncoding RNAs, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) e32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz037>.
- [10] F. Cid-Samper, M. Gelabert-Baldrich, B. Lang, N. Lorenzo-Gotor, R.D. Ponti, L.A.W.F.M. Severijnen, et al, An Integrative Study of Protein-RNA Condensates Identifies Scaffolding RNAs and Reveals Players in Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome, *Cell Rep.* 25 (2018) 3422-3434.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.076>.
- [11] M. Garcia-Jove Navarro, S. Kashida, R. Chouaib, S. Souquere, G. Pierron, D. Weil, Z. Gueroui, RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA–protein condensates, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11241-6>.
- [12] E.M. Langdon, Y. Qiu, A.G. Niaki, G.A. McLaughlin, C.A. Weidmann, T.M. Gerbich, et al, mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation, *Science* (80-.). 360 (2018) 922–927. <https://doi.org/10.1126/science.aar7432>.
- [13] B.R. Graveley, RNA Matchmaking: Finding Cellular Pairing Partners, *Mol. Cell.* 63 (2016) 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.001>.
- [14] E.L. Van Nostrand, G.A. Pratt, A.A. Shishkin, C. Gelboin-Burkhart, M.Y. Fang, B. Sundararaman, et al, Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP), *Nat. Methods.* 13 (2016) 508–514. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3810>.
- [15] M. Bellucci, F. Agostini, M. Masin, G.G. Tartaglia, Predicting protein associations with long noncoding RNAs, *Nat. Methods.* 8 (2011) 444–445. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1611>.
- [16] C.M. Livi, P. Klus, R. Delli Ponti, G.G. Tartaglia, CatRAPID signature: Identification of ribonucleoproteins and RNA-binding regions, *Bioinformatics.* 32 (2016) 773–775. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv629>.

- [17] D.M. Ribeiro, A. Zanzoni, A. Cipriano, R.D. Ponti, L. Spinelli, M. Ballarino, et al, Protein complex scaffolding predicted as a prevalent function of long non-coding RNAs, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 917–928. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1169>.
- [18] S.C. Pyfrom, H. Luo, J.E. Payton, PLAIDOH: A novel method for functional prediction of long non-coding RNAs identifies cancer-specific LncRNA activities, *BMC Genomics.* 20 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5497-4>.
- [19] Y. Li, L. Li, Z. Wang, T. Pan, N. Sahni, X. Jin, et al, LncMAP: Pan-cancer Atlas of long noncoding RNA-mediated transcriptional network perturbations, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 1113–1123. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1311>.
- [20] J. Carlevaro-Fita, A. Lanzós, L. Feuerbach, C. Hong, D. Mas-Ponte, J.S. Pedersen, et al, Cancer LncRNA Census reveals evidence for deep functional conservation of long noncoding RNAs in tumorigenesis, *Commun. Biol.* 3 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0741-7>.
- [21] P. fen Fu, X. Zheng, X. Fan, A. fu Lin, Role of cytoplasmic lncRNAs in regulating cancer signaling pathways, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 20 (2019). <https://doi.org/10.1631/jzus.B1800254>.
- [22] G.A. Cipolla, J.C. de Oliveira, A. Salviano-Silva, S.C. Lobo-Alves, D.S. Lemos, L.C. Oliveira, et al, Long non-coding RNAs in multifactorial diseases: Another layer of complexity, *Non-Coding RNA.* 4 (2018). <https://doi.org/10.3390/ncrna4020013>.
- [23] M. Huarte, The emerging role of lncRNAs in cancer, *Nat. Med.* 21 (2015) 1253–1261. <https://doi.org/10.1038/nm.3981>.
- [24] A. Lin, Q. Hu, C. Li, Z. Xing, G. Ma, C. Wang, et al, The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors, *Nat. Cell Biol.* 19 (2017) 238–251. <https://doi.org/10.1038/ncb3473>.
- [25] X. Yan, D. Zhang, W. Wu, S. Wu, J. Qian, Y. Hao, et al, Mesenchymal stem cells promote hepatocarcinogenesis via lncRNA–MUF interaction with ANXA2 and miR-34a, *Cancer Res.* 77 (2017) 6704–6716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1915>.

- [26] H. Guan, T. Zhu, S. Wu, S. Liu, B. Liu, J. Wu, et al, Long noncoding RNA LINC00673-v4 promotes aggressiveness of lung adenocarcinoma via activating WNT/ β -catenin signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 14019–14028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900997116>.
- [27] F. Michelini, S. Pitchiaya, V. Vitelli, S. Sharma, U. Gioia, F. Pessina, et al, Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks, *Nat. Cell Biol.* 19 (2017) 1400–1411. <https://doi.org/10.1038/ncb3643>.
- [28] F. Pessina, F. Giavazzi, Y. Yin, U. Gioia, V. Vitelli, A. Galbiati, et al, Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors, *Nat. Cell Biol.* 21 (2019) 1286–1299. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0392-4>.
- [29] J. Tang, Y. Li, Y. Sang, B. Yu, D. Lv, W. Zhang, H. Feng, LncRNA PVT1 regulates triple-negative breast cancer through KLF5/ β -catenin signaling, *Oncogene.* 37 (2018) 4723–4734. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0310-4>.
- [30] C. Li, S. Wang, Z. Xing, A. Lin, K. Liang, J. Song, et al, A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis, *Nat. Cell Biol.* 19 (2017) 106–119. <https://doi.org/10.1038/ncb3464>.
- [31] A. Castello, B. Fischer, K. Eichelbaum, R. Horos, B.M. Beckmann, C. Strein, et al, Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins, *Cell.* 149 (2012) 1393–1406. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.031>.
- [32] S. Shen, H. Liu, Y. Wang, J. Wang, X. Ni, Z. Ai, et al, Long non-coding RNA CRNDE promotes gallbladder carcinoma carcinogenesis and as a scaffold of DMBT1 and C-IAP1 complexes to activating PI3K-AKT pathway, 2016. www.impactjournals.com/oncotarget/.
- [33] Z. Xue, S. Hennelly, B. Doyle, A.A. Gulati, I. V. Novikova, K.Y. Sanbonmatsu, L.A. Boyer, A G-Rich Motif in the lncRNA Braveheart Interacts with a Zinc-Finger Transcription

