



HAL
open science

L'épissage alternatif du facteur de réponse au stress CIRBP renforce la réponse cellulaire à l'infection par la bactérie *Listeria monocytogenes*

Morgane Corre

► **To cite this version:**

Morgane Corre. L'épissage alternatif du facteur de réponse au stress CIRBP renforce la réponse cellulaire à l'infection par la bactérie *Listeria monocytogenes*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris sciences et lettres, 2023. Français. NNT : 2023UPSLE015 . tel-04880440

HAL Id: tel-04880440

<https://theses.hal.science/tel-04880440v1>

Submitted on 10 Jan 2025

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.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut de biologie de l'Ecole Normale Supérieure

**L'épissage alternatif du facteur de réponse au stress
CIRBP renforce la réponse cellulaire à l'infection par la
bactérie *Listeria monocytogenes***

Soutenue par

Morgane CORRE

Le 03 Octobre 2023

Ecole doctorale n° 515

Complexité du vivant

Spécialité

Microbiologie et immunologie

Composition du jury :

Stéphan VAGNER DR, Institut Curie	<i>Président</i>
Sarah GALLOIS-MONTBRUN CR, Institut Cochin	<i>Rapporteuse</i>
Alessandro PAGLIUSO CR, INRAE - Micalis	<i>Rapporteur</i>
Laurence ARBIBE DR, Institut Necker Enfants Malades	<i>Examinatrice</i>
Alice LEBRETON DR, IBENS	<i>Directrice de thèse</i>

1 Remerciements

J'écris ces remerciements en premier avant de rentrer dans une phase d'épuisement mental mais je souhaite rendre justice à la reconnaissance que je porte à toutes les personnes qui m'ont accompagné au cours de cette aventure.

Unpopular opinion : j'ai adoré (presque) chaque seconde de cette thèse (à part quand j'ai renversé mon RIP en chambre froide, il y a des fois où se lever à 5h du matin pour les infections, c'était un peu dur et enfin, je n'ai pas passé des bons moments au microscope). Je resterai bien encore 4 ans mais toutes les bonnes choses ont une fin, sauf la quête de la connaissance scientifique évidemment !

Pour commencer cette longue liste de remerciements (tous mérités), je tiens à chaleureusement remercier les membres de mon jury de thèse, dont Sarah Gallois-Montbrun et Alessandro Pagliuso pour avoir évalué ce manuscrit en tant que rapporteurs; et à Laurence Arbibe et Stéphan Vagner d'avoir accepté d'occuper la place d'examinateurs.

Merci aussi aux membres de mon comité de thèse, Lionel Navarro, Dominique Weil et Laetitia Vincensini, d'avoir suivi ce travail malgré les difficultés à se réunir. Discuter avec vous a beaucoup contribué à faire avancer mes recherches. Laetitia, merci pour ta sympathie, ton enthousiasme pour ce sujet pourtant éloigné du tien et pour tes cellules. J'ai été ravie que l'ED t'ai choisi pour mon comité !

Mon passage à l'IBENS n'a duré que 4 ans mais très rapidement, je m'y suis sentie comme à la maison, alors commence ici la longue liste de mes collègues / amis grâce à qui j'avais beaucoup de plaisir à venir travailler tous les jours !

Pour moi, l'IBENS se distingue par son personnel administratif hors pair: c'était un jeu d'enfant de se retrouver dans ces méandres administratifs grâce à votre professionnalisme. Merci à Béatrice et Virginie d'avoir toujours trouver la solution à mes problèmes, merci à Patricia pour la supervision de toutes mes missions et pour ton travail colossal quant à la gestion de l'institut, merci surtout Abdoul pour ta bonne humeur constante et ta disponibilité ! Merci au service informatique, en particulier Bilel, pour résoudre tous les petits et gros bugs en un temps record !

Ayant fait partie la section 2 « Génomique fonctionnelle », je tiens énormément à remercier Martine dans un premier temps, que ferions-nous sans toi... C'est si reposant de pouvoir se reposer sur ton travail à la limite de la perfection et sur ta présence rassurante ! Tu es vraiment l'âme de cette section.

Merci à mes voisins ADN, la team Hyrien, en particulier Florence. Grâce à ton travail, je n'ai jamais manqué de pipettes, de cônes ou de tubes pendant ces quatre ans, malgré la situation sanitaire ! Merci aussi à Benoît, Laurent, Diletta, Victoria, Jade, Emma et Alan, c'est toujours un plaisir de discuter avec vous.

Concernant nos voisins plus éloignés, merci Véro de venir égayer nos matins maussades avec tes histoires et ta bonne humeur, rien de mieux pour commencer la journée ! Merci aussi à la plateforme génomique : Corinne, Catherine, Medhi, Laurent, Sophie et Ali... pour votre travail et vos conseils ! Merci aussi à mes collègues du 4e, surtout la team Navarro : Odon, Jérôme, Antinéa, Lucas, Gersende et Magali, toujours disponibles pour assurer mes arrières en cas de manips protéines et pour parler GRP7 et infection. Un remerciement particulier à Alex aussi, pour ton aura de bienveillance, ta disponibilité pour discuter de tout, de construction d'arbre d'évolution des protéines ou de quelle machine à coudre est la meilleure.

Merci aussi à mes deux supers ex-compagnons de bureau. Brice, merci pour tes conseils scientifiques, tant sur les manips que sur ma carrière, merci pour tes adresses du Marais, pour les chocolats et les viennoiseries, et pour les thés partagés, ça a refait beaucoup de mes journées !

Juju, merci pour les pauses goûters, les pauses shopping, les discussions western et IP... Tu m'as toujours impressionnée par ta capacité de travail et ton raisonnement scientifique et je suis sûre que toutes les portes s'ouvriront à toi dans ta future carrière.

Je me dois aussi de particulièrement remercier le labo Le Hir, que je considère un peu comme mon 2e labo. Merci Hervé pour ton accueil en toute occasion, OB pour ton savoir, tes conseils, tes questions toujours pertinentes (et pour la jolie bouteille de permanganate de potassium qui trône fièrement sur mon bureau), Cindy et Maéva (team bzh et chat), Tommaso et d'autres que j'ai vu passer plus ponctuellement, Quentin, Oh-Sung... Il n'y a pas un moment où je suis sortie de ce labo sans avoir été enrichie d'au moins d'une interaction sociale de qualité !

Isa, merci d'être bien plus qu'une collègue, merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur, ton énergie, pour toutes tes petites techniques, pour m'avoir entraîné au body tonic avec M. Ricard, pour les échanges de gâteaux, pour les pauses café... C'est un réel plaisir de travailler à tes côtés, tu m'as tant appris.

Tant qu'à faire, autant remercier ici Youssef, meilleur cafetier de Paris et partie intégrante de l'IBENS, pour son accueil à bras ouverts ainsi que Mangala, pour son merveilleux bœuf-curry et tous les autres intervenants du Pub Gay Lussac, sans qui mes vendredi soirs auraient été bien moins joyeux.

Une chose est certaine, c'est que je n'aurais pas fait le quart de la moitié sans l'aide que vous m'avez apportée.

Merci aussi à mes supers stagiaires : Anouk pour ta motivation et ton investissement sans faille dans ce projet compliqué en parallèle de tes cours, je te souhaite le meilleur pour la suite. Ania, it was a pleasure to watch you grow and get better every day. You did an amazing job here, it was an honor having you as an internship student, I am so happy you find your way and wish you all the best for the future! Merci à Morgane et Candice, d'être venues s'intéresser à mon travail le temps d'une semaine et merci à Léa; c'est un plaisir de te voir t'investir dans ce sujet qui me tient tant à cœur. Je n'ai aucun doute que tu vas l'amener dans ta direction et que tu vas faire de grandes choses avec (mais regarde NOD1 quand même au cas où).

Enfin, merci à toutes les autres avec qui j'ai pu interagir à l'IBENS (et ailleurs), José, Mathieu, Astou, Adrien, Pierre, Louna, Valentin... Vous avez participé à faire de ces 4 ans une belle période.

I would also like to thank you Volker, for accepting to collaborate with a newbie you stumbled upon your slack room back then in lockdown. You brought me a lot of valuable knowledges and hope to keep on working with you in the future!

Merci aussi à Clara, de m'avoir permis de me forger un solide caractère et de m'avoir appris à ne pas se laisser faire, peu importe les obstacles et les circonstances.

Je suis arrivée à Paris il y a maintenant 5 ans, et une période particulière a été pour moi un tournant tant scientifique que personnel. Merci à ma team Pasteur de m'avoir fait grandir sur tous les plans, je n'y serais pas arrivée sans votre soutien, votre amitié et vos conseils... Tommy, merci pour ton soutien et ta spontanéité, c'est rafraîchissant ; Vero, t'es une reine ma vie, aux plaisirs de nombreux concerts en ta compagnie ; Khadi, merci pour ton accueil et ta générosité ; Charlie, j'admire ton courage d'avoir tout plaqué pour suivre ton rêve ; Yann, tu ne cesses de m'impressionner par ta créativité ; Inès, tu me manques beaucoup, Paris n'est pas la même sans toi. Et à tous les autres membres de la teaméa, merci aussi pour cet avant-thèse déterminant.

La science c'est trop bien mais voir d'autres choses, c'est important aussi. Alors je tiens à remercier mes copains d'avoir compris pourquoi je me mettais corps et âme dans cette thèse. Merci aux loutres de Paname : Matteo, Juju, Mathilde, Mans, Coki, Marti et Alo de m'avoir sorti de mon cocon pour vivre des chouettes moments aux quatre coins de la France. Merci à Gabs, Nana, Marie et Alexis, d'avoir été à mes côtés depuis le tout début de ma vie en biologie, vous m'avez tant apporté. Merci à Noa, pour ces après shopping, goûters, puzzles, crochet... Merci à merci à Fa et Paula, d'être toujours là quoi qu'il arrive et malgré le temps passé. A mes malouins, qui me voit grandir depuis la seconde : Barg, Nic et Hugo, je vous souhaite encore au moins 12 ans d'amitiés, de route du rhum et pleins d'apéros sur Cézembre, (Et Nic, il nous reste beaucoup de restos à tester sur Paris hein).

Merci au Mamar training crew et plus particulièrement merci Mamar, pour ces entraînements sportifs de qualité par tous temps en toutes circonstances, pour nous tenir en forme et entraîner notre palais à reconnaître les futures meilleures pâtisseries de Paris. Quelle chance on a.

Bien évidemment merci à ma famille pour leur soutien sans faille dans ces longues études. Papa, merci pour les voyages, les trains, les repas du dimanche et plus encore. Mama, danke fürs Willkommen, für den Spaziergänge mit dir, für den Lockdown, ich bin froh, dass wir damals zusammen waren. Tifenn et Anaëlle, mes sœurs, je suis fière de vous. Merci aussi à vous Grand-Pa et Grand-Ma pour toutes ces années. Merci à la famille Privat, plus particulièrement Viannette et Daniel, de m'avoir toujours considérée comme étant des vôtres, ça a beaucoup compté pour moi. Merci aussi à Amos, d'être le meilleur chat du monde.

Entrons à présent dans l'émotionnel, avec ces gens qui ont été des véritables piliers pendant ma thèse.

Caroline, en quelques instants, tu m'as redonné confiance en moi, au moment où j'en avais le plus besoin, avec ta gentillesse, ta douceur... Tu as investi tellement de temps à m'aider à avoir ce concours alors que toi-même tu

rédigais ta thèse à ce moment, ça m'a remotivé à avoir cette bourse et j'en t'en suis tellement reconnaissante. Merci de m'avoir tant appris, tant en termes scientifiques que personnels... Tu m'as énormément inspirée et je te souhaite de tout cœur de trouver ton chemin, car toi particulièrement tu le mérites.

Vinko, I know you might think it's exaggerated to place you in this part, but thank you for teaching me everything you knew about this lab, for showing me how to RNA, for being infinitely patient when I was failing at qPCR. This project, that I'm so passionate about would never ever have been feasible without the tremendous work you put into it prior to my arrival. I feel like everything was easy thanks to you. I wish you the best overseas and hope we'll be able to keep interacting in the future.

Morgane, tu as été comme une super grande sœur, le genre qui a toujours ce que tu cherches. C'était un plaisir d'être ta coloc de bureau, de parler de tout, de ta vision de la science, de profiter de ton savoir, de tes astuces, de tes goodies, de tes aventures... C'est un vrai honneur d'être ta collègue et de pouvoir compter sur toi pour m'apprendre à utiliser un cluster comme à faire fleurir une orchidée.

Simon et Thomas... Merci de ponctuer mes journées de rires, de blagues, de gâteaux, de conversations autour d'un thé à 7h du matin, de conseils sur comment réussir un super fractionnement, de m'écouter râler sans cesse sur les mêmes choses en boucle, de venir me libérer du labo un dimanche alors que je me suis enfermée, de partager ma passion pour un labo propre et surtout d'être des personnes sur qui je peux compter à 100% en toutes circonstances. Vous êtes incroyables et si j'ouvre un labo un jour, je vous recrute direct.

To my top 4, Bertrand, Nadia and Lucia.

Guys, I don't even know how to start to tell you my admiration and how much you mean to me. You are the most amazing people and I'm so grateful for everything we shared together. I think that what I always appreciate the most is how you always embraced each other's uniqueness and personality, without any judgement or biases. Thank you for making me laugh every day with your insta memes and gossip, for always helping me out when I needed (especially when it meant waiting for hours at the ER because I hurt my hand (twice)), for making me a more social being... I really feel blessed being your friend. Bertran, you amaze me with your ability to achieve literally anything you want, whether it's repairing a centrifuge or running a brand-new sequencing device like a pro and with your story telling skills. Nad, I'm always baffled by the relevancy of your scientific reasoning and by keeping so much plants (that are not cactuses) alive at the same time. It seems you're 100% the master of your own life and that's very inspiring. Lucha, how come you've achieved to be the best social butterfly, skilled diver/climber and talented programmer that you are in like just 4 years? Thanks for always being whatsapp available for every little issue I had (scientific or not), it meant a lot. All in all, you guys deserve the world and I'm so proud of what we achieved together during these four years.

Douds, merci d'être là depuis 7 ans maintenant, de faire vivre les plus belles aventures, de me faire découvrir ton monde, de me comprendre et de me compléter en tant que partenaire de vie. J'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve (oui, j'ai écrit ceci avant nos fiançailles).

Alice,

Merci m'avoir laissé une chance en ne jetant pas mon premier mail. Merci de m'avoir fait complètement confiance sur ce projet qui me tient tant à cœur depuis le début, de m'avoir permis de faire des erreurs, de m'avoir laissé mener ma thèse comme je le souhaitais tout en m'accompagnant sur le cheminement scientifique, d'avoir été toujours juste, disponible, accessible, généreuse... Je ne sais pas si tu rends compte à quel point ça été important pour mon épanouissement en tant que personne et scientifique. Tu m'as toujours poussé à aller plus loin sans contrainte, tu m'as fait confiance pour représenter ton labo en congrès, pour prendre des responsabilités, écrire des papiers... J'ai énormément grandi dans le BIRD lab et grâce à toi, je suis prête aujourd'hui à aller plus loin dans ma carrière de scientifique.

Tu mérites toutes l'attractivité que génère aujourd'hui ton équipe et bien plus encore. Merci.

It's a new dawn, it's a new day, it's a new life for CIRBP.

2 Liste des abréviations

(e)SLAP	(epithelial) Spacious Listeria-containing phagosome
53BP1	p53-binding protein 1
A600 nm/mL	Absorbance à 600nm/mL
ActA	Actin assembly-inducing protein A
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase 10
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP-ribosylation	Adenosine diphosphate-ribosylation
AIM2	Absent in melanoma 2
AKT	Protein kinase B (PKB)
ALR	AIM2-like receptors
ALY	Aérolysine
ANOVA	Analysis of variance
Ap 100	Ampicilline 100 µm/mL
AP-1	Activator Protein 1
ARN	Acide ribonucléique
ARN Inc	ARN long non codant
ARN Pol II / Pol II	ARN polymérase II
ARNInc	ARN long non-codant
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
AS	Alternative splicing
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATF3/4	Activating transcription factor 3/4/6
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
BAG-1	Bcl-2-associated athanogene 1
BAHD1	Bromo adjacent homology domain-containing protein 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BHI	Brain heart infusion
BMI1	B-lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
bp	Base pair
BRD2	Bromodomain-containing protein 2
cAMP	cyclic Adenosine monophosphate
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBP	Cap binding protein
CCR4-NOT	Carbon catabolite repressor 4-negative on TATA-less
CD112	Cluster of differentiation 112
CD59	Cluster differentiation 59
CDC	Cytolysine dépendante du cholestérol
c-di-AMP	Cyclic diadenosine monophosphate
c-di-GMP	Cyclic diguanylate monophosphate
CDK	Cyclin dependent kinase
cGAMP	Cyclic GMP-AMP
cGas	Cyclic GMP-AMP synthase
CHOP	C/EBP homologous protein
CIRBP	Cold inducible RNA-binding protein

CLK1	Cdc2-like kinase 1
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
ClyA	Cytolysine A
Cm	Chloramphénicol
c-Met	Hepatocyte growth factor receptor
CMG2	Capillary Morphogenesis Gene 2
CMV	Cytomegalo virus
c-myc	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CoQ10	Ubiquinone-10 or Coenzyme Q10
cPCR	Colony PCR
CRISPR-Cas9	Clustered-regularly-interspaced palindromic repeats - Cas9
CTD	Carboxy-terminal domain
CTNNB1	Catenin beta-1
Ctrl	Contrôle
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CYFIP1	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6'-diamino-2-phénylindole
DCP1a/2	Decapping enzyme 1A/2
DDX14/20	DEAD-box helicase 14/20
DECID	Death Effector Domain-containing protein with a Caspase Recruitment Domain (CARD)-Interacting Do
DHCA	Dihydrocaffeic acid
DHX9	DEAH-box helicase 9
DHZ	Dihydrozeatin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthylesulfoxyde
dNTP	Déoxy-nucléotide tri-phosphate
DTT	Dithiothréitol
DYRK1B	Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B
eCIRBP	Extracellular CIRBP
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP	Enhanced GFP
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacétique acide
eIF2α	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha
eIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4 G/A3
EJC	Exon junction complex
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ER stress	Stress du reticulum endoplasmique
eRF3 1	Eukaryotic release factor 3
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
Erm	Erythromycine
ESE	Exon splicing enhancer
ESS	Exon splicing silencer
FBS	Fetal bovine serum
FEA	Focal adhesion kinase enhancer alpha
FL	Full length
FPE	Flavoprotein monooxygenase
FRM1	FMR1 homolog, fragile X mental retardation 1
FRMP	FMRP-interacting protein
FUS	Fused in sarcoma
G1	Gap 1 phase of the cell cycle
G3BP1	Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1