- Factor to Specify the Cardiovascular Lineage, *Mol. Cell.* 64 (2016) 37–50.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.010>.
- [34] L. Martens, F. Rühle, M. Stoll, LncRNA secondary structure in the cardiovascular system, *Non-Coding RNA Res.* 2 (2017) 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2017.12.001>.
- [35] A. Zampetaki, A. Albrecht, K. Steinhofel, Long non-coding RNA structure and function: Is there a link?, *Front. Physiol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01201>.
- [36] M. Xue, L. Yi Chen, W. jia Wang, T. ting Su, L. hong Shi, L. Wang, et al, HOTAIR induces the ubiquitination of Runx3 by interacting with Mex3b and enhances the invasion of gastric cancer cells, *Gastric Cancer.* 21 (2018) 756–764.
<https://doi.org/10.1007/s10120-018-0801-6>.
- [37] J.H. Yoon, K. Abdelmohsen, J. Kim, X. Yang, J.L. Martindale, K. Tominaga-Yamanaka, et al, Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination, *Nat. Commun.* 4 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms3939>.
- [38] M.-C. Tsai, O. Manor, Y. Wan, N. Mosammaparast, J.K. Wang, F. Lan, et al, Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes, *Science* (80-). 329 (2010) 689–693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>.
- [39] P. Zhang, L. Cao, R. Zhou, X. Yang, M. Wu, The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages, *Nat. Commun.* 10 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09482-6>.
- [40] A. Loda, E. Heard, Xist RNA in action: Past, present, and future, *PLoS Genet.* 15 (2019).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008333>.
- [41] Q. Zhang, T. Chao, V.S. Patil, Y. Qin, S.K. Tiwari, J. Chiou, et al, The long noncoding RNA ROCK1 regulates inflammatory gene expression, *EMBO J.* 38 (2019).
<https://doi.org/10.15252/emj.2018100041>.
- [42] Y. Li, Z. Wang, H. Shi, H. Li, L. Li, R. Fang, et al, HBXIP and LSD1 scaffolded by lncRNA hotair mediate transcriptional activation by c-Myc, *Cancer Res.* 76 (2016) 293–304.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3607>.

- [43] X. Yu, Y. Zhang, T. Li, Z. Ma, H. Jia, Q. Chen, et al, Long non-coding RNA Linc-RAM enhances myogenic differentiation by interacting with MyoD, *Nat. Commun.* 8 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms14016>.
- [44] I. Singh, A. Contreras, J. Cordero, K. Rubio, S. Dobersch, S. Günther, et al, MiCEE is a ncRNA-protein complex that mediates epigenetic silencing and nucleolar organization, *Nat. Genet.* 50 (2018) 990–1001. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0139-3>.
- [45] K. Rubio, I. Singh, S. Dobersch, P. Sarvari, S. Günther, J. Cordero, et al, Inactivation of nuclear histone deacetylases by EP300 disrupts the MiCEE complex in idiopathic pulmonary fibrosis, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10066-7>.
- [46] Q. Chen, J. Cai, Q. Wang, Y. Wang, M. Liu, J. Yang, et al, Long noncoding RNA NEAT1, regulated by the EGFR pathway, contributes to glioblastoma progression through the WNT/b-catenin pathway by scaffolding EZH2, *Clin. Cancer Res.* 24 (2018) 684–695. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0605>.
- [47] R.A. Flynn, B.T. Do, A.J. Rubin, E. Calo, B. Lee, H. Kuchelmeister, et al, 7SK-BAF axis controls pervasive transcription at enhancers, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 231–238. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3176>.
- [48] S. Egloff, C. Studniarek, T. Kiss, 7SK small nuclear RNA, a multifunctional transcriptional regulatory RNA with gene-specific features, *Transcription.* 9 (2018) 95–101. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1344346>.
- [49] L. Core, K. Adelman, Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: A nexus of gene regulation, *Genes Dev.* 33 (2019) 960–982. <https://doi.org/10.1101/gad.325142.119>.
- [50] A. Bugai, A.J.C. Quaresma, C.C. Friedel, T. Lenasi, R. Düster, C.R. Sibley, et al, P-TEFb Activation by RBM7 Shapes a Pro-survival Transcriptional Response to Genotoxic Stress, *Mol. Cell.* 74 (2019) 254-267.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.033>.
- [51] O. Shadrina, I. Garanina, S. Korolev, T. Zatsepin, J. Van Assche, F. Daouad, et al, Analysis of RNA binding properties of human Ku protein reveals its interactions with

- 7SK snRNA and protein components of 7SK snRNP complex, *Biochimie*. 171–172 (2020) 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.016>.
- [52] F. Yang, E. Fang, H. Mei, Y. Chen, H. Li, D. Li, et al, Cis-Acting circ-CTNNB1 Promotes β -Catenin Signaling and Cancer Progression via DDX3-Mediated Transactivation of YY1, *Cancer Res.* 79 (2019) 557–571. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1559>.
- [53] X. Sun, R.F. Thorne, X.D. Zhang, M. He, J. Li, S. Feng, et al, Lnc RNA GUARDIN suppresses cellular senescence through a LRP 130- PGC 1 α - FOXO 4-p21-dependent signaling axis , *EMBO Rep.* 21 (2020). <https://doi.org/10.15252/embr.201948796>.
- [54] E. Ntini, A. Louloupis, J. Liz, J.M. Muino, A. Marsico, U.A.V. Ørom, Long ncRNA A-ROD activates its target gene DKK1 at its release from chromatin, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04100-3>.
- [55] W.L. Hu, L. Jin, A. Xu, Y.F. Wang, R.F. Thorne, X.D. Zhang, M. Wu, GUARDIN is a p53-responsive long non-coding RNA that is essential for genomic stability, *Nat. Cell Biol.* 20 (2018) 492–502. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0066-7>.
- [56] K. Zhao, X. Wang, X. Xue, L. Li, Y. Hu, A long noncoding RNA sensitizes genotoxic treatment by attenuating ATM activation and homologous recombination repair in cancers, *PLoS Biol.* 18 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000666>.
- [57] M. Munschauer, C.T. Nguyen, K. Sirokman, C.R. Hartigan, L. Hogstrom, J.M. Engreitz, et al, The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability, *Nature*. 561 (2018) 132–136. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0453-z>.
- [58] J. Domingo-Prim, F. Bonath, N. Visa, RNA at DNA Double-Strand Breaks: The Challenge of Dealing with DNA:RNA Hybrids, *BioEssays*. 42 (2020). <https://doi.org/10.1002/bies.201900225>.
- [59] C.M. Clemson, J.N. Hutchinson, S.A. Sara, A.W. Ensminger, A.H. Fox, A. Chess, J.B. Lawrence, An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles, *Mol. Cell.* 33 (2009) 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026>.

- [60] S. Hennig, G. Kong, T. Mannen, A. Sadowska, S. Kobelke, A. Blythe, et al, Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles, *J. Cell Biol.* 210 (2015) 529–539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504117>.
- [61] D.R. Leach, M.F. Krummel, J.P. Allison, Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade, *Science* (80-.). 271 (1996) 1734–1736. <http://science.sciencemag.org/>.
- [62] J.L. Riley, PD-1 signaling in primary T cells, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 114–125. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x>.
- [63] T.A. Mace, R. Shakya, J.R. Pitarresi, B. Swanson, C.W. McQuinn, S. Loftus, et al, IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer, *Gut.* 67 (2018) 320–332. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311585>.
- [64] J. Zhang, M. Chu, Targeting of IL-6 relevant long noncoding RNA profiles in inflammatory and tumorous disease, *Inflammation.* 42 (2019) 1139–1146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10753-019-00995-2>.
- [65] Y. Yu, W. Zhang, A. Li, Y. Chen, Q. Ou, Z. He, et al, Association of Long Noncoding RNA Biomarkers With Clinical Immune Subtype and Prediction of Immunotherapy Response in Patients With Cancer, *JAMA Netw. Open.* 3 (2020) e202149. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.2149>.
- [66] J. Sun, Z. Zhang, S. Bao, C. Yan, P. Hou, N. Wu, et al, Identification of tumor immune infiltration-associated lncRNAs for improving prognosis and immunotherapy response of patients with non-small cell lung cancer, *J. Immunother. Cancer.* 8 (2020). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000110>.
- [67] Y. Ying, S. Mao, C. Krueger, A. Chen, Live-cell imaging of long noncoding RNAs using molecular beacons, *Methods Mol Biol.* 2038 (2019) 21–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9674-2_2.
- [68] R. Micheletti, I. Plaisance, B.J. Abraham, A. Sarre, C.C. Ting, M. Alexanian, et al, The long noncoding RNA Wisper controls cardiac fibrosis and remodeling, *Sci. Transl. Med.* 9 (2017). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai9118>.

- [69] T. Trimarchi, E. Bilal, P. Ntziachristos, G. Fabbri, R. Dalla-Favera, A. Tsirigos, I. Aifantis, Genome-wide mapping and characterization of notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia, *Cell*. 158 (2014) 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.049>.
- [70] S. Washietl, M. Kellis, M. Garber, Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals, *Genome Res.* 24 (2014) 616–628. <https://doi.org/10.1101/gr.165035.113>.
- [71] E.J. Hennessy, C. van Solingen, K.R. Scacalossi, M. Ouimet, M.S. Afonso, J. Prins, et al, The long noncoding RNA CHROME regulates cholesterol homeostasis in primates, *Nat. Metab.* 1 (2019) 98–110. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0004-9>.
- [72] D.Y. Li, A. Busch, H. Jin, E. Chernogubova, J. Pelisek, J. Karlsson, et al, H19 induces abdominal aortic aneurysm development and progression, *Circulation*. 138 (2018) 1551–1568. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032184>.
- [73] J.G. Zalatan, M.E. Lee, R. Almeida, L.A. Gilbert, E.H. Whitehead, M. La Russa, et al, Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds, *Cell*. 160 (2015) 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>.
- [74] S. Espinoza, M. Scarpato, D. Damiani, F. Managò, M. Mereu, A. Contestabile, et al, SINEUP Non-coding RNA Targeting GDNF Rescues Motor Deficits and Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease, *Mol. Ther.* 28 (2020) 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.005>.
- [75] A.R. Özeş, Y. Wang, X. Zong, F. Fang, J. Pilrose, K.P. Nephew, Therapeutic targeting using tumor specific peptides inhibits long non-coding RNA HOTAIR activity in ovarian and breast cancer, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00966-3>.
- [76] N. Liu, M. Parisien, Q. Dai, G. Zheng, C. He, T. Pan, Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA, *RNA*. 19 (2013) 1848–1856. <https://doi.org/10.1261/rna.041178.113>.
- [77] Y. Zhang, D. Wang, D. Wu, D. Zhang, M. Sun, Long Noncoding RNA KCNMB2-AS1 Stabilized by N6-Methyladenosine Modification Promotes Cervical Cancer Growth