GAPDH	Glyceraldéhyde déshydrogénase
GBP	Guanylate-binding proteins
GBP5	Guanylate-binding protein 5
GCN2	General control nonderepressible 2
GFP	Green fluorescent protein
GILT	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX4	Glutathione peroxidase 4
GSK3-β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heure
H2A	Histone H2A
H2B	Histone H2B
H3	Histone H3
H3K14-ac	Histone H3 lysine 14 acetylation
H3K-deAc	Histone H3 lysine deacetylation
H3S10-deph	Histone H3 serine 10 dephosphorylation
H3S10-ph	Histone H3 serine 10 phosphorylation
H4	Histone H4
H4K8-ac	Histone H4 lysine 8 acetylation
HAVCR1	Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1
HCC	Hepatocellular carcinoma
HDAC	Histone deacetylase
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
hlyA	Hemolysin A
HMD	Replication-dependent histone mRNA decay
hnRNP	Human ribonucleoparticle
hnRNP UL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein UL1
HRI	Heme-regulated inhibitor
HSAT III	Human satellite III
HT	Hypothermie thérapeutique
IκB	Inhibitor of kappa B
I/R	Ischemia/reperfusion
I2^{PP2A}	inhibitor-2 of protein phosphatase 2A
IFN	Interferon
IKK	I kappa B kinase
IL23	Interleukin 23
lnA/B/C/P	Internalines A/B/C/P
Int	Intron
Inv	Invasine
IP	Immunoprécipitation
IP	Immunoprécipitation
IpaB/C	Invasion plasmid antigen B/C
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRE1α	Inositol-requiring enzyme 1 alpha
IRES	Internal ribosome entry site
IRF3/7	Interferon regulatory factor 3/7
ISAR	IsoformSwitchAnalyzeR
ISE	Intron splicing enhancer
ISG	Interferon-stimulated gene
ISR	Integrated stress response
ISRIB	Integrated stress response inhibitor
ISS	Intron splicing silencer

JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kbp	kilobase paire
KCDN	Kinetocho-re-associated protein CENP-E docking motif N-terminal
KCl	Chlorure de potassium
kDa	Kilodalton
KDM6B	Lysine-specific demethylase 6B
Ki-67	Marker of proliferation Ki-67
LAP	*Listeria* adhesion protein
LB	Luria Bertani / Lysogenic broth
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
LIPI-1	Lipid A disaccharide synthase
LLO	Listériolysine O
Lm	Listeria monocytogenes
LntA	Listeriolysin O transporter A
LPS	Lipopolysaccharide
M	mol/litre
MACPF	Membrane Attack Complex/Perforin
MAGOH	Mago Homolog, Exon Junction Complex Core Component
MAJIQ	Model-based Analysis of RNA-Seq Junctions Quantification
MAL	Myelin and lymphocyte
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
METTL4	Methyltransferase-like protein 4
min	minute
mL	millitre
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
MLN51	Myeloid leukemia factor 1-interacting protein
MLO	Membraneless organelle
MMP8	Matrix Metalloproteinase 8
MOI	Multiplicity of infection
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 complex
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MVB12b	Multivesicular body subunit 12b
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl	Chlorure de sodium
NEAT1	Nuclear-enriched abundant transcript 1
Nemo	NF-kappa-B essential modulator
NES	Nuclear export signal
NET	Neutrophil-associated trap
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NGS	Next-generation sequencing
NI	Non-infecté
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptor
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4
NLRP3/6	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3/6
NLS	Nuclear localization signal
NMD	Nonsense-mediated decay
NMD	Nonsense-mediated decay
NO	Nitric oxide
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain

NSCLC	Non-small cell lung cancer
NPC	Nuclear pore complex
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
nSB	nuclear stress bodies
NSD	Nonstop decay
ONT	Oxford Nanopore technology
ORF	Open reading frame
OrfX	Open reading frame X
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p27 KIP1	Kinase interacting protein 1
p38	p38 mitogen-activated protein kinase
p53	Tumor protein p53
p65	Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit
PABP(C1)	PolyA binding protein (C1)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
p-bodies	Processing bodies
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	PBS-Tween20®
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	Protein kinase R-like endoplasmic reticulum
PFA	Para-formaldéhyde
PFO	Perfringolysine O
PI(3)K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKM	Pyruvate kinase M
PKR	Protein kinase R
Plc	Phospholipase
PLY	Pneumolysin
PMA	Phorbol myristate acetate
PML	Promyelocytic leukemia protein
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PP2A	Protein phosphatase 2A
PrfA	Positive regulatory factor A
PRMT1	Protein arginine methyltransferase 1
Protéine RGG	Protéine riche en arginine et glycine
Protéine SR	Protéine riche en sérine et arginine
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
PTC	Premature terminaison codon
queue poly(A)	queue polyadénylation
RAP55	RNA-binding protein 55
RBM5	RNA-binding motif protein 5
RBMX,	RNA-binding motif protein, X-linked
RBP	RNA-binding protein
RE	Response element
RI	Rétention d'intron
ribo-Seq	Ribosome profiling sequencing
RIGI	Retinoic acid-inducible gene I
RIPK1	Receptor-interacting protein kinase 1/3
RIP-Seq	RNA immunoprecipitation followed by sequencing
RNA-Seq	RNA sequencing
RNP	Ribonucleoparticle

ROS	Reactive oxygene species
RPA	Replication protein A
rpm	Rotations par minute
RPMI	Roswell Park memorial institute medium
RT-qPCR	Retro transcription quantitative PCR
RTX	Repeat in ToXin
RYBP	Ring1 and YY1-binding protein
s	Seconde
SB	Sample Buffer
SC35	Serine/arginine-rich splicing factor 2
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polycrylamide gel lectrophoresis
Sec	Sélénocystéine
SECIS	Sec-insertion sequence
SF1	Splicing factor 1
SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1
SG	Stress granules
siARN	petit ARN interférence
SIRT2	Sirtuin 2
SLO	Streptolysine O
SMD	(STAU)-mediated mRNA decay
sm-FISH	single molecule Fluorescent *in situ* hybridization
SMG5/6/7	Suppressor with morphological effect on genitalia
SMN	Survival motor neuron
SNAIL	Snail family transcriptional repressor 1
SNC	Système nerveux central
SNP	Single nucleotide polymorphism
SnRNP	Small nuclear ribonucleoprotein
SOX	SRY-box transcription factor
SPF30	Splicing factor 30
SR-domain	Serine-arginine-rich domain
SRE	Splicing regulatory element
SRPK1	Serine Arginine protein kinase 1
SRSF	Serine/Arginine splicing factor
STAT1/3	Signal transducer and activator of transcription 1/3
STEMI	ST Segment Elevation Myocardial Infarctio
STING	Stimulator of interferon genes
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
SURF	SMG1-UPF1-eRF1-eRF3
SY-rich domain	Serine-Tyrosine rich domain
T3SS	Type 3 secretion system
TAE	Tris-acetate-edta
TAK1	Transforming growth factor-beta-activated kinase 1
Tat	Trans-activator of transcription
TAU	Tubulin associated unit
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCS	Tryptic Soy Broth
TEC	To be experimentally confirmed
TEM8	Tumor endothelial marker 8
TET	Ten-eleven translocation
TGF-β	Transforming growth factor beta
Thr169	Thréonine 169
TIGER	TIS granule-ER

TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TNPO1	Transportin 1
TSD	Temperature-dependent sex determination
U	Unité
U2AF1/2	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1/2
UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like
uORF	Upstream open reading frame
UPF1/2/3	Up-frameshift suppressor 1/2/3
UPR	Unfolded protein response
UTR	Untranslated region
UV	Ultra-violet
VEGF (A)	Vascular endothelial growth factor (A)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Wss	WXG100 protein secretion system
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1
XTcf-3	Xenopus T-cell factor 3
Y14	MAGOH-associated protein Y14
YTHDC1	YTH domain-containing protein 1

Contenu du manuscrit

Introduction	15
Résultats	91
Discussion	151
Conclusion générale	163
Matériels et méthodes	165
Annexes	181
Références bibliographiques	205
Liste des URL	243
Tables des matières, des figures et des tableaux	245

3 Introduction

Table des matières

3.1	Interactions hôte-pathogène	16
3.1.1	Bactéries et maladies infectieuses	16
3.1.2	Réponses des cellules hôtes aux infections bactériennes	25
3.1.3	Réorganisation de l'expression des gènes hôtes et conséquences fonctionnelles	33
3.2	Maturation des ARN messagers	38
3.2.1	Cycle de vie d'un ARNm	38
3.2.2	Surveillance de l'intégrité des ARN	41
3.2.3	Régulation de l'expression des gènes par épissage alternatif	46
3.2.4	Optimisation de la détection de modification de l'épissage avec les technologies de séquençages	53
3.3	CIRBP, un acteur essentiel de la coordination de la réponse au stress	59
3.3.1	La famille des protéines RGG	59
3.3.2	Régulation de CIRBP dans les contextes de stress biotiques et abiotiques	62
3.3.3	Fonctions de CIRBP	71
3.3.4	CIRBP comme cible thérapeutique	85

Dans ce chapitre, je présente l'état de l'art des problématiques biologiques autour desquelles s'est articulé mon travail de thèse. Dans un premier temps, je brosse un tableau général des stratégies d'infection des bactéries pathogènes et les défenses mises en place par l'hôte pour y répondre. Je me concentre particulièrement sur l'exemple de l'infection par la bactérie *Listeria monocytogenes*, qui est le modèle utilisé dans ce travail. Ensuite seront présentés les mécanismes de régulation de l'ARNm dans des cellules eucaryotes, notamment concernant leur épissage et leur surveillance par des systèmes de contrôle-qualité de l'ARN. Dans cette sous-partie, j'introduis aussi les stratégies actuelles de détection et de quantification des événements d'épissage alternatifs. Enfin, je finis par décrire en détail ce qui est connu sur le rôle et la régulation du gène CIRBP (Cold Inducible RNA-Binding Protein), un facteur de réponse au stress, impliqué dans la régulation de voies centrales de signalisation et dans la pathogenèse de nombreuses conditions.

3.1 Interactions hôte-pathogène

3.1.1 Bactéries et maladies infectieuses

Les interactions entre hôte et bactéries sont aujourd'hui particulièrement bien décrites et reposent sur un subtil équilibre entre cohabitation, diversité et colonisation. Effectivement, la grande majorité des bactéries que nous rencontrons ne sont pas dangereuses et certaines interactions avec elles nous sont même vitales. Pourtant il émerge aujourd'hui de plus en plus de bactéries résistantes aux antibiotiques, qui menacent notre santé et contre lesquels trop peu de traitements ont été développés. En effet, la mortalité associée à la multi-résistance aux antibiotiques [1], comme en 2019 où près de 5 millions de morts ont été attribuées à des infections par des bactéries multi-résistantes. Une estimation réalisée en 2016 prédit quant à elle jusqu'à 10 millions de décès liés aux bactéries multi-résistantes par an en 2050 [2]. Ainsi, pour répondre au mieux à cette situation, il est essentiel de mieux comprendre quels sont les mécanismes qui régissent nos interactions avec les bactéries. Pour commencer, revenons sur la notion pathogène :

Un pathogène est un microorganisme qui cause ou peut causer une maladie.

Nous vivons en synergie avec de nombreuses espèces bactériennes, dites commensales, qui colonisent les surfaces de l'organisme, ce qui forme le microbiote, différent en fonction des surfaces. En effet, la composition du microbiote cutané sera différente de celle du microbiote intestinal ou vaginal [3]. Ces bactéries recouvrent donc notre peau et nos muqueuses, qui agissent comme une barrière empêchant l'accès au microbiote à l'intérieur de notre organisme et c'est donc ici qu'intervient la notion de compartimentalisation. Les bactéries du microbiote ne posent pas de problème tant qu'elles sont contenues par des barrières physiques (peau et muqueuses) et une surveillance immunitaire [4]. (figure 3.1). Une rupture de ces barrières pourrait alors entraîner un épanchement des bactéries vers d'autres niches, où elles deviendraient alors pathogènes. Le microbiote, quant à lui, instaure une seconde barrière, par sa diversité et le maintien de l'équilibre entre espèce. En cas de dysbiose, c'est-à-dire réorganisation des proportions des bactéries suite à la prise antibiotiques par exemple, l'équilibre est alors rompu et les bactéries restantes peuvent coloniser la niche et devenir pathogènes [5].

Ces bactéries commensales qui deviennent pathogènes en cas de perturbation de leur environnement sont dites "pathogènes opportunistes". Il existe aussi des bactéries non-commensales qui peuvent être pathogènes si elles arrivent à entrer dans l'hôte et coloniser leur niche de prédilection. Dans ce cas, la capacité de la bactérie à coloniser l'hôte peut dépendre de la voie d'entrée de cette dernière (figure 3.1). Par exemple, si une bactérie qui colonise l'intestin entre par les voies aériennes, alors elle ne pourra pas forcément rejoindre sa niche et induire une infection. Toutefois, certaines bactéries ont développé la capacité de traverser activement les barrières de l'hôte et donc de (i) rejoindre leur niche de colonisation primaire à partir de plusieurs voies d'entrée et (ii) coloniser plusieurs niches, notamment en utilisant les systèmes de circulation sanguines ou lymphatiques. Par exemple, le pathogène de la peste noire *Yersinia pestis* utilise à la fois [6] les voies aériennes et les plaies cutanées comme voie d'entrée et infecte préférentiellement les ganglions lymphatiques. La bactérie pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes* va quant à elle pouvoir traverser la barrière intestinale pour rejoindre la circulation lymphatique ou sanguine et aller coloniser le foie et la rate [7]. En résumé, au cours de l'évolution, différents mécanismes d'adaptation ont été sélectionnés pour que les bactéries colonisent au mieux leur hôte et échappent à ses défenses, mais l'infection bactérienne ne reste possible que dans un contexte permissif, où l'hôte n'a pas ou n'a plus les moyens d'empêcher la colonisation de la niche (mais n'exclut pas la mise en place de réponses antibactérienne en aval).

Le premier obstacle à franchir par les bactéries pathogènes est une compétition spatiale et trophique avec les bactéries commensales qui ont déjà établi résidence et qui mettent en place un état de résistance à la colonisation [8]; un ensemble de stratégies de compétition nutritionnelle, de sécrétion de peptides antimicrobiens, d'agonistes du système immunitaire, etc [9]. Ce mécanisme a pour but d'empêcher l'établissement de bactéries non-commensales ou éviter qu'une espèce commensales ne prenne le dessus sur les autres. Dans la mesure où c'est bien la rupture des barrières, notamment celle que compose le microbiote, qui rend l'hôte permissif aux infections, il est fréquent que ces dernières occurrent dans des contextes où la résistance est affaiblie. De plus en plus, c'est à la suite d'un traitement antibiotique dont le spectre d'action a eu des impacts sur la composition du microbiote [10] qu'émergent des infections par des bactéries pathogènes qui ont développé une résistance à cet antibiotique et sont donc avantagées dans un contexte de dysbiose [8,11].

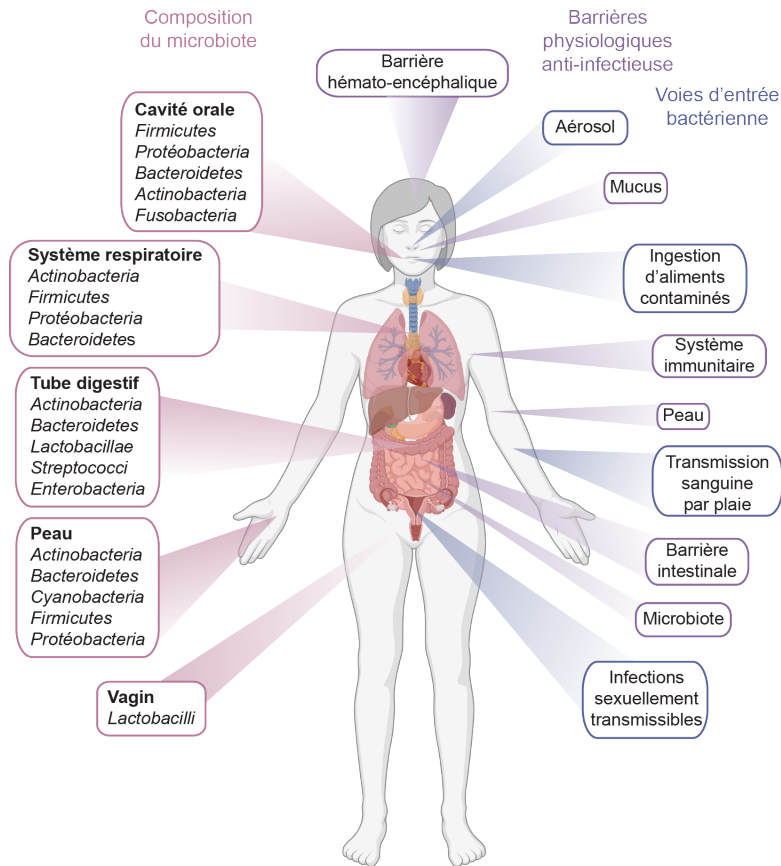


Figure 3.1: Le microbiote et les barrières physiologiques anti-infectieuses. Figure inspirée de Belizário et Napolitano [3]. A gauche encadrés en rose, la diversité de composition du microbiote humaine en fonction des zones du corps. A droite encadrés en violet, les autres barrières physiologiques de prévention des infections. Encadrés en bleu, les voies d'entrée pour les infections bactériennes.

Une fois au contact des épithéliums, quelles sont les stratégies de colonisation des niches hôtes ? L'un des mécanismes essentiels est l'adhésion aux surfaces à coloniser, pour échapper au stress mécanique environnant (comme les flux de mucus par exemple), comme revu dans Stones *et al.*, [12]. Pour cela, les bactéries peuvent exprimer de nombreux types de structures comme les adhésines, les pili, la formations de piédestals, les protéines de liaison à la fibronectine ou au collagène [13]. L'adhésion peut être vue comme une étape préalable qui sert de plateforme à la mise en place des autres stratégies d'infection, comme la formation de biofilm ou l'internalisation des bactéries dans les cellules. Par exemple dans les intestins, une fois bien ancrées, *Listeria monocytogenes* va s'internaliser dans les cellules pour s'y répliquer et se répandre et *Shigella flexneri*, aussi intracellulaire, va induire un arrêt du cycle cellulaire pour limiter le renouvellement des cellules intestinales et donc mieux établir l'invasion. Parmi les bactéries qui ne vont pas entrer dans les cellules mais rester dans le milieu extracellulaire, *Helicobacter pylori* va retarder l'apoptose pour des raisons similaires et de nombreux autres pathogènes vont aussi perturber les jonctions cellulaires pour accéder à des couches inférieures de l'épithélium [14]. Une autre stratégie consiste à former des biofilms, décrits comme "un groupe à comportement coopératif composé de bactéries imbriquées dans une matrice extracellulaire qu'elles auront produites" [15]. Par exemple, les biofilms formés par *Clostridium difficile* dans le colon prennent une part de plus en plus importante dans le développement de maladies nosocomiales [8], c'est-à-dire une maladie développée dans une unité de santé en raison de déficit dans les procédures d'hygiène.

Un rapport récent (figure 3.2) analysant le poids des infections bactériennes sur la mortalité en 2019 indique que les septicémies et la résistance aux antibiotiques restent aujourd'hui une cause majeure de la mortalité mondiale, avec 5 à 7,7 millions de morts en 2019 et n'impliquant au final que très peu d'espèces bactériennes (33) [1,16]. L'étendue du problème de résistance aux antibiotiques impose une urgence à développer de nouvelles stratégies

pour combattre les infections bactériennes, et pour cela, il est nécessaire d'aller plus loin dans la compréhension du déroulement des infections et d'identifier les facteurs mis en jeu. En particulier, certaines stratégies sont développées pour cibler des mécanismes de l'hôte (favorisant l'infection) plutôt que de la bactéries, ce qui évite d'exercer une pression de sélection sur la bactérie conduisant à un échappement.

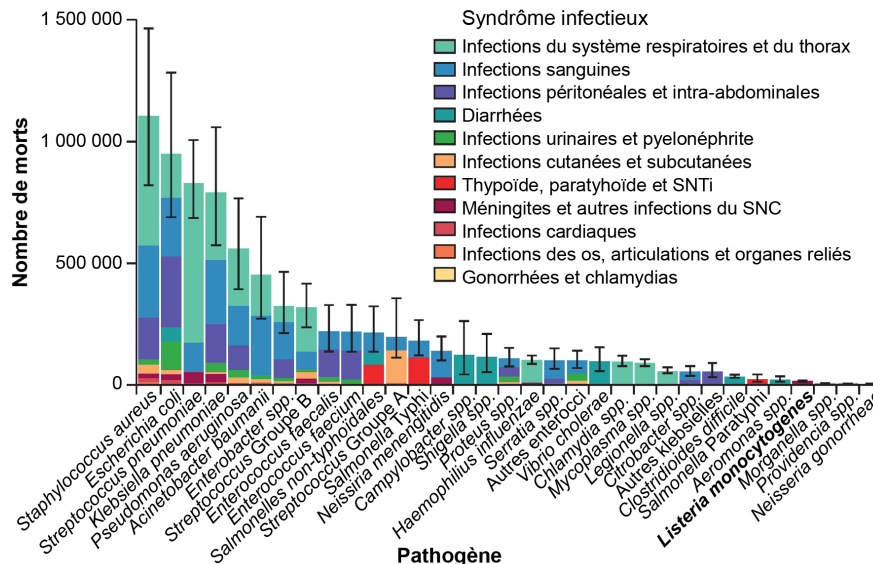


Figure 3.2: Le microbiote et les barrières physiologiques anti-infectieuses. Figure adaptée de Ikuta *et al.* [16]. Mortalité mondiale causée par les infections bactériennes et syndromes infectieux en 2019. En ordonnée est représenté le nombre total de décès par pathogène, avec les barres d'erreur représentant l'intervalle de confiance à 0,95, et chaque colonne est divisée par syndrome infectieux. SNTi = *Salmonella* non-typhoïdique invasive. *Salmonella* Typhi = *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Salmonella* Paratyphi = *Salmonella enterica* serotype Paratyphi. SNC = Système nerveux central.

3.1.1.1 Conceptualisation de la notion de virulence et de pathogénicité

Les notions de virulence et pathogénicité d'un microorganisme sont encore en développement et peuvent avoir des définitions variables en fonction des domaines de recherche (exemple : Biologie de l'évolution contre biologie moléculaire de l'infection) [17]. Dans le cadre de la biologie moléculaire, ces concepts sont synthétisés par Pirofski et Casadeval [18] :

- La pathogénicité d'un organisme est définie comme sa capacité à causer des dommages un hôte non-résistant. La pathogénicité serait une variable discrète : l'organisme est pathogène ou ne l'est pas.
- La virulence est définie comme la capacité relative d'un organisme à causer des dommages à un hôte non-résistant. C'est ici une variable continue qui reflète la quantité de dommages causés et qui se compare aux dommages causés par un autre microorganisme.

3.1.1.1.1 Les facteurs de virulences

Dans le contexte de cette définition de la virulence, les facteurs de virulence sont définis comme des éléments produits par un microorganisme qui permettent la colonisation de l'hôte et la prolifération du microorganisme et peuvent être considérés comme à l'origine des dommages à l'hôte, de manière directe ou indirecte [19]. Initialement, les facteurs de virulence comprenaient seulement des "effecteurs", c'est-à-dire des protéines, enzymes ou molécules de surface, qu'elles soient cytoplasmiques, sécrétées ou membranaires, qui avaient un effet direct sur l'hôte [19]. Aujourd'hui sont aussi inclus des éléments avec un effet indirect mais essentiel à la virulence, comme les régulateurs des facteurs de virulence classiques ou les systèmes de sécrétions par exemple, mais aussi plus récemment les petits ARN [20]. En 2005, l'équipe de Qin Ji s'est d'ailleurs efforcée de créer une base de données récapitulative des

facteurs de virulence des 16 bactéries pathogènes majeures et de les classer par catégories (Tableau 3.1). Cette banque de données pourrait servir, selon les auteurs, à centraliser les travaux réalisés sur les facteurs de virulence, notamment dans une optique de développement de stratégies thérapeutiques alternatives aux antibiotiques. Les facteurs de virulence pourraient en effet servir de cibles à la neutralisation des bactéries multirésistantes.

Catégorie	Description	Exemple
Adhérence	Médiation de l'adhérence de la bactérie à son hôte	Adhérine, pili
Invasion	Facteurs facilitant la colonisation des cellules	Internaline
Système de sécrétion d'effecteurs	Sécrétion de protéines bactériennes	T2SS -> T7SS
Mobilité	Déplacement de la bactérie	Flagelle, ActA
Exotoxine	Toxines sécrétées	cytolysine, phospholipase
Exoenzyme	Enzymes sécrétées	Kinase, Protéase
Modulation immunitaire	Activation d'une réponse immunitaire inflammatoire	LPS
Formation de biofilm	Coordination et communication inter-bactérienne	Quorum sensing
Facteur métabolique	Cooptation de métabolites	Chélateurs de métaux
Survie au stress	Résistance au stress cellulaire	Superoxyde dismutase
Modification post-traductionnelle	Maturation de protéines bactériennes	Glycosylation des VF
Activité antimicrobienne Avantage sélectif	Compétition avec les bactéries commensales	Résistance aux antibiotiques
Régulation	Régulation de l'expression d'autres facteurs de virulence	PrfA

Table 3.1: Tableau inspiré de la base de données VFDB.

Pour efficacement s'établir dans un hôte, c'est un véritable ballet de production des facteurs de virulence qui se met en place, tant pour arriver à la niche primaire d'infection, puis pour répondre aux défenses de l'hôte et enfin pour envahir de plus en plus l'hôte. La production des facteurs de virulence doit donc suivre une stricte dynamique spatio-temporelle pour que la bactérie arrive à ses fins. Pour illustrer l'importance des facteurs de virulence dans l'évolution d'une infection bactérienne, je vais décrire ci-dessous le mécanisme d'infection de la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*, dont l'interaction avec les cellules épithéliales a été le modèle biologique pour mes travaux de doctorat.

3.1.1.1.2 *Listeria monocytogenes* comme modèle d'infection bactérienne intracellulaire.

Identifiée dans les années 80 comme bactérie pathogène alimentaire [21], *Listeria monocytogenes* (*Lm*), dont l'infection peut entraîner le développement de la listériose, reste aujourd'hui encore un problème de santé publique. Bien que la dose infectieuse pathogène soit importante (de l'ordre de 10^9 bactéries) et l'incidence relativement faible (environ 400 cas annuels en France selon l'agence Santé Publique de France), la listériose reste mortelle dans 20 à 30% des cas [22], sans compter les séquelles laissées aux patients survivants. D'un point de vue systémique, revu dans Kammoun *et al.*, [23] une fois ingérée, la bactérie va traverser la barrière intestinale et se transporter en utilisant le système lymphatique vers le foie et la rate (figure 3.3). Chez les populations à risque (personnes immunodéprimées et femmes enceintes), pour lesquelles la dose infectieuse est bien plus basse (10^2 à 10^4) [24,25], *Lm* peut aussi traverser la barrière hémato-encéphalique [26] et la barrière placentaire [27]. En conséquence de ces invasions, une personne atteinte de listériose peut développer des symptômes allant de la simple gastroentérite, à des septicémies, des méningites voire des fausses couches dans le cas des femmes enceintes [28].

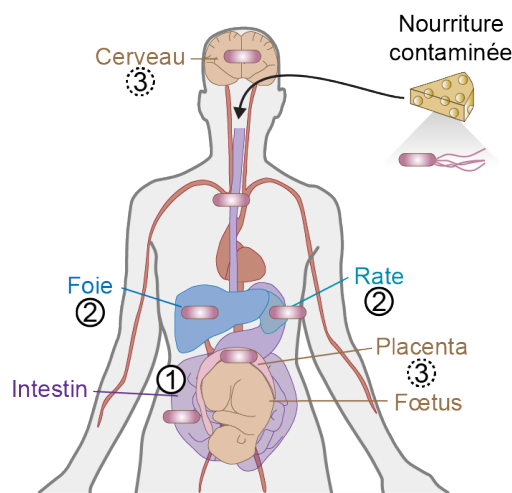


Figure 3.3: Dissémination systémique de *Listeria monocytogenes*. Figure adaptée de Lebreton et Cossart [30]. Niche de colonisation de *L. monocytogenes* au cours de l'infection.

Au-delà de sa capacité à coloniser de multiples organes, c'est pourtant les mécanismes d'invasion cellulaire de *Lm* qui l'ont établie comme pathogène modèle, notamment par son mode de vie intracellulaire et la production de nombreux facteurs de virulence, définis plus en détail par la suite, destinés à pirater certaines fonctions vitales de la cellule. La description du cycle de vie intracellulaire de *Lm* présenté ci-dessous s'inspire de nombreuses revues [7,28–30]. Dans les cellules non-phagocytaires, *Lm* se fait activement internaliser en profitant du système d'endocytose médié par des récepteurs de la cellule (figure 3.4). A sa surface, *Lm* exprime les internalines InIA et InIB qui lient respectivement les récepteurs e-cadhérine et c-met et est internalisée au sein d'une vacuole, à l'aide de la réorganisation du cytosquelette d'actine. Il est intéressant par ailleurs de noter que la liaison de InIB à c-met active différentes voies de signalisation en aval du récepteur, notamment l'activation de PI(3)K [31], impliquée dans la croissance, survie et prolifération cellulaire. Dans les cellules phagocytaires, *Lm* est internalisée par phagocytose. Pour s'échapper de la vacuole, la bactérie sécrète une cytolysine, la LLO et deux phospholipases, PlcA et PlcB, qui induisent la rupture du compartiment et permettent le relâchement de *Lm* dans le cytoplasme, où elle peut se répliquer. Dans certains cas et certains types cellulaires, il a été montré que *Lm* pouvait aussi se répliquer dans les vacuoles. Par exemple, en cas de phagocytose médiée par LC3 dans les macrophages, l'équipe de John H. Brumell a montré que *Lm* pouvait se répliquer lentement dans de grandes vacuoles appelées SLAP (Spacious *Listeria*-containing phagosomes) grâce à une action modérée de la LLO [32], ce qui pourrait avoir un effet sur la persistance de certaines infections. Dans mon laboratoire, un phénomène similaire a été mis à jour dans les cellules épithéliales avec la découverte des eSLAP (epithelial SLAP) par Caroline Peron-Cane [33]. A la différence des SLAP, la croissance de *Lm* dans les eSLAP est rapide, mais aussi dépendante de la présence de LLO.

Une fois dans le cytoplasme, grâce d'une myriade de facteurs de virulence, *Lm* va prendre le contrôle de multiples

fonctions cellulaires et impacter l'intégrité des organites, comme revu dans [34]. Par exemple, une particularité de *Lm* est la prise de contrôle de la machinerie de polymérisation de l'actine grâce au facteur de virulence ActA qui interagit avec le complexe Arp2/3 et propulse la bactérie au travers du cytoplasme, jusqu'à déformer la membrane plasmique, formant ainsi des protrusions. Ces structures pourront alors être internalisées dans la cellule-voisine dans une vacuole secondaire à double-membrane, dont *Lm* pourra s'échapper similairement à la vacuole primaire. En répétant ce mécanisme de passage de cellule à cellule, *Lm* peut alors infecter un tapis cellulaire entier sans ressortir des cellules (figure 3.4).

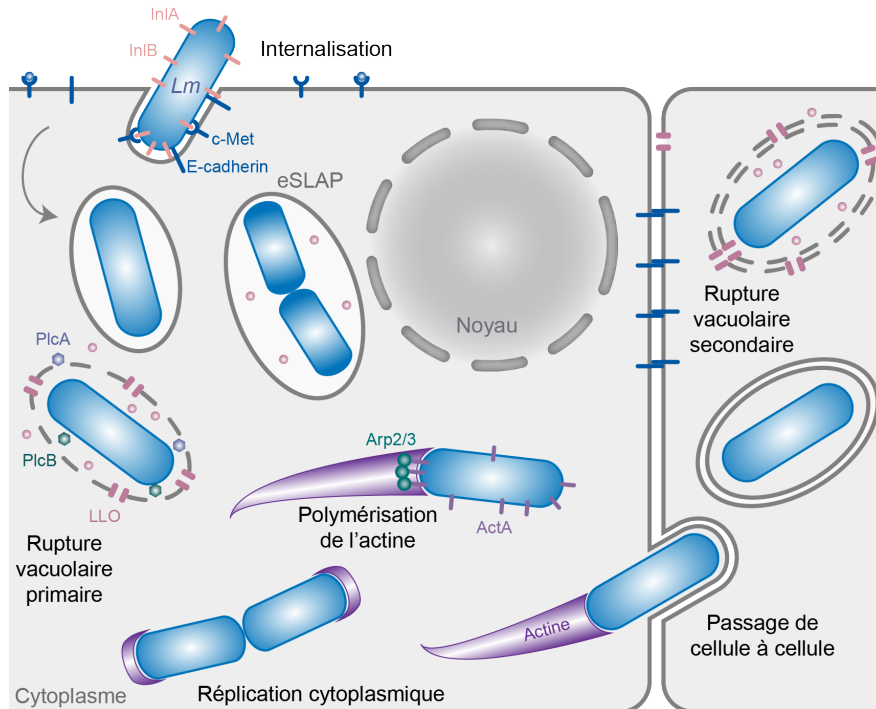


Figure 3.4: Cycle de vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes*. Figure adaptée de Lebreton et Cossart [30]. Evolution intracellulaire de *L. monocytogenes*, de son internalisation à sa réplication et sa dispersion de cellule en cellule.

Ce cycle de vie bien décrit et particulier fait de *Lm* un modèle d'étude des infections bactériennes intracellulaires. Pourtant, la recherche active dans ce domaine permet encore à ce jour d'identifier de nouvelles protéines exprimées et/ou sécrétées par *Lm*, dont les fonctions encore inconnues pourraient participer à l'établissement de la bactérie dans la cellule et donc rejoindre l'arsenal de facteurs de virulence de *Lm*. Ci-dessous, pour illustrer les différentes facettes de l'interaction entre bactéries invasives et cellules hôtes, j'ai sélectionné une série d'exemples, soit pour leur rôle central dans le processus infectieux, soit pour leur pertinence au regard des questions biologiques qui ont guidé mon travail de thèse et, pour cette raison, en privilégiant les connaissances portant sur *Lm* comme modèle.

3.1.1.1.3 Régulation de l'expression des gènes de virulence

L'environnement dans lequel évolue la bactérie est déterminant pour l'expression de ses gènes de virulence. En effet, des conditions comme la température, le pH, la disponibilité en métabolite, l'état immunitaire de la cellule, etc. peuvent conditionner la production des facteurs de virulence. Par exemple, pour un grand nombre de bactéries pathogènes des animaux aussi bien que des plantes, la présence de calcium va favoriser les interactions bactérie-cellule, la sécrétion d'enzymes impliquées dans l'invasion, comme des protéases par *Pseudomonas aeruginosa*, et l'assemblage de systèmes de sécrétions, comme le TSS3 de *Yersinia pestis* [35]. Les gènes codants les facteurs de virulence peuvent être situés sur le/les chromosomes bactériens directement ou sur des structures annexes comme des plasmides ou des phages et souvent, ils sont retrouvés groupés sur de larges régions génétiques appelées îlots de pathogénicité [36].