Through Acting as a Competing Endogenous RNA, *Cell Transplant.* 29 (2020).
<https://doi.org/10.1177/0963689720964382>.

- [78] S. Dinescu, S. Ignat, A.D. Lazar, C. Constantin, M. Neagu, M. Costache, Epitranscriptomic signatures in lncRNAs and their possible roles in cancer, *Genes (Basel)*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/genes10010052>.

Figure legends

Fig. 1. Scaffolding lncRNA present plethora of functions in cell signalling. LncRNA act as scaffold at all stages of signalling pathway, from signal sensing (1) to signal transduction (2) leading to downstream cellular responses (3).

Fig. 2. LncRNAs act as signal sensing in cells. LncRNA, like Link A, can be scaffold for protein-lipid and protein-protein interactions to further activate specific pathway (A). LncRNA, such as MUF or LINC006673-v4, can be the initiating step to downstream activation of a pathway (for example Wnt/ β -catening pathway) through protein-protein interactions at different stage of the cascade (B and C). To simplify the scheme, only the steps of the pathway which are involved in the interaction with RNA are shown. LA, lung adenocarcinoma; HCC-MSC, Hepatocellular Carcinoma Cells-Mesenchymal Stem Cells.

Fig. 3. LncRNAs control signal transduction in cells. LncRNA CRNDE is an example of lncRNA (e.g. PVT1, MAYA, CRNDE, HOTAIR) which are platform for protein binding, leading to the activation of signalling pathway. In the contrary, lncRNA MAYA acts as an inhibitor of the signalling pathway. GB, gallbladder carcinoma.

Fig. 4. LncRNAs are scaffold of various downstream cellular response. Many lncRNAs (e.g. HOTAIR, linc-RAM, 7SK RNA, MiCEE, ROCK1, NEAT1) regulate activity of chromatin remodeler. Transcription is regulated by many lncRNAs such as 7SK RNA, GUARDIN, A-ROD, and the circular lncRNA CTNNB1. DNA damage response is under the control of different lncRNAs (e.g. GUARDIN, NORAD, dilncRNA, HITT). The phase separation at the paraspeckles is regulated by dilncRNA (e.g. NEAT1).

Fig. 5. Illustration of avenues using scaffolding properties of lncRNA as potential tools in medical field. Many methods (e.g. siRNA, ASO, PNA, SINEUP, synthetic CRISPR scaffold)

are under investigation to target lncRNA for therapeutic intervention (left side) and for prognostic biomarkers in cancer immunotherapy (right side) (e.g. H19, DILC, GASS, RP1-445 H22.4, HOTAIR). ASO, Antisense Oligonucleotides; PNA, Peptide Nucleic Acids; SINEUP, Synthetic In Vitro Transcribed lncRNAs.

Figure 1.