Par exemple, dans le cas de *Lm*, l'expression de l'îlot de pathogénicité LIPI-1 va conditionner son passage vers la pathogénicité [37] et est contrôlée par un activateur transcriptionnel nommé PrfA (Positive regulatory factor A) (figure 3.5). Le rôle de PrfA est résumé par Lebreton & Cossart [38]. LIPI-1 comporte plusieurs gènes de virulence dont *prfA* lui-même, *hlyA* (qui code la LLO), *mpl* (une métalloprotéase), *actA* et *plcB*. PrfA peut aussi activer l'expression d'autres gènes de virulence comme *inlA* et *inlB* exprimés en tandem à un locus distinct, et *inlC*, en se liant à une séquence appelée boîte *prfA* dans le promoteur des loci cibles [39].

L'expression du facteur de transcription peut être impactée par des conditions environnementales telles que les ROS (+), le pH (acide +) ou la disponibilité en sucre (-) [40], et surtout par la température. En effet, à 30°C, une structure secondaire en tige-boucle dans la région 5' traduite (5'-UTR) de PrfA va masquer le site de liaison du ribosome (séquence Shine-Dalgarno) [41] et donc inhiber la traduction de *prfA*. A 37°C, la tige-boucle s'ouvre, libérant l'accès au site de liaison du ribosome. Bien plusieurs gènes contrôlés par PrfA soient nécessaires à *Lm* pour sortir de la vacuole d'internalisation, l'activité de régulateur transcriptionnel de PrfA n'est maximale que lorsque les bactéries atteignent le cytosol de la cellule hôte, grâce à une régulation allostérique par le glutathion. PrfA est alors plus produit. Son interaction avec du glutathion, qu'il provienne de l'hôte ou de la bactérie va générer une forme hautement active [42]. D'autres régulateurs, tant en cis que trans ont été décrits et sont revus dans [38]. Environ 145 gènes seraient régulés par PrfA [43], mais tous les gènes de virulence ne sont pas sous le contrôle de PrfA [44,45].

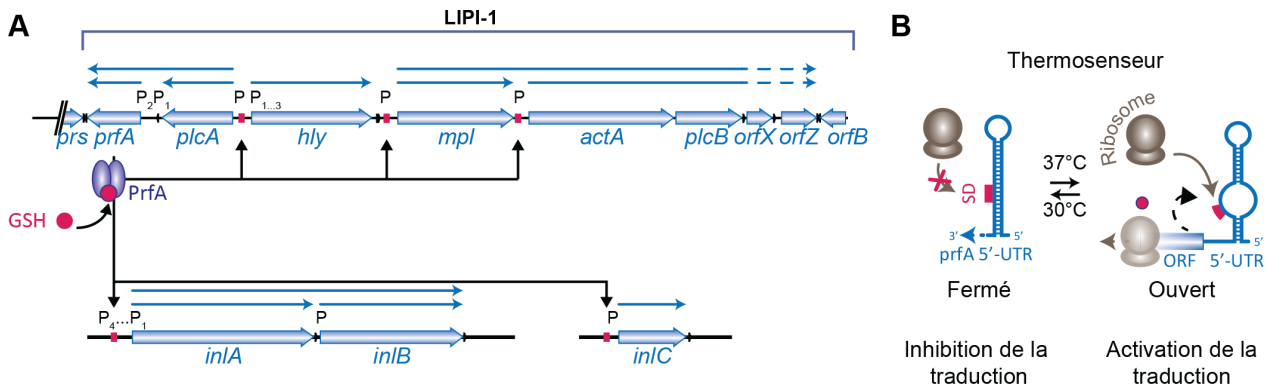


Figure 3.5: Régulation de la virulence de *Lm* par PrfA. Figure adaptée de Lebreton *et al.* [38]. A) Régulation de l'îlot de virulence LIPI-1 et des internalines par PrfA en présence de glutathion (GSH). B) Régulation thermosensible de l'expression de PrfA par une structure tige-boucle dans la région 5'-UTR de PrfA.

Une fois les facteurs de virulence transcrits et traduits, il est nécessaire que certains d'entre eux soient sécrétés hors de la bactérie pour pouvoir agir. Pour cela, les bactéries expriment des systèmes de sécrétion. Chez les bactéries à Gram-négatives, on retrouve les systèmes de sécrétions numérotés de 1 à 5 (T1SS, T3SS, etc.), très bien caractérisés et impliqués dans la virulence de pathogènes comme *E. coli*, *V. cholerae*, *Y. pestis* [46], etc. La voie Sec et la voie Tat (Twin-Arginine translocation) sont communes aux bactéries à Gram-positives et négatives. Spécifiquement chez les bactéries à Gram-positives, dans la mesure où l'enveloppe bactérienne est très différente, d'autres types de sécrétions ont été découverts : le FEA (Flagella export apparatus), le FPE (Fimbrillin-Protein exporter), les holines et le Wss (WXG100 protein secretion system) [47]. Chez *Lm*, c'est surtout la voie Sec qui est utilisée pour l'export des facteurs de virulence, dont la LLO, bien que d'autres voies soient aussi présentes. Le système Sec est composé de trois sous-unités (SecY, SecE et SecG) et de nombreuses protéines chaperonnes essentielle à la translocation protéique, qui se fait en trois étapes. D'abord, un peptide signal (composé de 10 acides aminés hydrophobes) est reconnu dans la séquence N-terminale de la protéine dépliée (1- adressage), ce qui provoque une ouverture de l'hétérotrimère qui va pouvoir activement faire passer la protéine (2- translocation). Une fois la protéine sortie, le peptide signal peut être clivé et la protéine repliée (3- maturation) [48] (figure 3.6).

Une fois dans le cytoplasme, les facteurs de virulence peuvent interagir avec les composants cellulaires de multiples manières et perturbent de nombreuses fonctions cellulaires, notamment en touchant à l'intégrité des membranes

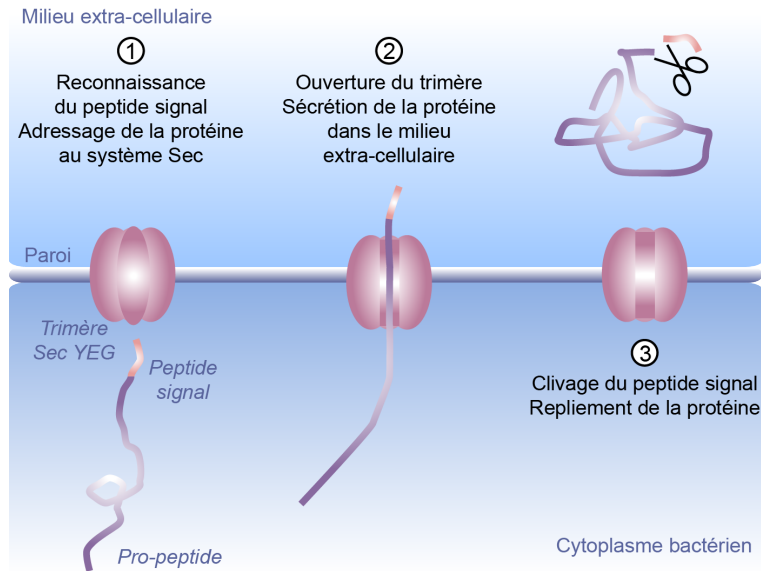


Figure 3.6: Le système de sécrétion Sec. Figure inspirée de Tsirigotaki *et al.* [48].

[49] grâce une classe particulière de facteurs de virulence, les cytolysines.

3.1.1.2 Les cytolysines comme acteurs clés de la virulence

3.1.1.2.1 Description et classification des cytolysines bactériennes

La famille des cytolysines est la famille la plus étendue de facteurs de virulence [50]. Essentiellement produites par des bactéries pathogènes, les cytolysines sont sécrétées sous la forme de monomères solubles [51] et, en cas d'interaction avec leur récepteur à la surface des cellules hôtes, vont s'oligomériser pour former un pore dans la membrane. Les récepteurs peuvent être des lipides, sucres ou protéines membranaires. En conséquence, la perméabilité et l'intégrité de la membrane plasmide est altérée, ce qui entraîne des efflux d'ions comme le potassium, de métabolites comme l'ATP voire même de protéines plus larges [50], ce qui peut perturber la cellule au point d'en entraîner la mort [52]. Les cytolysines peuvent être classées selon (i) leur structure protéique (le domaine transmembranaire est-il en hélice α ou feuillet β ? [51]) ou (ii) selon leurs récepteurs. Une liste non-exhaustive des cytolysines et de leur classification est présentée dans le tableau en annexe 8.1 (tableau 8.1). Les pores formés peuvent varier en fonction du nombre de monomères nécessaires à leur formation (de 1 à 50 environ) [50,53,54], mais aussi par leur taille (2 nm à 40 nm environ).

Parmi les sous-groupes, les cytolysines dépendantes du cholestérol (CDC) sont des toxines à feuillets β produites par les bactéries à Gram-positives dont 28 ont été identifiées à ce jour, comme revu dans Heuck *et al.* et Johnstone *et al.* [55,56]. Cette famille de cytolysines forme, en présence de cholestérol, un pré-complexe qui viendra finalement s'insérer dans la membrane. Si le cholestérol a longtemps été décrit comme leur récepteur, il semblerait aujourd'hui, que, bien que la présence de cholestérol soit indispensable à la formation des pores, les CDC peuvent reconnaître d'autres éléments à la surface des cellules [57].

La perturbation des flux ioniques résultant de la perforation des membranes a été particulièrement décrite comme un inducteur de stress. L'efflux potassique va induire l'activation des voies de signalisation MAPK (p38 et ERK), de l'inflammasome, de l'autophagie et la réorganisation de l'architecture cellulaire avec la formation de gouttelettes lipidiques, la déphosphorylation des histones ou l'inhibition de la traduction, comme revu dans Gonzalez *et al.* [58]. Les influx calciques vont quant à eux être impliqués dans des dysfonctionnements mitochondriaux et l'induction du stress du réticulum endoplasmique (Stress RE) [59].

3.1.1.2.2 Le cas de *Listeria monocytogenes* et de la LLO

Formation de pore par la LLO

La listériolysine O (LLO) est une CDC sécrétée par *Listeria monocytogenes*, décrite pour induire un stress cellulaire, notamment à travers la perturbation de la membrane plasmique. Produite sous forme de pré-peptide de 529 résidus, elle est clivée après sa sécrétion en une protéine de 504 acides aminés [60]. La résolution de sa structure par cristallographie [61] a permis de définir 4 domaines. Le domaine D4 comporte une séquence de dix acides aminés très conservés essentielle à l'interaction entre monomères et le motif de liaison au cholestérol et à la membrane [61] (figure 3.7). L'interaction avec la membrane va permettre un changement de conformation favorable à la formation d'un pré-pore puis à l'insertion dans la membrane [62]. Dans le cas de la LLO, le nombre de monomères et la taille du pore semblent variables [62] mais le diamètre du pore est en général compris en 30 et 50 nm [63].

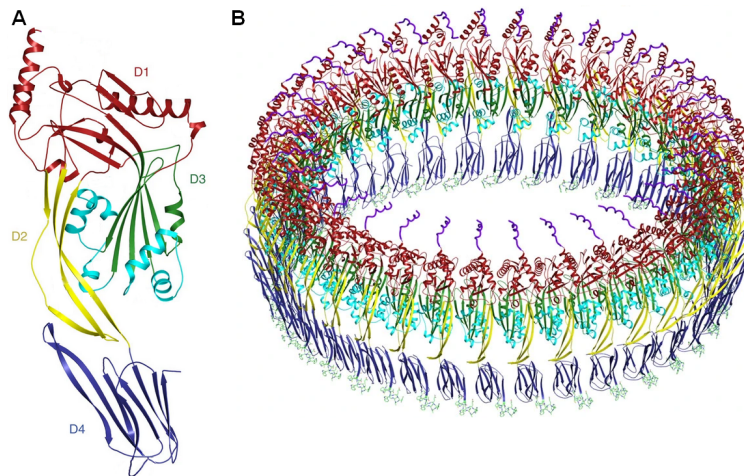


Figure 3.7: Structure cristalline de la LLO. Figure adaptée de Köster *et al.* [61]. A) Monomère de LLO avec ses domaines D1 à D4. B) Modélisation d'oligomérisation de la LLO en pore.

Régulation de la LLO

La LLO est codée par le gène *hlyA*, dont la transcription est contrôlée par le facteur de transcription PrfA [64], à l'aide de plusieurs promoteurs [65]. Particulièrement sensible à la présence de PrfA, l'expression de la LLO ne nécessite pas la présence de glutathion pour être activée. La régulation de son expression a été revue dans Osborne & Brumell [40].

Une fois traduite, la LLO va être sécrétée par le système de sécrétion Sec [66] et dans la vacuole, sera réduite au niveau de sa cystéine 485 par une thiol-oxydoréductase (GILT) produite par la cellule hôte [67], ce qui provoque son activation. Son oligomérisation est dépendante de la concentration en chlore [68] mais surtout du pH car la présence de résidus acides induit à pH >6,5 une conformation incompatible avec l'oligomérisation et la formation de pores. Ainsi, un pH à 6 (comme dans les phagosomes primaires) semble être le plus permissif à la formation de pores [69], mais une activité résiduelle de la toxine a aussi été rapportée à pH neutre dans le cytosol des cellules, suggérant une régulation de la LLO par le pH plus complexe [70].

Enfin, dans la cellule, la LLO peut être dégradée par la cathepsine D [71] ou la métalloprotéase MMP8 [72]), mais aussi par le protéasome [73] et la voie N-end rule [74], permettant à la cellule d'échapper partiellement à la toxicité de la LLO. La régulation de l'expression de la LLO est illustrée dans la figure figure 3.8.

La LLO, plus qu'une cytolyse

Les fonctions de la LLO sont multiples, ce qui en fait une arme de *Lm* essentielle à la colonisation des cellules.

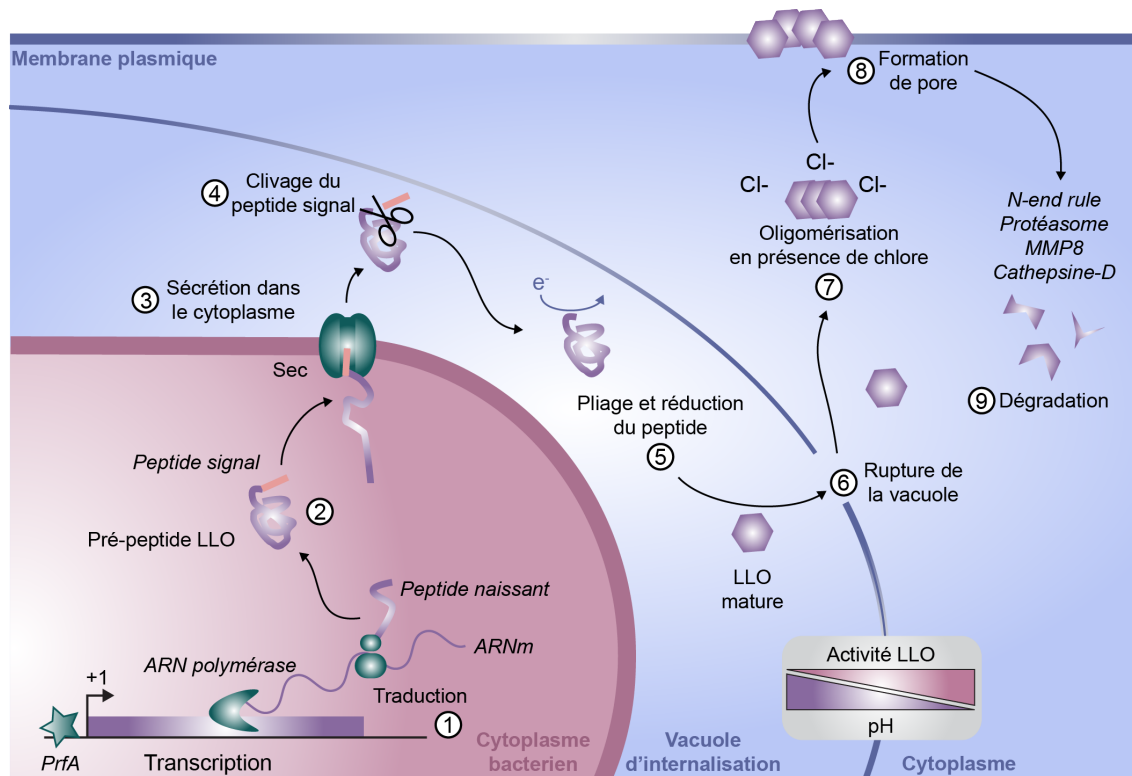


Figure 3.8: Régulation de l'expression de la LLO. Production, transport, maturation, et dégradation de la LLO au cours de l'infection.

Certains seront décrits plus en détail dans le paragraphe suivants; les revues de Osborne & Brumell [40], Lebreton *et al.* [34], ou des articles plus récents [33,75–77,78] en rendent compte avec davantage de détails (figure 3.9).

Parmi les rôles de la LLO, les perturbations des flux calciques et potassiques m'ont particulièrement intéressées. La formation de pores va en effet induire un influx calcique [79] tout en perturbant les compartiments de stockage intracellulaires de calcium [80]. De même, les pores de LLO vont induire un efflux de potassium [81], notamment impliqué dans les modifications chromatinienne. Au-delà de l'effet pro-bactérien de la perturbation de la signalisation calcique [82], ces flux ont aussi été impliqués dans l'internalisation de la bactérie [78]. Ce mécanisme LLO-dépendant intervient donc à de nombreuses étapes de la progression de l'infection et j'ai pu le replacer comme une signalisation essentielle dans mon projet de recherche.

3.1.2 Réponses des cellules hôtes aux infections bactériennes

Il ne s'agit pas dans cette section de décrire exhaustivement les différents mécanismes de réponse de l'hôte aux diverses infections bactériennes, mais de récapituler les éléments clés des réponses qui s'organisent, de l'échelle de la cellule à celle de l'organisme, en réponse à notre bactérie de référence, *Lm*.