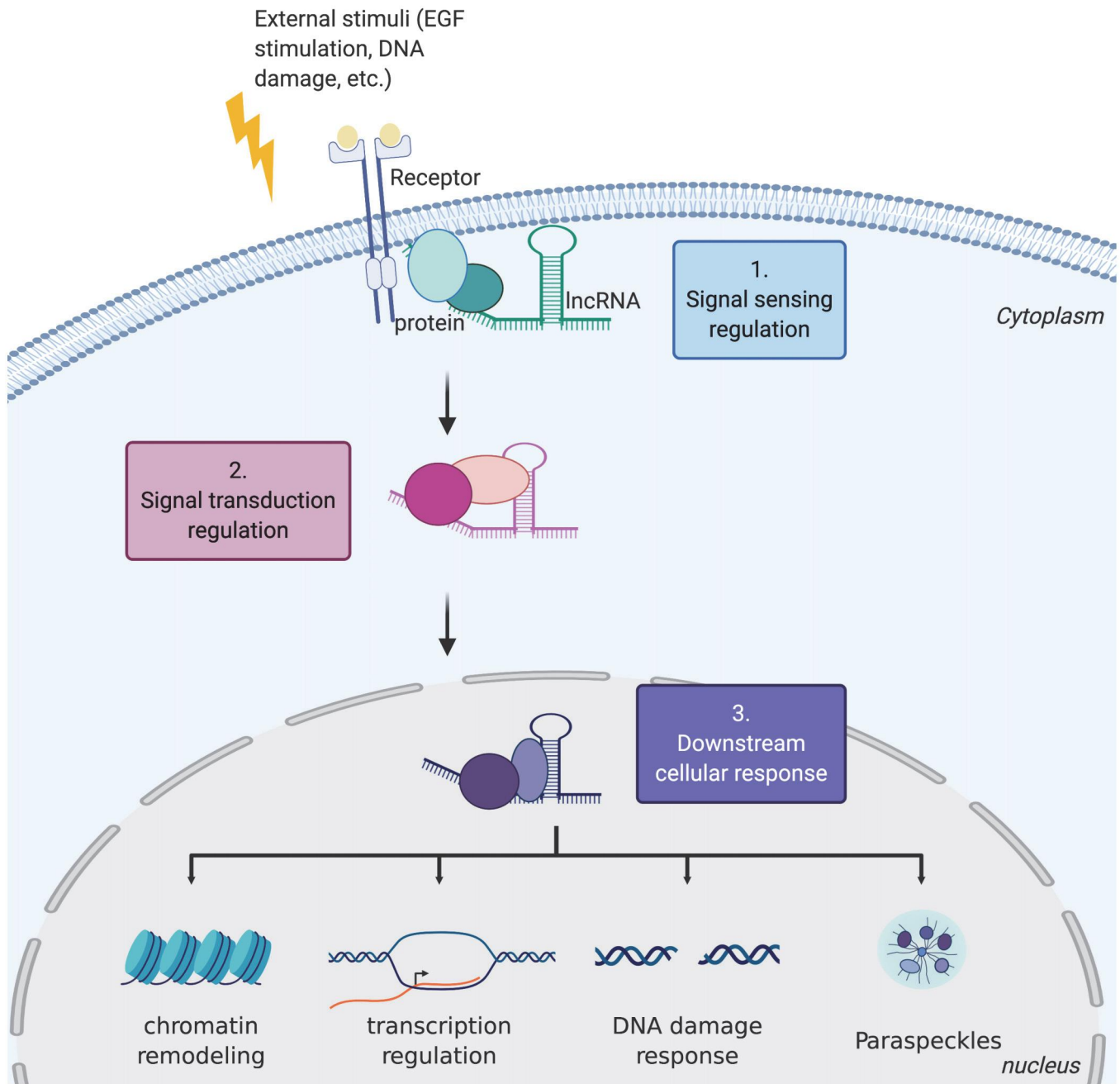


Figure 2.

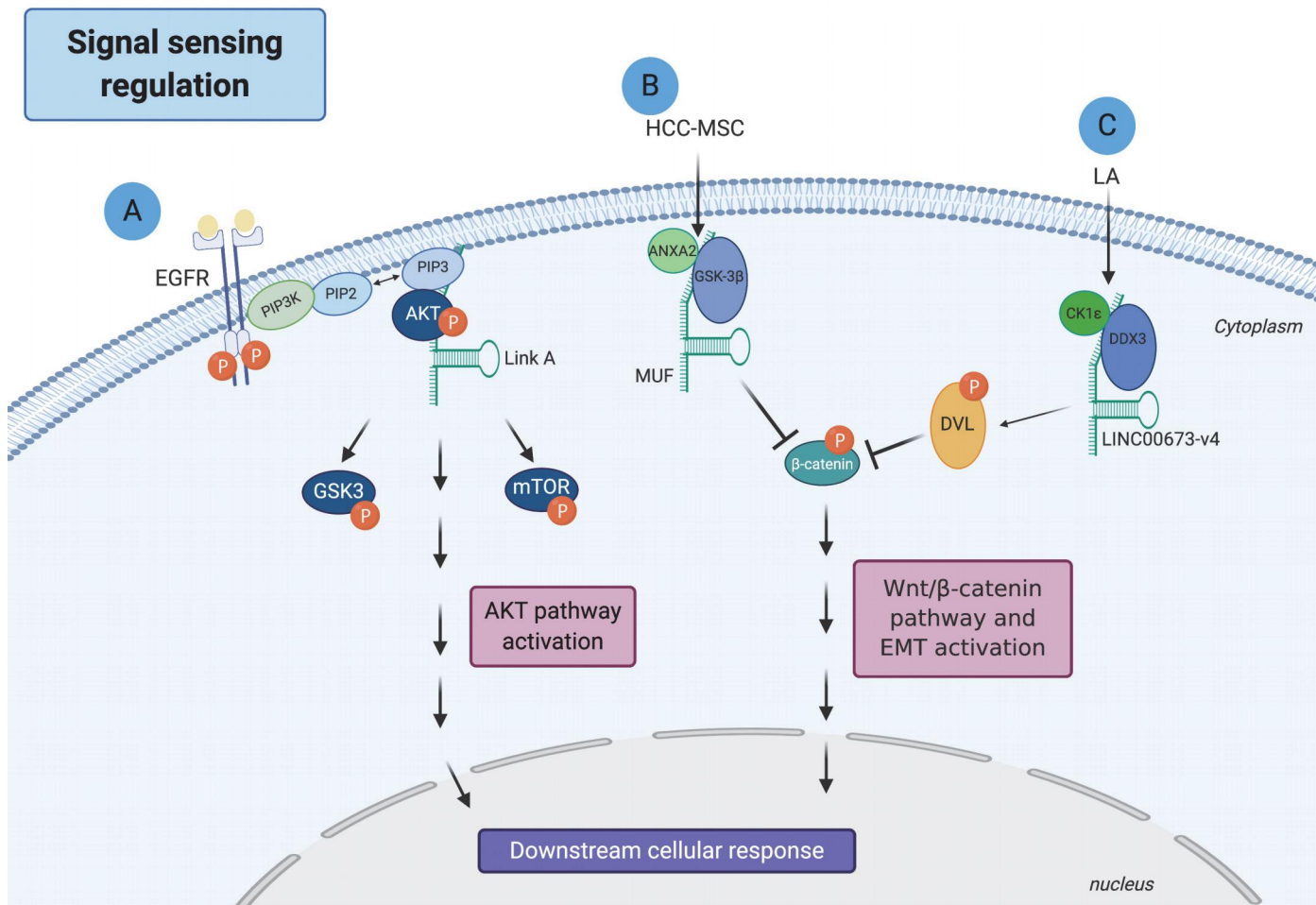


Figure 3.

Signal transduction regulation

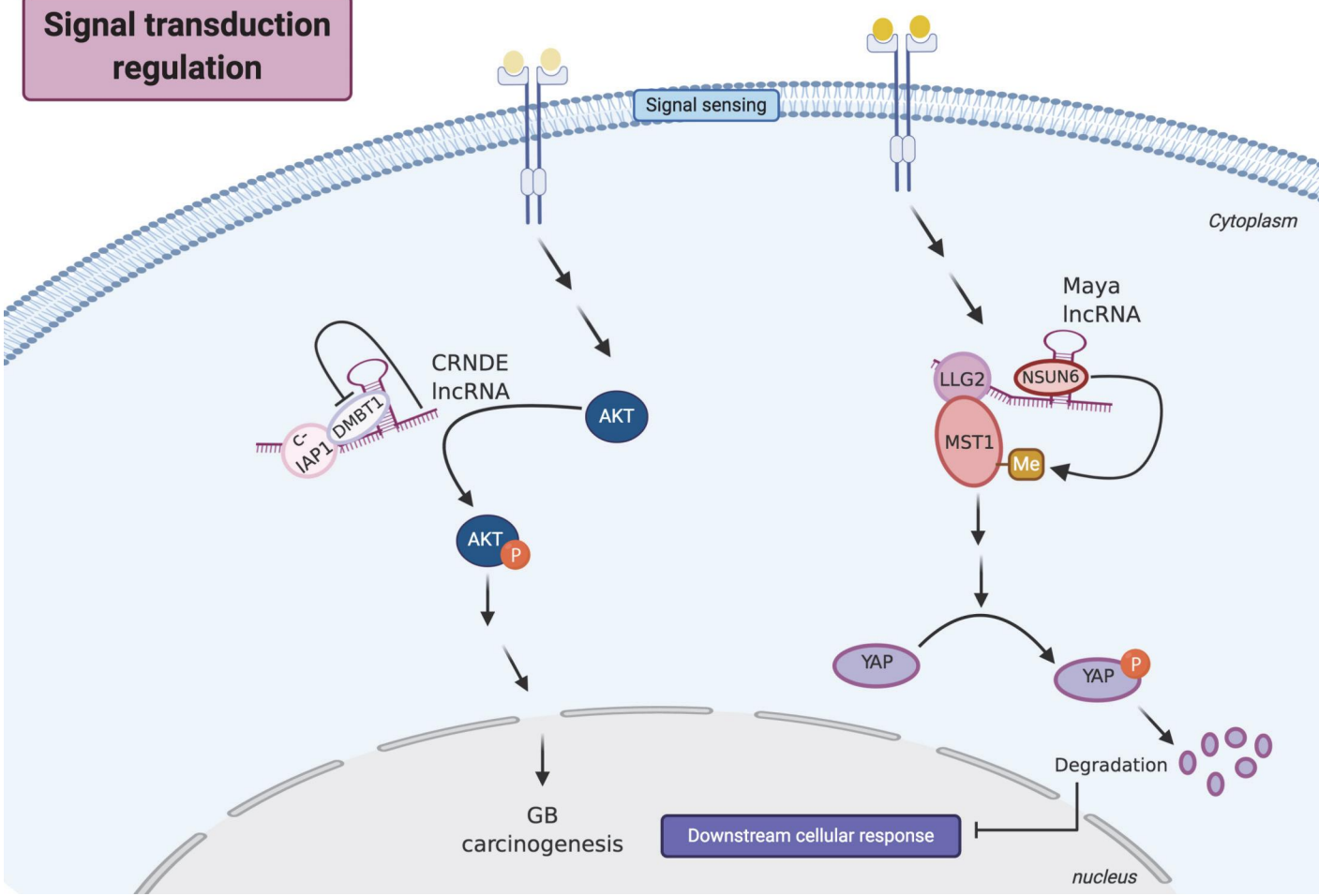


Figure 4.