Avant d'accéder aux cellules, *Lm* doit d'abord passer outre des obstacles physiques, comme la présence de bile dans les intestins, un pH très acide ou la production de mucus; mais la bactérie a évolué pour contrevenir cette première ligne de défense [[83]). La capacité de *Lm* à se propager dans un tissu de cellule en cellule sans se retrouver dans le milieu extracellulaire la rend particulièrement difficile à détecter par les réponses immunitaires à médiation humorale, mais la bactérie peut quand-même être repérée lors de ses phases extracellulaires par des cellules immunitaires. Comme revu dans [84], dans la circulation, *Lm* peut être détectée par des cellules myéloïdes diverses, comme les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes ou les neutrophiles. L'internalisation des bactéries par des cellules dendritiques engendre ensuite l'activation des cellules NK (Natural killers) et des lymphocytes T, provoquant ainsi une réponse inflammatoire innée et une réponse immunitaire adaptative à un niveau

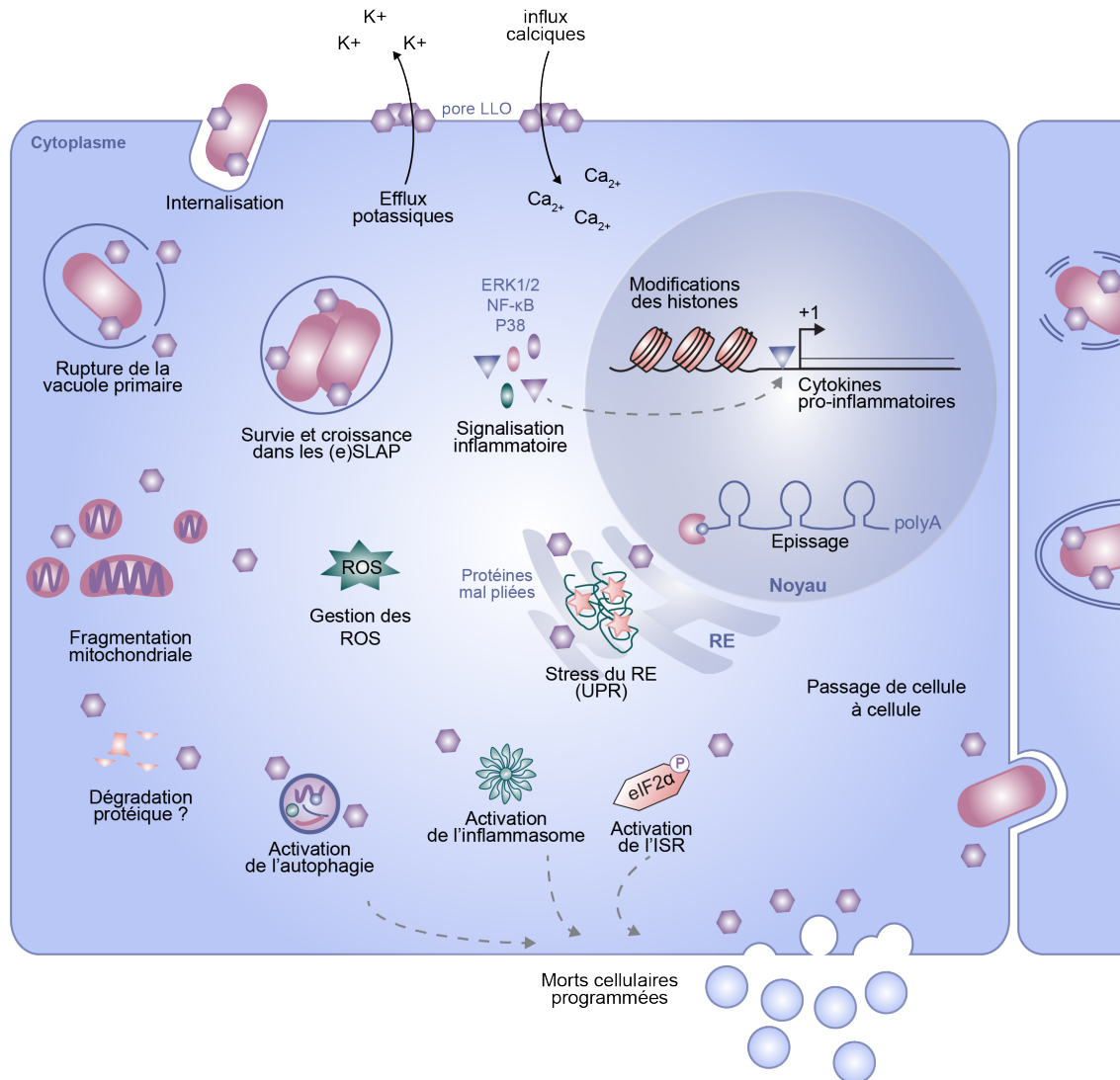


Figure 3.9: Fonctions cellulaires de la LLO.

systémique.

Par ailleurs, les cellules non immunitaires mettent elle aussi en œuvre des mécanismes de réponse lors d'une infection ou plus génériquement, lorsqu'elles sont la cible de dommages. Lorsque ces mécanismes sont indépendants de l'état de stress d'autres cellules, on parle de réponses cellulaires autonomes.

3.1.2.1 Réponse immunitaire autonome

3.1.2.1.1 Détection des PAMP et DAMP

La première étape de mise en place d'une réponse autonome est la détection du pathogène par des récepteurs spécialisés, les PRRs (pathogen recognition receptors), qui vont reconnaître des composants bactériens appelés PAMP (pathogen associated molecular pattern) ou des molécules des cellules hôtes typiquement associées à des stress cellulaires appelées DAMP (Damage-associated-molecular pattern). Les PRRs peuvent être situés à la surface des cellules comme être cytosoliques et leur activation entraîne des cascades de signalisation aboutissant à la mise en place d'un mécanisme immunitaire comme l'inflammation (figure 3.10).

Parmi les récepteurs membranaires principaux impliqués dans la reconnaissance de PAMP et DAMP, on peut

trouver les TLR (Toll-like receptors). Dans les cas de l'infection par *Lm*, ce sont surtout le TLR2 et TLR5 qui vont être mis en jeu. En effet, TLR2 va reconnaître les acides lipotéichoïques, et TLR5 la flagelline, composant principal du flagelle [85]. Suite à la liaison de ces récepteurs avec leur ligands, la protéine adaptateur MyD88 va être recrutée et activer la voie NF- κ B. NF- κ B est un facteur de transcription composé d'une protéine NF- κ B (NF- κ B1 ou NF- κ B2) et d'une protéine Rel (RelA, Relb ou Relc), séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B. En réponse à un stimulus, comme le recrutement de MyD88 au niveau des TLR, le complexe IKK α /IKK β /NEMO va être phosphorylé par TAK1 et lui-même phosphoryler I κ B, provoquant ainsi sa dégradation. Le complexe NF- κ B va pouvoir être transporté dans le noyau et se lier à ses gènes cibles pour favoriser leur transcription. Parmi ces cibles, les cytokines pro-inflammatoires interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) ou l'interleukine-12 (IL-12) [86]. Parmi les récepteurs cytosoliques (NLR, NOD-like receptors), on trouve NOD1 et NOD2, qui vont reconnaître le peptidoglycane de la paroi bactérienne et vont aussi activer NF- κ B *via* l'activation de la voie MAPK/p38 [87], mais aussi la voie ERK [88] qui aboutit à l'activation de l'autophagie, un mécanisme de protection de la cellule qui consiste à dégrader et recycler ses composants ou ceux de corps étrangers. L'autophagie peut aussi être fortement induite par la translocation nucléaire vers cytoplasmique du DAMP HMGB1 [89]. Enfin, les NLR AIM2 et RIG-I sont respectivement impliqués dans l'activation de deux voies majeures d'inflammation et d'activation de réponses immunitaires : l'inflammasome [90] et les réponses interférons [91].

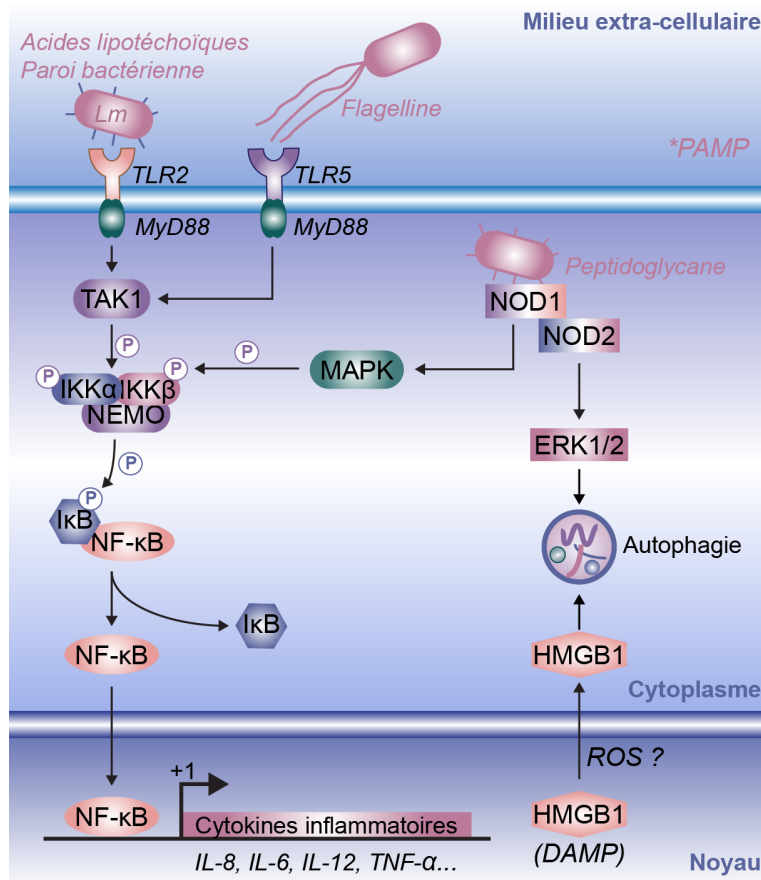


Figure 3.10: Détection des PAMP et DAMP au cours de l'infection par *Lm*. Voies de signalisation cellulaire activées en réponse à la reconnaissance de PAMP et DAMP propres à l'infection par *Lm*.

3.1.2.1.2 Les réponses interférons

Initialement étudiés pour leurs propriétés antivirales, les interférons (ifn) sont une famille de cytokines impliquées dans les réponses immunitaires innée ou adaptative [92]. Il existe trois sous-familles : les interférons de type I, II

et II, qui diffèrent selon leur récepteur et la voie de signalisation activées, mais aussi par le type cellulaire dans lesquels ils sont exprimés. L'étude du rôle des interférons dans le contexte de l'infection bactérienne a mis à jour leur importance dans le développement de l'évolution de l'infection par *Lm*, qui peut en effet induire l'activation des trois familles d'interférons, comme revu par Dussurget *et al.*, [92] et est illustrée en figure 3.11. De manière générale, les interférons vont être exprimés suite à la stimulation de récepteurs, membranaires (TLR) comme cytosoliques (NLR), ce qui induit une cascade de signalisation qui va aboutir à la translocation nucléaire de facteurs de transcription comme NF- κ B (interférons λ ou de type III, interféron β , qui fait partie des interférons de type I), déjà décrit plus haut, IRF7 (interférons α et β) ou IRF3 (interféron β). Si la translocation de IRF3 et 7 peut se faire directement par stimulation des TLR et recrutement de MyD88, ce qui entraîne la phosphorylation de ces deux facteurs de transcription par TBK1 ou IKK α , d'autres mécanismes plus fins d'induction des interférons existent.

Pour détecter la présence de la bactérie dans le milieu extracellulaire ou dans le cytoplasme, de nombreux récepteurs cellulaires sont mis en jeu. La sécrétion de dinucléotides cycliques (c-di-AMP ou c-di-GMP) par *Lm* ou la présence d'ADN bactérien double-brin cytosolique va être détectée par le NLR DDX14. L'ADN bactérien peut aussi activer la production de cGAMP par cGAS (cGAMP synthase) [93] et l'ARN bactérien cytosolique peut être détecté par le NLR RIG-I [94]. Toutes ces stimulations vont aboutir à l'activation du facteur central d'induction des voies interférons, STING (Stimulator of interferon genes), qui va alors coordonner la translocation nucléaire des facteurs de transcription des gènes d'interférons. Plus récemment, Il a aussi été démontré que les réponses interférons pouvait être induite dans des cellules non-infectées, qui rentreraient en contact avec de l'ADN bactérien empaqueté par MVB12b dans des vésicules. Ces dernières fusionnent avec la membrane de cellules non-infectées avant d'activer la voie cGAS/interférons [95].

Dans le cadre de l'infection par *Lm*, la production d'interférons peut avoir des effets antibactériens comme probactériens [92], selon leur type et le contexte de leur production. Dans le cas de l'infection par *Lm*, si la production d'interférons γ (type II) participe activement à l'élimination du pathogène, notamment à travers la signalisation STAT1, les interférons de type I seraient favorables à la bactérie, notamment par la réduction des défenses de l'hôte (apoptose, phagocytose, etc.) et de la réponse immunitaire adaptative. Le rôle exact des interférons λ sur l'infection par *Lm* reste à étudier. Plus généralement, le rôle des réponses interférons dans le contrôle des infections bactériennes est dépendant du type de bactérie [96].

3.1.2.1.3 Activation de l'inflammasome

Comme décrit dans [90], l'infection par *Lm* peut entraîner l'activation de l'inflammasome par plusieurs voies. L'inflammasome ou les inflammasomes, revus dans [97], sont de larges complexes de protéines impliqués dans la régulation de la caspase1 et la mise en place d'une réponse inflammatoire par la maturation et la sécrétion de IL-1 β et IL-8. L'une des conséquences de l'activation des inflammasome peut être l'activation la pyroptose, une forme de mort cellulaire programmée inflammatoire. L'es 'inflammasome est aussi impliqué dans la régulation de la sécrétion protéique, dans le métabolisme des sucres et des lipides ou dans la maturation des phagosomes. Les inflammasomes se forment en réponse à des DAMP ou PAMP auxquels vont répondre un senseur (un NLR ou un AIM2-like receptor, ALR), qui va s'associer à une protéine de pontage (ASC). Le complexe ainsi formé peut alors interagir avec la pro-caspase 1 (figure 3.12).

Pour répondre à un large panel de signaux, il existe aussi de multiples protéines senseurs :

- NLRC4 va directement répondre à des composants bactériens comme la flagelline.
- AIM2 va lier l'ADN double-brin cytoplasmique.
- NLRP3, le senseur principal de l'inflammasome va reconnaître des signaux de nature physico-chimique, notamment les efflux de potassium [98].

Une fois le complexe formé, la pro-caspase 1 va être clivée en caspase 1 active. S'ensuit ensuite une série de clivages des précurseurs d'interleukines IL-1 β et IL-8, puis de la gasdermine D qui va induire la pyroptose et la sécrétion dans le milieu extracellulaire des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-8 matures. C'est la base de l'activation de l'inflammasome canonique. Il existe aussi un inflammasome non-canonique, reposant sur la détection de LPS et l'activation de la caspase11 mais dont le mécanisme reste encore mal défini.

En terme de cibles, les inflammasomes module l'expression de NF- κ B, des interférons de type I et III, et en

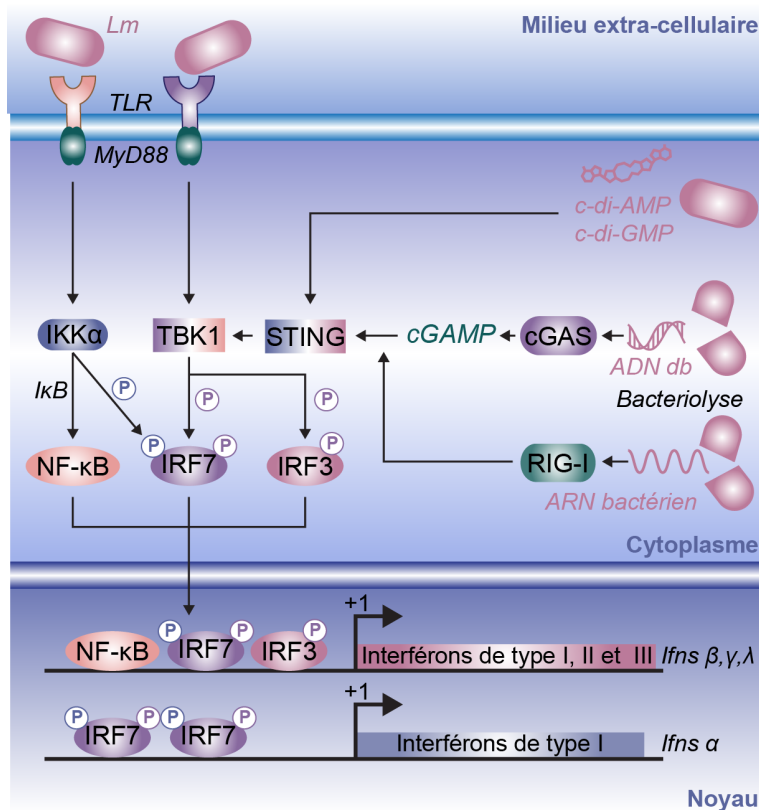


Figure 3.11: Les réponses interférons à l'infection par *Lm*. Mise en place, au cours de l'infection par *Lm* de voies de signalisations aboutissant à l'expression de plusieurs types d'interférons.

conséquence des gènes stimulés par les interférons (ISG) [97]. Ils vont aussi inhiber l'autophagie, plus précisément la mitophagie, et amène ainsi à une déficience de la fonction mitochondriale et à la production de ROS [99]. L'ampleur de l'activation de chacune de ces voies en réponse aux infections bactériennes est par ailleurs coordonnée par un réseau de régulations transverses, au sein duquel de nombreux facteurs sont communs à plusieurs voies.

Dans le contexte de l'infection par *Lm* (figure 3.12), plusieurs mécanismes de l'activation de l'inflammasome ont été décrits [100,90]. L'assemblage de l'inflammasome canonique avec NLRP3 peut être induit par des facteurs bactériens comme p60, un facteur de virulence, de l'ARN bactérien cytosolique, ou par l'influx de potassium provoqué par la LLO [101]. La protéine GBP5 peut aussi détecter la paroi des bactéries cytosoliques et activer NLRP3, tout comme la rupture des vacuoles primaires, conduisant à un relargage de la cathepsine B dans le cytosol. L'inflammasome primaire peut aussi être induit par des signaux indirects comme l'activation de la voie TLR-MyD88 et IRAK1 en aval ou par les interférons γ , eux-même induits au cours de l'infection par *Lm* [90]. Enfin, l'inflammasome canonique peut être activé de manière indirecte par les voies NF- κ B (qui agit comme activateur transcriptionnel de NLRP3 et pro-IL-1 β), ERK ou encore la présence de ROS, dont la concentration augmente en conséquence de l'infection par *Lm* [102]. D'autres inflammasomes peuvent aussi être assemblés, notamment avec AIM2 comme senseur lors de la détection d'ADN double-brin cytosolique riche en A/T ou avec NLRC4 lors de la détection de flagelline. Toutefois, la voie NLRC4 est certainement plus anecdotique car *Lm* a la capacité de réprimer l'expression de la flagelline à 37°C [103]. Plus récemment, la présence d'acides lipoteichoïques dans le cytosol après la rupture de la vacuole primaire a été montrée comme activant l'inflammasome NLRP6 [99].

Les conséquences exactes de l'activation de l'inflammasome contre l'infection par *Lm* restent à préciser. En principe, l'induction de la pyroptose et de cytokines pro-inflammatoires comme les interférons devraient être avoir des propriétés antimicrobiennes. Pourtant, ces réponses sont parfois au détriment de l'hôte, dans la mesure où une réponse inflammatoire trop forte peut causer des dommages aux tissus [99]. Il semblerait aussi que l'inflammasome

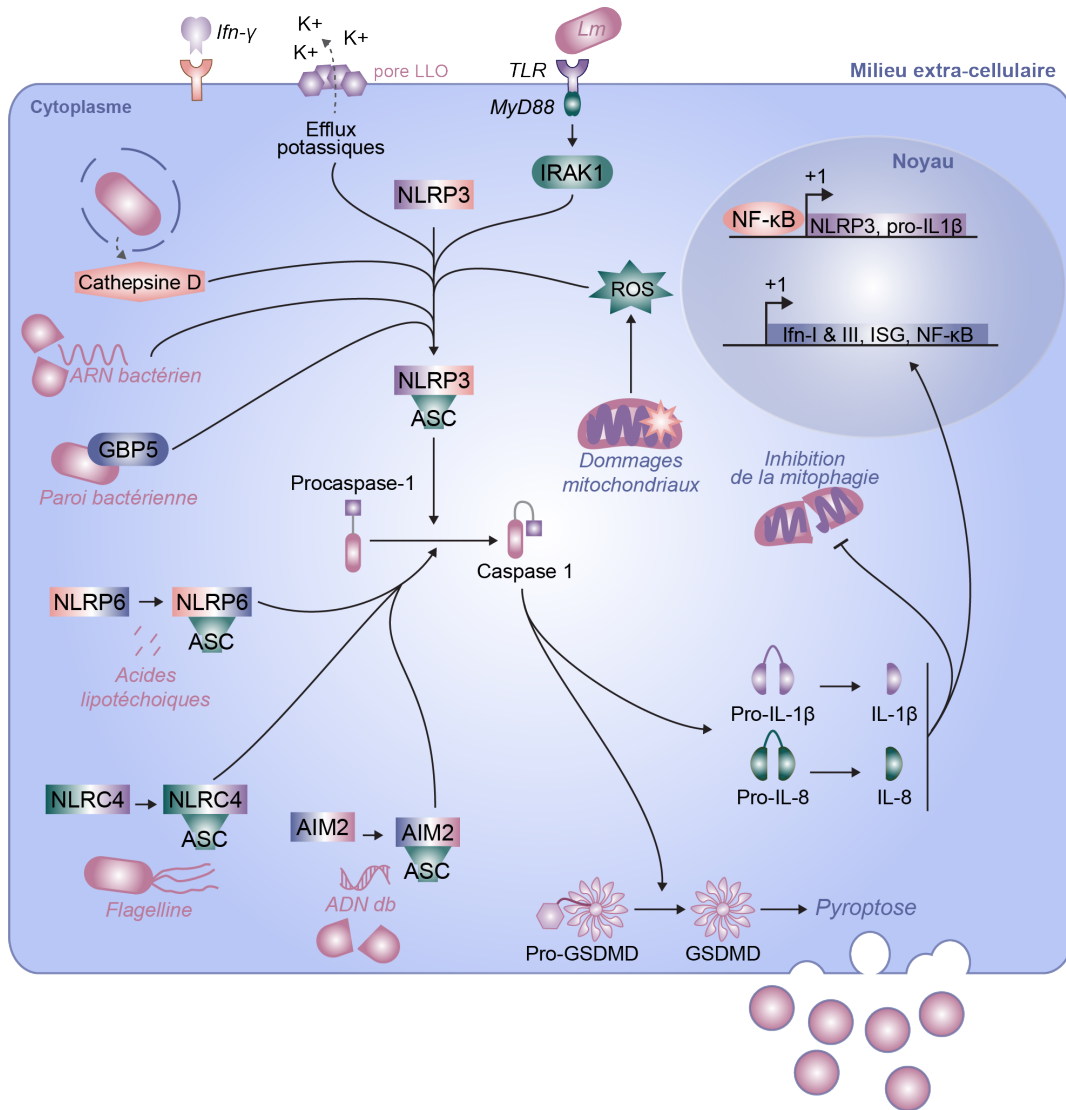


Figure 3.12: Activation de l'inflammasome par l'infection par *Lm*. Plusieurs voies de l'inflammasome sont activées en réponse à différentes composantes de l'infection par *Lm* pour mettre en place une réponse antibactérienne adaptée.

ait un impact négatif sur le développement de l'immunité innée contre *Lm*, favorisant ainsi les réinfections. Cependant, une trop forte activation de l'inflammasome perturberait aussi la virulence des bactéries [99]. Ainsi, bien que de nature intéressante d'un point de vue thérapeutique, il reste à combler de nombreuses lacunes pour précisément comprendre l'implication de l'inflammasome au cours de l'infection par *Lm*.

3.1.2.1.4 Induction de morts cellulaires programmées

L'activation des réponses au stress aboutit souvent à l'induction d'un programme de mort cellulaire, c'est-à-dire à la mise en place contrôlée d'une cascade de signalisation dans le but de tuer la cellule infectée. Il existe divers types de morts cellulaires programmées et l'infection par *Lm* peut en activer trois, comme revu dans [104] et illustré dans la figure 3.13.

L'apoptose est la voie de mort cellulaire la plus décrite et a la particularité de ne pas être inflammatoire voire d'avoir des effets anti-inflammatoires. Centrée sur l'activation de la caspase 3, la voie de signalisation pro-apoptotique entraîne la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, la production de corps apoptotiques et

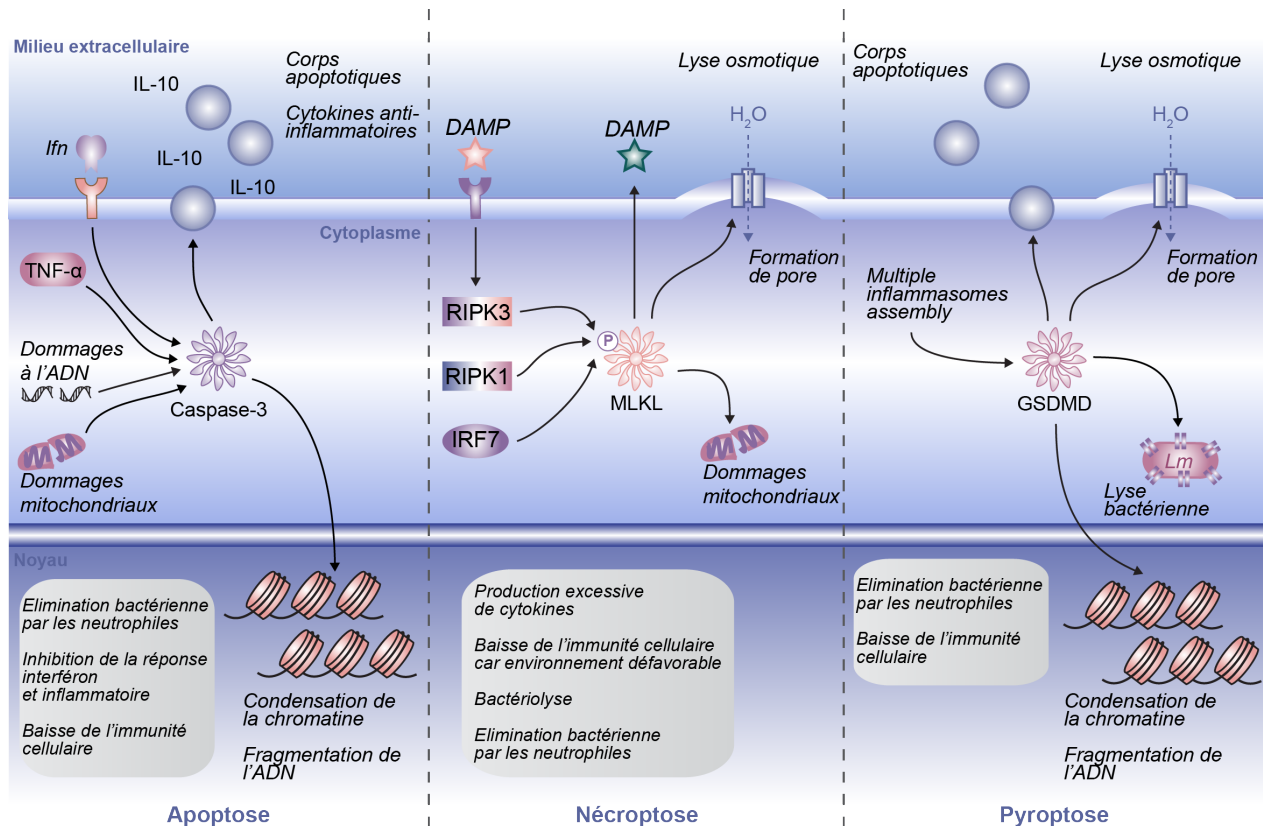


Figure 3.13: Morts cellulaires programmées en réponse à l'infection par *Lm*. Figure inspirée de McDougal *et al.* [104]. L'infection par *Lm* induit l'apoptose, la nécroptose et la pyroptose. Dans les encarts gris sont décrites les conséquences des différents types de morts au niveau de l'immunité cellulaire et de l'élimination des bactéries.

d'IL-10, anti-inflammatoire. Dans les hépatocytes infectés par *Lm*, l'apoptose peut être induite par les dommages à l'ADN et mitochondriaux induits par *Lm*, mais aussi de manière indirecte par la signalisation induite par TNF- α . Les sites apoptotiques vont participer à l'élimination des pathogènes par recrutement des neutrophiles, malgré les propriétés anti-inflammatoires de l'apoptose. De manière intéressante, la production d'interférons de type I par les cellules infectées va pouvoir induire l'apoptose de cellules immunitaires, notamment des lymphocytes. Ce faisant, la production des corps apoptotiques et d'IL-10 va non seulement atténuer l'immunité cellulaire protectrice, mais aussi favoriser la virulence des bactéries qui peuvent alors évoluer dans un environnement non-inflammatoire.

La nécroptose, la version programmée de la nécrose, peut être activée en réponse à des DAMP ou à un choc osmotique, ce qui amène à la phosphorylation du facteur central de la nécroptose, MLKL, par RIPK3. En conséquence, on observe des dommages aux organites, la formation de pores qui induisent un gonflement des cellules et une lyse osmotique et le relargage de DAMP, comme signaux pour les cellules avoisinantes. Dans ce cas aussi, la LLO peut activer la nécroptose par la voie RIPK3/MLKL, mais d'autres voies mènent au même résultat, notamment l'activation de IRF3 ou de RIPK1 par *Lm*. Le mécanisme précis d'activation de la nécroptose par *Lm* reste à étudier. Une mort cellulaire pro-inflammatoire comme la nécroptose a un effet bénéfique sur l'infection en détruisant la niche de colonisation des bactéries et en les exposant aux neutrophiles environnants, provoquant ainsi une réponse immunitaire. Cependant, il semblerait aussi qu'une trop forte mortalité dépendante de la nécroptose inhibe la mise en place de l'immunité cellulaire, peut-être à cause de la destruction des certains types de cellules immunitaires, ce qui a pour conséquence une activation moins efficace des lymphocytes T. Ainsi, le rôle de la nécroptose peut se révéler pro ou anti-bactérien selon les contextes; les stratégies évolutives permettant d'éviter l'activation de l'inflammasome et la pyroptose, par exemple la faible activité de la LLO à pH neutre, confèrent un avantage sélectif à *Lm*.

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la pyroptose est une conséquence de l'activation de l'inflammasome,

plus particulièrement de l'activation de la gasdermine D par la caspase 1. Phénotypiquement, les cellules pyroptotiques partagent des traits communs avec les cellules nécrotiques (la formation de pores et le gonflement) et apoptotiques (clivage de l'ADN, condensation nucléaire, intervention nécessaire de caspases, etc.). Les mécanismes par lesquels l'inflammasome impacte la virulence restent inconnus, mais il est établi que *Lm* peut échapper à son activation, par la répression de la production de flagelline, la modification du peptidoglycane et la modulation de l'activité de la LLO. En effet, la pyroptose a été démontrée comme fortement bactéricide, notamment par la formation de pores à la surface des bactéries par la gasdermine et par le recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles. Ici aussi, l'activation de la pyroptose doit être finement modulée, car elle peut avoir des effets délétères sur l'hôte, notamment en diminuant l'immunité cellulaire en réponse à une production excessive de cytokines pro-inflammatoires et la perte d'activation des lymphocytes T.

En résumé, le rôle des morts cellulaires programmées est ambivalent et ces réponses doivent être finement contrôlées, tant en intensité qu'en temporalité, au risque d'induire des effets néfastes pour l'hôte.

3.1.2.1.5 Activation de la réponse intégrée au stress

Une autre conséquence de l'infection par *Lm* est la mise en place de la réponse aux protéines non-repliées (Unfolded protein response, UPR). Comme revu dans Pillich *et al.*, [100], l'UPR est un mécanisme activé par l'accumulation de protéines mal pliées dans le réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum, ER), ce qui provoque un stress (ER stress), qui stimule les facteurs IRE1 α , ATF6 et PERK et induit l'expression de gènes cibles impliqués dans le pliage et le transport des protéines, la mise en place d'une réponse inflammatoire et aussi l'autophagie (figure 3.14). Dans certains cas, l'activation de l'UPR peut aussi induire l'assemblage de l'inflammasome et la mort cellulaire par apoptose [105], ainsi que la phosphorylation de eIF2 α ; ce qui a pour conséquence un arrêt de la synthèse des protéines et l'apoptose en cas de non-résolution du stress du RE, par la voie ATF4/CHOP [105].

Dans le cas de l'infection par *Lm*, il a été montré que la LLO pouvait induire l'UPR [106] et que l'apoptose qui s'ensuivait avait pour effet de contrôler la dissémination des bactéries dans les tissus. L'UPR appartient à une réponse de stress plus large, appelée la réponse de stress intégrée (Integrated stress response, ISR). Au cœur de ce mécanisme se trouve la phosphorylation de eIF2 α , qui peut être induite par différents stimuli. La kinase PERK répond au stress du RE, la kinase GCN2 à la déplétion en acides aminés, la kinase PKR à la détection d'ARN double-brin viral et la kinase HRI à la déplétion en hème [107]. En réponse à la phosphorylation d'eIF2 α , on observe une inhibition générale de la synthèse protéique. En parallèle, l'activation du facteur de transcription ATF4 induit la traduction sélective de gènes cibles impliqués dans la résolution du stress. Si la situation de stress s'éternise, un programme de mort cellulaire programmé, comme l'apoptose, sera alors mis en place [108].

Au-delà de l'activation de l'UPR, *Lm* aussi été impliquée dans l'activation de l'ISR (figure 3.14), toujours à travers la LLO qui va activer PERK, mais aussi indirectement par l'augmentation de la production d'interférons de type I [109], qui vont activer la kinase PKR. Cette étude nuance aussi l'action bénéfique de l'ISR sur la dégradation des bactéries, en suggérant que la mortalité massive de macrophages en conséquence de l'activation de l'ISR peut être au détriment de l'hôte en entraînant des dommages aux tissus et un contexte de stress favorable à une réinfection. Il a été décrit que la LLO induit aussi une déplétion en acides aminés [77], activant ainsi l'ISR *via* la kinase GCN2. Enfin, l'implication de *Lm* dans l'activation de l'ISR a été confirmée par dans le modèle expérimental que nous utilisons au laboratoire, l'infection de cellule d'adénocarcinome de côlon par la souche épidémique de *Lm* LL195 sur une cinétique de 10h [110]. Dans ce contexte, Vinko Besic a observé une phosphorylation transitoire de eIF2 α , suggérant ainsi une temporalité d'activation de l'ISR au cours de l'infection.

3.1.2.1.6 Formation d'organites sans membrane

Dans le contexte de l'activation de l'ISR à travers la déplétion en acides aminées, il a aussi été décrit que *Lm* pouvait induire la formation d'organites sans membrane (Membraneless organelles, MLO) [111]. Les MLO sont décrits plus bas, mais sont globalement des plateformes de régulation de l'expression de gènes, constitutivement présentes ou formées en réponse à un stress. Les compartiments stress-dépendants les plus décrits sont les granules de stress (Stress granules, SG) et sont induits par la phosphorylation d'eIF2 α [112], notamment en cas d'infection virale [113], mais n'ont jamais été observés en cas d'infection bactériennes.