Downstream cellular response

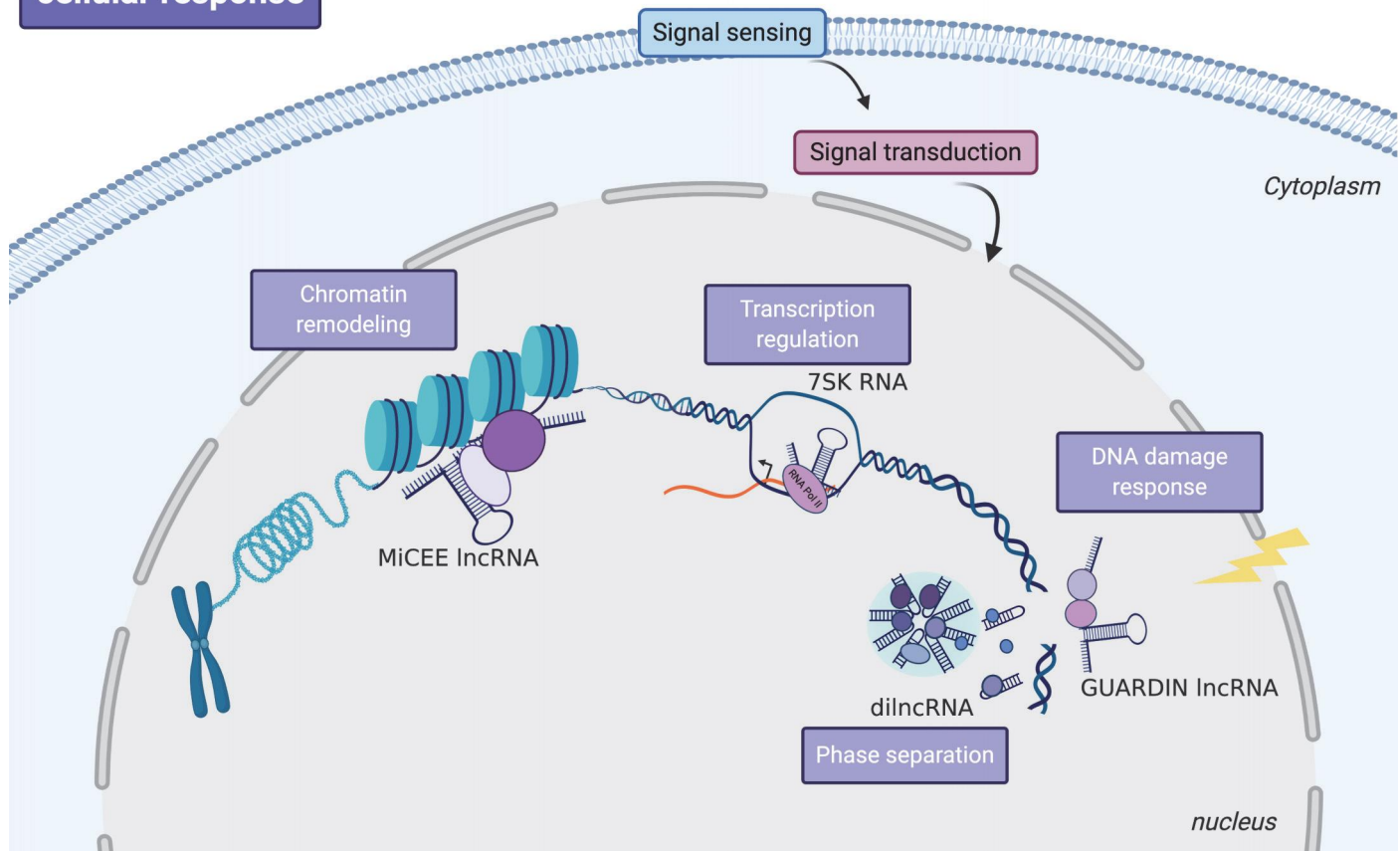
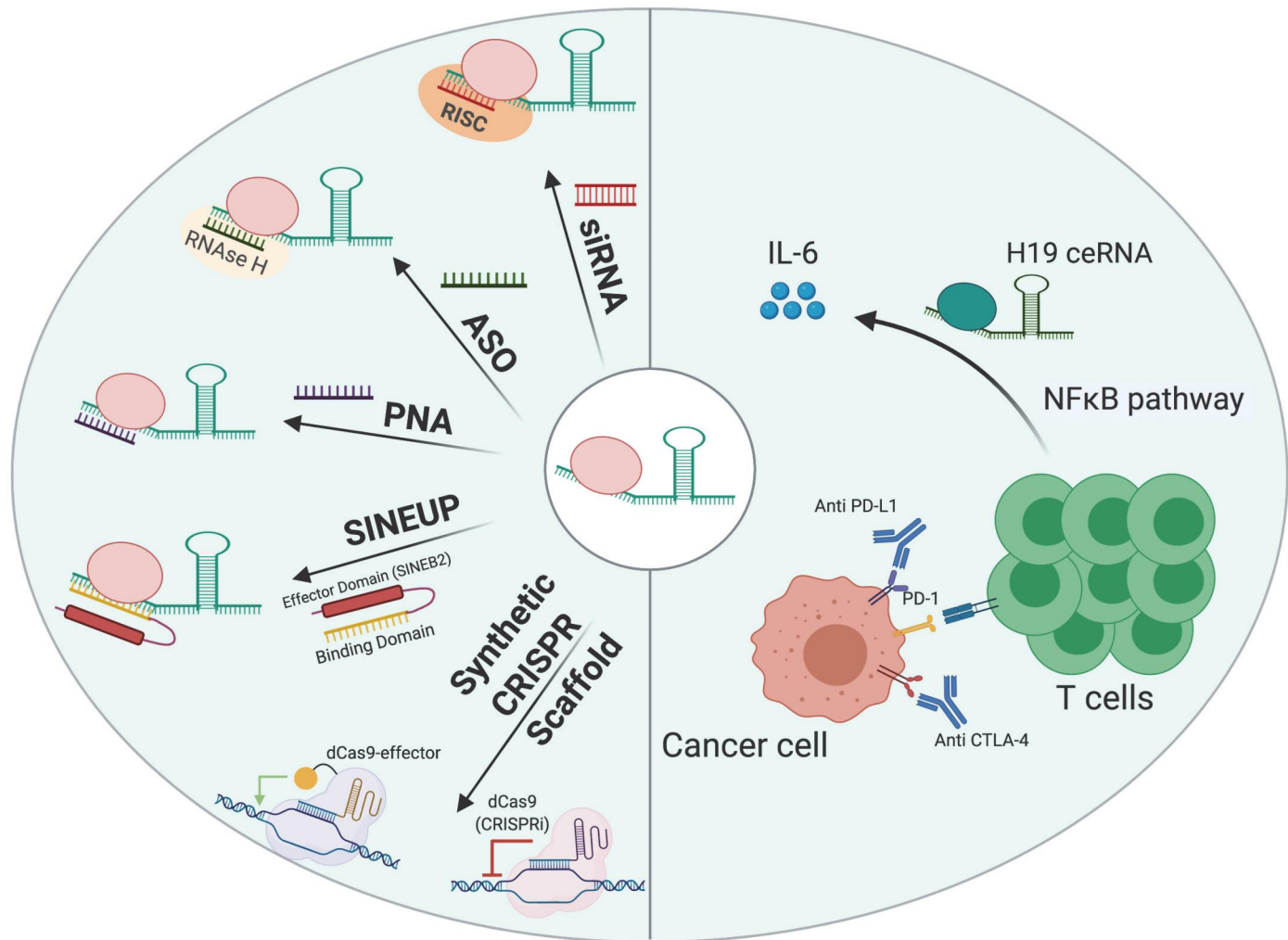