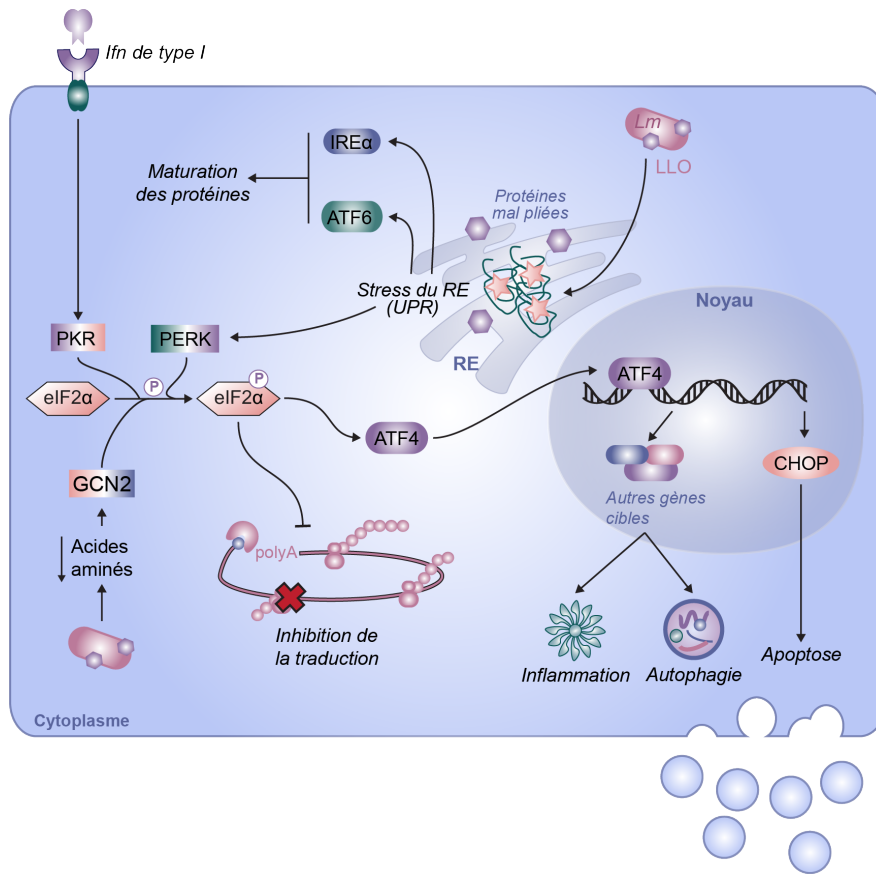


Figure 3.14: Activation de l'ISR en réponse à l'infection par *Lm*. Composantes de l'UPR et de l'ISR activées par certaines conséquences de l'infection par *Lm*.

En revanche, d'autres types de granules sont observés au cours de l'infection par *Lm* (figure 3.15). En effet, sous l'effet de l'induction de l'ISR, la maturation des petits ARN nucléaires snRNP U, impliqués dans la formation du spliceosome, vont être déroutés et amenés, en plus de leur complexe d'escorte cytosolique, le SMN (survival motor neuron), vers les p-bodies, contribuant ainsi à la formation de granules appelés U-bodies dans le cytoplasme [111]. Ce mécanisme est dépendant de la voie ATF3/4 dans un contexte d'inhibition de l'initiation de la traduction et donc de mTOR. Cette étude montre aussi que l'inhibition du composant DDX20 du SMN accentue les réponses ATF3 mais aussi NF- κ B, suggérant que la séquestration de DDX20 va agir comme un agoniste de la réponse inflammatoire et de l'ISR contre l'infection. La séquestration des composants du spliceosome suggère déjà une possible altération de l'épissage. Cette hypothèse est renforcée par une étude plus récente, qui montre que le facteur de virulence InIP sécrété par *Lm* et adressé au noyau va cibler la protéine RBM5, impliquée dans l'épissage des ARN et induire sa condensation en granules nucléaires, tout en accaparant la protéine de régulation d'épissage SC35, initialement un marqueur des speckles nucléaires, des organites de rétention de facteurs d'épissage [114]. Ce faisant, InIP change la morphologie des speckles, stimule la formation de granules RBM5, et inhibe la mort cellulaire médiée par RBM5. Ce dernier étant impliqué dans la machinerie de l'épissage, la formation de ces granules nucléaires suggère aussi un lien entre épissage et infection par *Lm*.

3.1.3 Réorganisation de l'expression des gènes hôtes et conséquences fonctionnelles

Il est fréquent que, au cours des infections bactériennes, l'expression des gènes de l'hôte soit remanié, que ce soit par la bactérie dans un but de colonisation et d'invasion, ou par la cellule comme stratégie de défense. La progression de l'infection repose donc sur le subtil équilibre entre survie cellulaire et réponse antimicrobienne, qui définira à terme l'issue de l'infection. Les modifications de l'expression des gènes de l'hôte ont été bien décrites

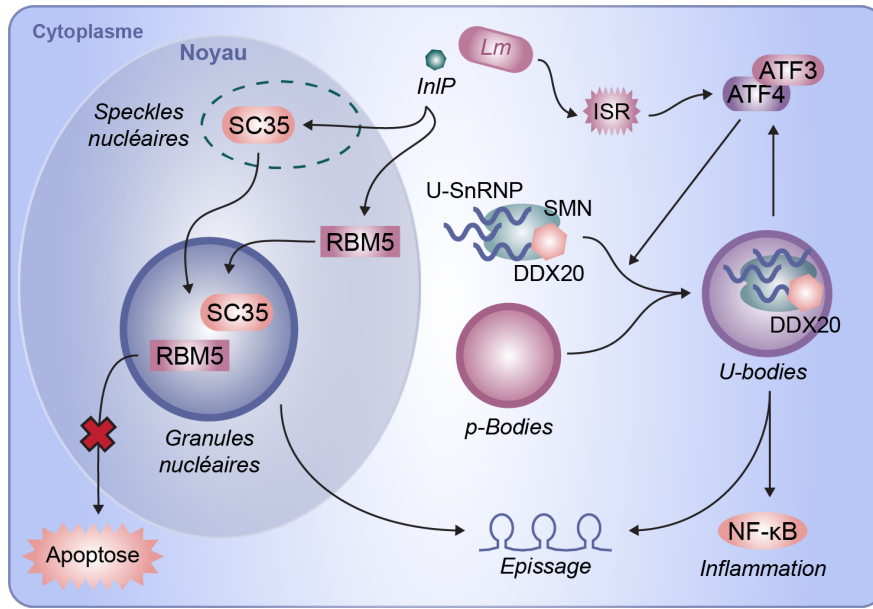


Figure 3.15: Formation d'organites sans membranes en réponse à l'infection par *Lm*. Régulation de l'activité de facteurs d'épissage par l'infection par *Lm* en les séquestrant dans des granules nucléaires ou cytoplasmiques.

dans le cas de l'infection par *Lm*, qui impacte de nombreux niveaux de régulation.

3.1.3.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes

Pour réguler l'expression d'un gène, une des manières les plus directes est de contrôler le taux de transcription de son ARNm, en ciblant l'activité des facteurs de transcription ou leur liaison à la chromatine. Alternativement, il est possible d'impacter la maturation de l'ARN ou bien sa traduction. Dans le cas de l'infection par *Lm*, plusieurs de ces stratégies sont mises en place pour réguler l'expression des gènes de l'hôte [115].

3.1.3.1.1 Régulation de la transcription par signalisation

Il est décrit plus haut que les signalisations **NF-κB** et **interférons** sont activées par l'infection par *Lm*. En effet, l'interaction entre TLR2 et certains composants de *Lm* provoque la libération de NF-κB, qui va pouvoir être transporté vers le noyau et induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires [116]. Similairement, l'interaction de *Lm* avec le récepteur NOD1 va activer la voie MAPK/p38 à travers l'activation de la kinase TAK1. En conséquence, le facteur de transcription AP-1 va à son tour participer à l'expression de cytokines pro-inflammatoires [116]. Ces mécanismes de régulation transcriptionnelle vont donc participer à l'établissement d'une réponse inflammatoire antibactérienne, comme partiellement illustré dans la figure 3.10.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les réponses **interférons** sont activées en cas d'infection par *Lm*. Les interférons vont induire des modifications de l'expression de certains gènes (ISG) impliqués dans la réponse anti-infectieuse. Par exemple, l'interféron β favorise l'expression de ISG15, qui peut se lier à des protéines cibles par un procédé appelé ISGylation, ce qui affecte la stabilité des protéines associées [117]. L'interféron β induit aussi une réponse inflammatoire rapide à travers l'expression de cytokines pro-inflammatoires [118]. Les interférons γ quant à eux induisent l'expression de GBP (guanylate-binding proteins), qui favorisent l'élimination bactérienne par l'activation de l'inflammasome [119].

Si ces réponses sont du fait de la mise en place par l'hôte d'une réponse anti-inflammatoire, *Lm* sécrète aussi des facteurs de virulence qui impactent la transcription des gènes de l'hôte. En parallèle de l'effet anti-infectieux de l'interféron β , cette réponse peut aussi profiter à *Lm*, qui a développé deux méthodes pour induire leur expression : la sécrétion d'un petit ARN non-codant [120] et la production d'un facteur de virulence, Zea [91]. Ces deux signaux activent RIG-I et la réponse transcriptionnelle qui en dépend.

La sécrétion de facteurs de virulence peut aussi impacter la transcription. La LLO peut aussi moduler la transcription d'un groupe de gènes, en activant la translocation de NF- κ B dans le noyau [121], vraisemblablement à travers la perturbation des flux calciques. NF- κ B peut aussi être directement activé par les facteurs de virulence LAP (*Listeria* adhesion protein) [122] ou l'internaline B (InIB) [123]. L'internaline C (InIC) va quant à elle se comporter comme antagoniste de LAP et la LLO, en empêchant la phosphorylation de I κ B et donc la translocation de NF- κ B dans le noyau, empêchant sa fonction de facteur de transcription [124]. InIB va aussi activer le pendant MAPK-dépendant de l'expression des cytokines pro-inflammatoires : son interaction avec son récepteur c-Met va activer la voie PI(3)K et en aval les voies de signalisation JNK, AKT et MAPK [31]. Enfin, *Lm* peut impacter l'expression des gènes de l'hôte en affectant les modifications post-traductionnelles de nombreuses protéines, comme la phosphorylation de ERK1/2 ou p38 [76], ce qui impacte la voie MAPK, ou en inhibant l'ubiquitinylation [76] ou la SUMOylation [125] de facteurs de transcription.

3.1.3.1.2 Régulations par réorganisation de la chromatine

Au-delà de l'action des facteurs de transcription, la transcription des gènes peut aussi être gouvernée par l'accessibilité du locus sur le génome. La chromatine s'articule autour d'histones, qui contrôlent la densité de compaction de cette dernière. Il existe 4 types d'histones, appelés H2A, H2B, H3 et H4, qui s'articulent en octamère pour former des nucléosomes autour desquels s'enroule la chromatine. Une chromatine compactée (hétérochromatine) va être inaccessible, alors qu'une chromatine relâchée (euchromatine) va pouvoir interagir avec d'autres protéines dont la machinerie de transcription [126,127]. Une manière de réguler l'accessibilité de la chromatine est par la modification post-traductionnelle des queues N-terminale des histones.

En réponse à la stimulation des récepteurs NOD1 par le peptidoglycane dans la paroi de *Lm* et l'activation qui s'ensuit de la voie MAPK, il a été décrit une augmentation de l'acétylation de la lysine 8 de l'histone H4 (H4K8-ac) et de la lysine 14 de l'histone 3 (H3K14-ac), ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3 (H3S10-ph), comme revu dans Eldrige *et al.* [115]. Ces modifications favorisent le relâchement localisé de la chromatine et la transcription des gènes associés en recrutant l'acétyltransférase CBP et en inhibant l'activité de la désacétylase HDAC1. Dans le cas de l'infection par *Lm*, ces marques de modifications se retrouvent dans les promoteurs d'un groupe de gènes pro-inflammatoires, comme l'interleukine-8 (IL-8), et exercent un rôle *a priori* protecteur de la cellule hôte (figure 3.16).

L'activité de plusieurs facteurs de virulence de *Lm* a également pour conséquences, directes ou indirectes, des modulations transcriptionnelles impliquant des régulations chromatiniennes. Ces mécanismes sont résumés par Lebreton *et al.* [34]. Pour commencer, la LLO a été décrite pour induire une réduction globale de l'état d'acétylation de l'histone 4 (H4K-deAc), mais aussi de la déphosphorylation de l'histone 3 (H3S10-deph) [128], de manière dépendante à la perturbation du flux potassique [81]. Ces modifications sont responsables d'une régulation d'un certain nombre de gènes en réponse à la LLO, ce qui suggère une place essentielle de la modification des histones dans la reprogrammation des gènes de l'hôte. InIB peut aussi négativement réguler l'acétylation de l'histone 3 (H3K18-deAc), toujours à travers la voie c-Met, PI(3)K/AKT, mais cette fois en favorisant la translocation nucléaire du facteur SIRT2, une désacétylase, ce qui participe ultimement à la colonisation des cellules par *Lm* [129]. Enfin, une nouvelle classe de facteurs de virulence a été mis à jour il y a une dizaine d'années, dont le rôle est centré sur la perturbation des fonctions nucléaires des cellules hôtes; ces facteurs ont donc été nommés nucléomodulines [130]. La première d'entre elles à avoir été découverte chez *Lm* est LntA, qui interagit avec le facteur BAHD1 pour favoriser l'expression des ISG activés par les interférons- λ (type III). En effet, en absence de LntA, BAHD1 active l'hétérochromatinisation des promoteurs de ces ISG, inhibant ainsi leur transcription. En liant BAHD1, LntA permet le relâchement de la chromatine et l'expression des ISG, dont les interférons λ eux-même, provoquant ainsi une boucle de régulation positive [131] (figure 3.16). Enfin, plus récemment a été décrite la nucléomoduline OrfX, caractérisée comme favorisant la survie bactérienne, en stabilisant le facteur de transcription P53 *via* son interaction avec RYBP. Cette interaction permet à la cellule de maintenir un niveau acceptable de ROS [132].

Ainsi, au cours de l'infection, hôte et bactérie se livrent une bataille pour la régulation de la transcription des gènes, en ciblant de nombreux acteurs de régulation et en antagonisant les réponses de l'autre. Toutefois, la régulation de la transcription n'est pas le seul moyen de contrôler l'expression d'un gène, et le dialogue hôte-pathogène peut continuer à d'autres niveaux.

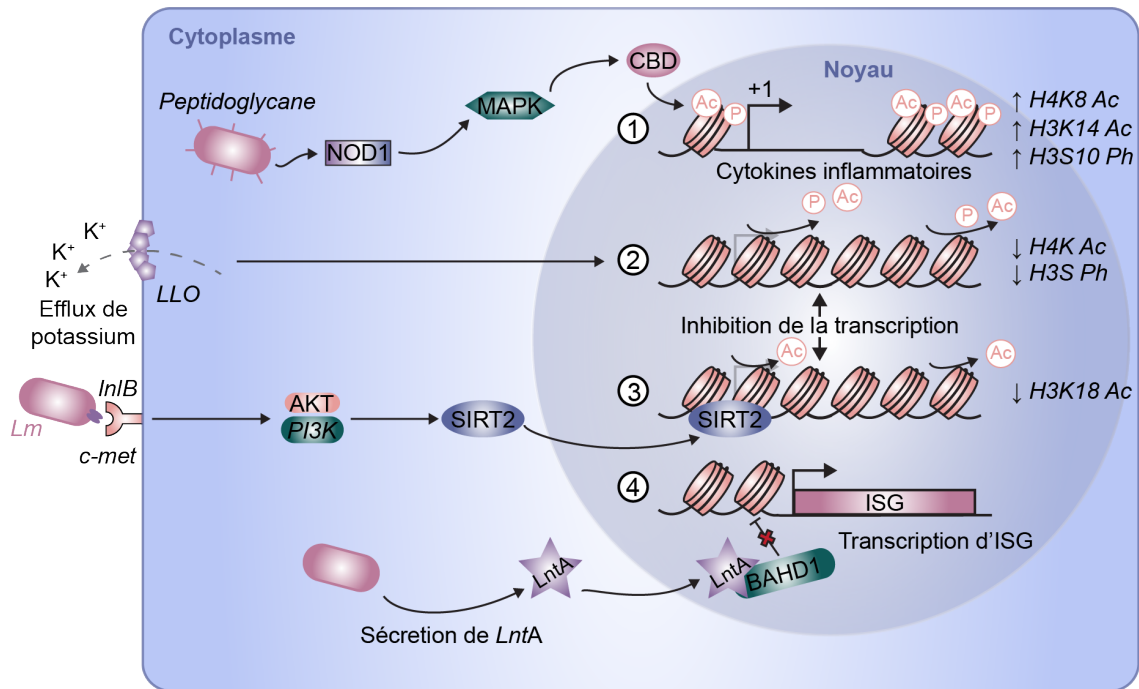


Figure 3.16: Conséquences de l'infection par *Lm* sur la structure de la chromatine. Causes bactériennes sur les modifications post-traductionnelles des histones et leurs conséquences sur l'expression des gènes cibles. A droite en italique sont détaillées les modifications subies par les histones.

3.1.3.2 Régulations traductionnelles

Outre les régulations transcriptionnelles, *Lm* peut interférer avec l'expression des gènes de l'hôte à d'autres niveaux, par exemple une régulation de certains transcrits par la surexpression de micro-ARN (impliqués dans la régulation traductionnelle et/ou la dégradation de transcrits cibles) a déjà été démontrée dans le contexte de l'infection par *Lm* [133,134], vraisemblablement avec un effet anti-inflammatoire pro-bactérien.

Pour mieux caractériser l'impact de l'infection par *Lm* sur l'efficacité de traduction des cellules hôtes, Vinko Besic, alors post-doctorant dans le laboratoire a cartographié les cinétiques de traduction des gènes hôtes [110] en utilisant la technique de profilage des ribosomes (Ribosome profiling ou Ribo-Seq) [135]. Cette méthode consiste à purifier les ribosomes et les ARNm associés, puis à ajouter une ribonucléase qui permet de ne conserver que les régions liées aux ribosomes au moment de la lyse, et renseigne ainsi sur la localisation des ribosomes sur le transcrit lorsque les fragments d'ARN sont séquencés. Vinko a donc réalisé des purifications de ribosomes à plusieurs moments de l'infection (0h, 2h, 5h et 10h) afin de quantifier (i) l'enrichissement des gènes liés aux ribosomes et (ii) l'efficacité de leur traduction, en rapportant l'abondance en Ribo-seq sur celle en RNA-seq. L'analyse de ces données de séquençages a permis de démontrer de fortes perturbations de l'efficacité de traduction dans les temps intermédiaires de l'infection, qui affectent essentiellement des gènes codant des composants de la machinerie de traduction. Des expériences complémentaires à l'analyse ont permis de démontrer que cette réponse à l'infection avait un effet *a priori* bénéfique pour la cellule, puisque la répression par interférence ARN du gène à la traduction la plus touchée par l'infection (PABPC1) en amont de l'infection a un impact négatif sur la croissance de *Lm*. De manière intéressante, c'est encore une fois la LLO qui s'impose comme le facteur de virulence impliqué dans la réorganisation de la traduction, *via* son action inhibitrice sur la voie mTOR, qui a pour conséquence de réprimer l'initiation de la traduction de nombreux ARNm du régulon traductionnel.