Figure 5.



Titre : Activité de liaison à l'ARN des protéines de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) dans le mélanome

Mots clés : ARN, protéine de liaison à l'ARN, cancer, signalisation, mélanome

Résumé

Des études récentes ont souligné l'importance des ARN dans la régulation des interactions protéine-protéine. En permettant l'assemblage de complexes protéiques nucléaires, les ARN non codants agissent comme des échafaudages et favorisent ainsi les interactions protéine-protéine afin de réguler l'état de la chromatine. Les ARN sont également capables d'interagir avec des protéines pour en moduler leurs activités, leurs interactions ou encore leurs localisations. Cependant, le rôle potentiel des ARN dans la régulation des interactions protéine-protéine dans les principales voies de transduction du signal cytoplasmique reste largement inconnu.

L'objectif de la thèse a consisté à rechercher et à mettre en évidence une activité de liaison directe à l'ARN de protéines impliquées dans les voies de transduction du signal cytoplasmique et d'évaluer le rôle des interactions ARN-protéines de transduction sur la signalisation intra-cellulaire.

En utilisant des approches de CLIP (CrossLink et ImmunoPrécipitation) et de 2C (Complexe Capture : purification d'ARN basée sur leur affinité pour une matrice de silice), qui peuvent mettre en évidence des interactions directes entre les protéines et les ARN *in vivo*, nous avons démontré une interaction directe avec l'ARN de certaines protéines clés de la voie de signalisation MAPK. Des approches de microscopie telles que le PLA (Proximity Ligation Assay) nous ont permis de démontrer une modulation des interactions protéine-protéine dépendant de l'ARN dans la voie MAPK, suggérant qu'une composante ARN est impliquée dans la stabilisation de ces interactions protéine-protéine. Nous avons spécifiquement identifié un mutant de délétion BRAF, une protéine oncogène centrale et une cible thérapeutique dans le mélanome, qui montre une déficience dans son activité de liaison à l'ARN, ainsi qu'une activité de signalisation réduite.

En mettant en évidence l'existence d'une modulation des interactions protéine-protéine médiée par l'ARN, cette étude démontre l'importance sans précédent de l'activité de liaison à l'ARN des principales protéines de transduction du signal qui devrait être prise en compte dans la compréhension et le ciblage des cellules tumorales.

Title : RNA binding activity of signal transduction proteins in melanoma

Keywords : RNA, RNA-binding protein, cancer, signalisation, melanoma

Abstract

Recent studies have underscored the importance of RNAs in the regulation of protein-protein interactions. By allowing the assembly of protein complexes, non-coding RNAs act as scaffolds and thus promote protein-protein interactions in order to regulate the chromatin state. RNAs are also able to interact with proteins in order to modulate their activities, interactions or localisation. In the cytoplasm, highly regulated signalling pathways are regulated through a cascade of protein-protein interactions. In the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signalling pathway, the binding of a ligand to a membrane receptor triggers a cascade of phosphorylation and protein-protein interactions that allow the transduction of the signal. Abnormal activity of this pathway through increased ligand binding or activating mutations lead to cellular dysfunction associated with tumor initiation and progression.

The potential role of RNAs in the direct regulation of protein-protein interactions of key cytoplasmic signal transduction pathways remains largely unknown. The aim of the thesis was to investigate and demonstrate the direct RNA binding activity of proteins involved in the MAPK pathway and to evaluate the role of RNA-protein interactions on intracellular signalling.

Using a combination of CLIP (crosslinking and immunoprecipitation) and silica matrix-based affinity capture (2C complex capture) approaches that can uncover direct interactions between proteins and RNAs *in vivo*, we demonstrated a direct interaction between key MAPK signalling proteins and RNA in melanoma cells. Subsequent microscopy studies using proximity ligation assay (PLA) led us to demonstrate an RNA-dependent modulation of protein-protein interactions in the MAPK pathway, suggesting that an RNA component is involved in the stabilization of these protein-protein interactions. We specifically identified a deletion mutant in BRAF, a central oncogenic protein and therapeutic target in melanoma, that lacks RNA binding activity and harbors decreased signaling activity.

By highlighting the existence of an RNA-mediated modulation of protein-protein interactions, this study shows the unprecedented importance of the RNA binding activity of key signal transduction proteins that should be considered in the understanding and targeting of tumor cells.