Outre l'identification des événements de perturbation de la traduction, le jeu de données généré par le travail de Vinko pouvait être exploité pour étudier un nouveau niveau de régulation des gènes. En effet, les jeux de données RNA-seq classiques, produits en même temps que les Ribo-Seq afin de prendre en compte les variations du transcriptome pour estimer l'efficacité de traduction à partir du traductome, ont été séquencés à l'aide de deux technologies (Illumina pour des lectures courtes et Oxford Nanopore technology pour des lectures longues). Plus de

détails sur ces technologies sont décrits dans la section suivante. Ce double jeu de données s'avère parfaitement adapté à la détection d'évènements de modulation de l'épissage, qui n'ont pas encore été étudiés malgré l'importance croissante imputée à ces régulations fonctionnelles. Pour commencer à étudier ce type de régulation, le double jeu de données produit par Vinko a offert une possibilité d'exploration de l'existence d'éventuels événements d'épissage alternatif au cours de la cinétique d'infection de cellules épithéliales par Lm.

3.2 Maturation des ARN messagers

3.2.1 Cycle de vie d'un ARNm

Les ARN messagers (ARNm) sont la classe de transcrits les mieux connus en raison de leur potentiel codant des protéines fonctionnelles. Leur cycle de vie est assez bien décrit et commence par la transcription d'un locus codant accessible (donc décondensé) sur le génome, par des ARN polymérases, notamment l'ARN polymérase II (figure 3.17 A). Au cours de la transcription, l'ARN est modifié en 5' par l'apposition d'une coiffe, qui consiste en une méthyl-7-guanosine, sur lequel sera recruté un complexe de liaison à la coiffe (Cap binding complexe, CBP) et qui protégera l'ARN de dégradation en 5' [136]. La transcription génère un ARN pré-messager, composé de parties codantes (exons) et de parties non-codantes (introns), ces dernières devant être excisées du transcrit. Pour cela, toujours de manière co-transcriptionnelle, l'ARN sera épissé, afin de rabouter les exons ensemble pour former un transcrit mature et décoré de marques de maturation, comme le complexe de jonction d'exons (EJC) par exemple ou la méthylation d'adénosines, notamment dans les motifs DRACH [137]. Plus de détails sur les mécanismes d'épissage et l'EJC sont décrit plus bas.

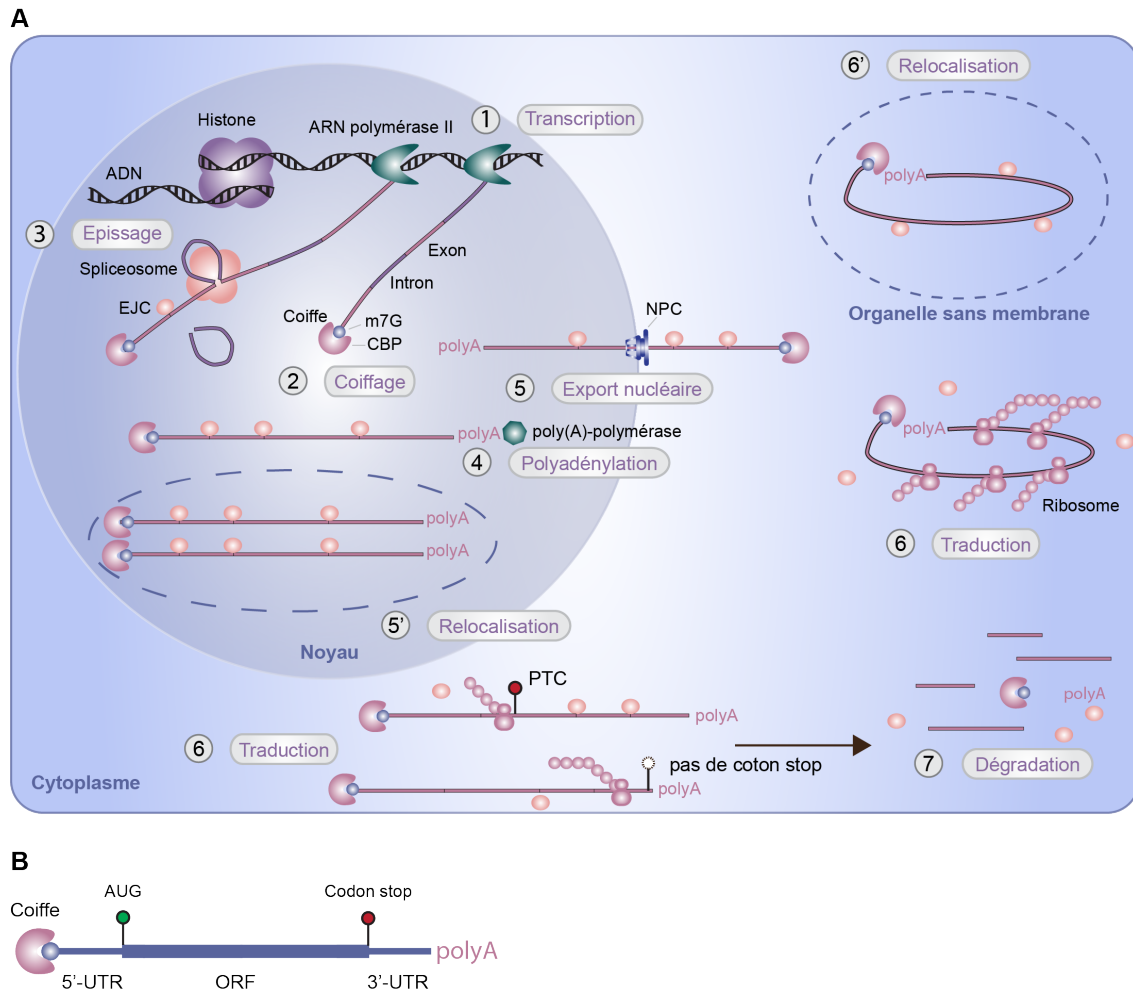


Figure 3.17: Cycle de vie des ARN messagers.(A) Cycle de vie classique d'un ARNm. (B) Structure d'un ARNm.

La structure d'un ARNm mature peut être subdivisée en 3 régions (figure 3.17 B) : la région 5' non-traduite (5'-untranslated region, 5'-UTR) va être reconnue et scannée par le complexe de pré-initiation de la traduction jusqu'à la reconnaissance d'un codon de démarrage AUG, qui marque aussi le début du cadre de lecture ouvert

(Open reading frame, ORF). L'ORF comporte donc la séquence codante du transcrit, traduit en protéine [138] et se termine par un codon Stop (UAA, UAG, UGA). En aval de l'ORF se trouve la région 3'-UTR, qui sert souvent de plateforme de régulation [139]. La longueur des régions UTR est très variable et leur présence dans les transcrits n'est pas ubiquitaire. Enfin, une fois la transcription terminée, le transcrit va être protégé en région 3' par son élongation avec une queue d'adénines (queue poly(A)), apposée par une poly(A)-polymérase [140]. Ces modifications vont favoriser la sortie de l'ARNm vers le cytoplasme [141], où celui-ci pourra être traduit en protéine. Si le transcrit présente des défauts, il sera pris en charge, pendant ou après la traduction, par des systèmes de dégradation de l'ARN [142]. Alternativement, dans certains contextes comme le stress cellulaire, l'ARNm peut être dirigé et séquestré vers des structures cellulaires spécifiques destinées à réguler et stocker certains transcrits ou à adapter la réponse cellulaire à son environnement [143].

3.2.1.1 Epissage

L'épissage correspond au mécanisme d'exclusion d'introns et d'assemblage des exons d'un ARN pré-messager afin d'aboutir à un transcrit mature. Ce mécanisme ayant été central pour mes travaux, je vais le décrire plus en détail dans ce paragraphe (figure 3.18). L'épissage se fait grâce au spliceosome, un complexe composé de 5 ribonucléoprotéines ou RNP (U1, U2, U4, U5 et U6) et d'une centaine de protéines associées. Canoniquement, un intron est délimité par un motif GU en 5' (dans la séquence canonique *CAG GURAGU*), un motif AG en 3' et une adénine appelée point de branchement, suivie d'un motif polypyrimidine. La RNP U1 va d'abord se lier à la séquence consensus en 5', tandis que le facteur SF1 se lie au point de branchement, U2AF2 à la région poly-pyrimidine suivante et U2AF1 au motif AG en 3'. La RNP U2 va ensuite remplacer SF1 au niveau du site de branchement et son interaction avec U1 et les autres protéines va former le pré-spliceosome, ce qui amène les régions 5', 3' et le point de branchement à proximité les uns des autres. Par la suite, le complexe U4-U5/U6 est recruté, ce qui entraîne une suite de changement de composition et de conformation pour former un complexe catalytiquement actif, notamment grâce aux interactions entre U2 et U6, indispensables à la réaction d'épissage. Au cours de l'activation du spliceosome, U1 et U4 vont aussi être exclus du complexe. Deux réactions catalytiques s'ensuivent, la première pour former un complexe comprenant l'exon en 5' libre et l'intermédiaire exon 3'-lariat au niveau du point de branchement et la deuxième qui va assembler les deux exons et libérer l'intron sous forme de lariat. Le spliceosome se désassemble par la suite et est recyclé [144,145]. Le transcrit épissé peut à présent être transporté vers le cytoplasme à travers le pore nucléaire (NPC, nuclear pore complex) pour continuer son existence dans le cytoplasme. Bien que les séquences consensus d'épissage soient déterminées, la majorité des transcrits peut être maturés en plusieurs isoformes avec des sites d'épissage et une composition en exons différente. Ce mécanisme s'appelle l'épissage alternatif et est décrit plus bas.

3.2.1.2 Localisation

La vie classique d'un ARNm consiste donc en sa transcription et maturation nucléaire, de son transport et de sa traduction dans le cytoplasme et enfin de sa dégradation. Outre ce cheminement, il peut aussi être dévié à toute étape vers d'autres compartiments qui gouverneront son expression, notamment vers les organites sans membranes (Membraneless organelles, MLO), qui se forment par séparation de phase liquide-liquide par agrégation de protéines de liaison à l'ARN (RBP) et d'ARN et dont la formation est réversible. [143]. Une fois formées, les MLO vont agir comme des plateformes de recrutement de facteurs de régulation, de catalyse de réaction biochimique ou de séquestration de macromolécules (figure 3.19). Par exemple, les nSB (nuclear stress bodies, corps de stress nucléaires) vont séquestrer la protéine YTHDC1, un facteur de lecture des méthylation de l'ARN, et ainsi influencer l'épissage de nombreux transcrits, sans que le niveau initial de la protéine ne soit diminué [146].

Parmi les MLO impliquées dans la régulation des ARNm, certaines sont nucléaires et ubiquitaires (présentes dans toutes les cellules, indépendamment d'un stress ou de l'activation d'une voie de signalisation donnée), comme les speckles [147], les paraspeckles formés à partir du long ARN non-codant (ARN Inc) NEAT1 [148], et les corps PML (PML bodies) [149]. Bien que les fonctions de ces organites ne soient encore clairement définies, on retrouve beaucoup de gènes transcriptionnellement actifs dans leur périphérie, souvent associés à des loci spécifiques. Dans le cas des speckles, on retrouve aussi une concentration de facteurs de maturation de l'ARN [147], ce qui laisse penser que cette MLO agirait comme un réservoir pour ces facteurs. Globalement, ces MLO agissent comme des nœuds de régulation de la transcription et seraient spécifiques à certains ARNm.

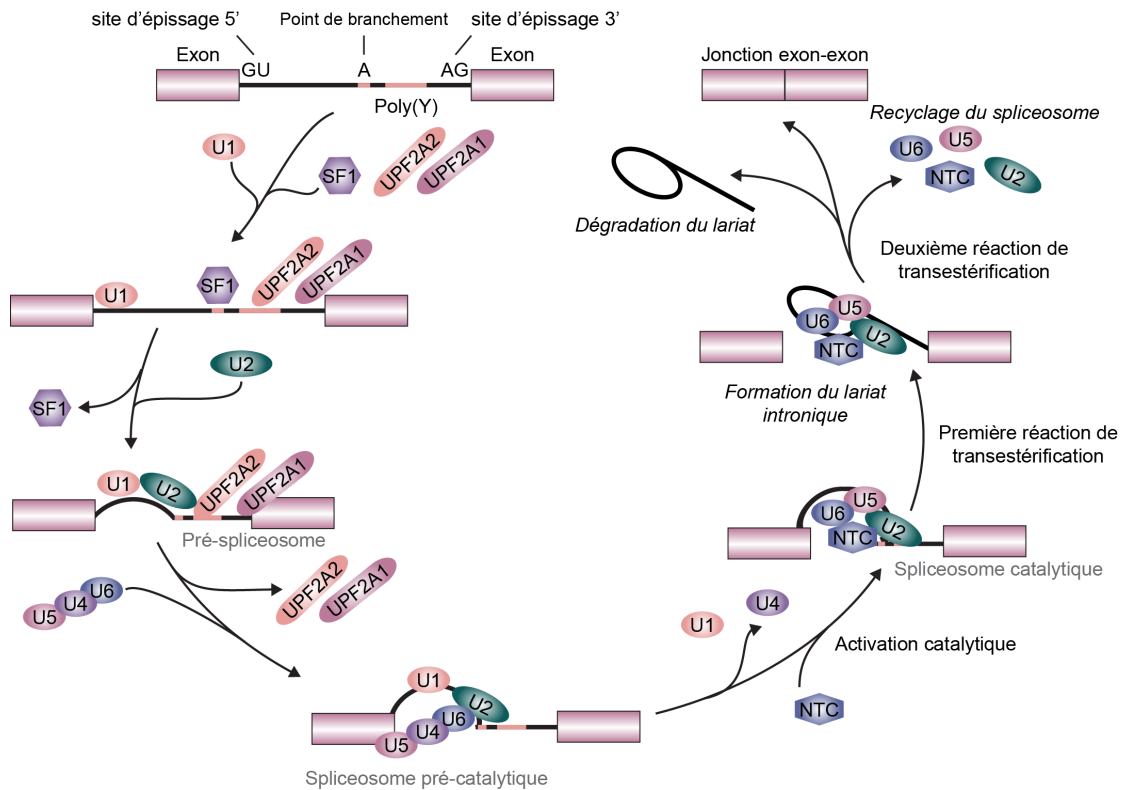


Figure 3.18: Mécanisme d'assemblage du spliceosome. Figure inspirée de Matera *et al.* [144]., et Zhang *et al.* [145]. Localisation des sites d'épissage en 5' (GU), 3' (AG), au point de branchement (A) et à la région poly-pyrimidine (poly(Y)) sur une région intronique et illustration de l'assemblage du spliceosome et de la réaction d'épissage.

D'autres MLO ubiquitaires sont cytoplasmiques comme les processing-bodies (p-bodies) et les domaines TIGER (granule de TIS associée au réticulum endoplasmique, TIS granule-ER). Les p-bodies sont longtemps restés une énigme. En effet, ils ont beau être enrichis en facteurs de dégradation de l'ARN, jusqu'ici aucune étude n'a pu démontrer de dégradation active au sein de ces structures [150]. De plus, ils sont aussi enrichis en ARNm codant des protéines régulatrices peu exprimées en condition basale, ce qui laisse penser à une fonction de stockage de certains facteurs pour participer à l'adaptation des cellules à certains stress [150]. En effet, bien qu'ils soient constitutivement présents en condition de traduction basale, leur nombre augmente aussi en cas de blocage des complexes de pré-initiation de la traduction [151]. Les domaines TIGER, moins connus, forment un hybride entre une MLO, le granule TIS, et la membrane du réticulum endoplasmique impliqué dans la centralisation de la traduction de transcrits riches en AU, du repliement des protéines produites et de leur relocalisation [152].

Enfin, certaines MLO se forment uniquement en cas de stress comme les corps de stress nucléaires (nuclear stress bodies) ou les granules de stress (Stress granules, SG). Les SG se forment sous plusieurs types de stress (UV, stress oxydatif, infections virales et bactériennes, etc.). Ils servent de plateforme de séquestration des RNP, de complexes d'initiation de la traduction et d'ARNm, et favoriseraient ainsi les interactions entre ces molécules. Une hypothèse serait que, dans une situation d'inhibition de la traduction, favoriser l'assemblage de ces granules pourra augmenter la probabilité de traduction de certains facteurs de réponse au stress [153]. Une autre fonction serait la modulation de certaines réactions cellulaires en séquestrant des composants clés, permettant ainsi de modérer certaines réponses cellulaires comme l'apoptose [154,155]. Contrairement aux SG, les nSB sont nucléaires. Ils sont induits en cas de stress chaud, à partir de la transcription de l'ARN Inc HSATIII. Certaines régions de HSATIII vont servir de plateforme de séquestration de RBP, comme les facteurs de régulation d'épissage déphosphorylés, les SRSF (décrits plus bas). Lors de levée du stress, ces facteurs vont pouvoir être rapidement rephosphorylés, *via* le recrutement de la kinase CLK1 dans les nSB et participer à la rétention d'introns de nombreux transcrits, nécessaire à la récupération post-stress [156]. Les nSB affectent l'épissage d'un autre jeu de transcrits *via* la séquestration du facteur de lecture de marque de méthylation de l'ARN YTHDC1, en induisant la méthylation de HSATIII.

L'indisponibilité résultante de YTHDC1 inhibe la méthylation de ses ARN cibles et promeut ici aussi la rétention d'intron [146]. Les nSB participent donc activement à la restauration de l'homéostasie cellulaire après un stress thermique.

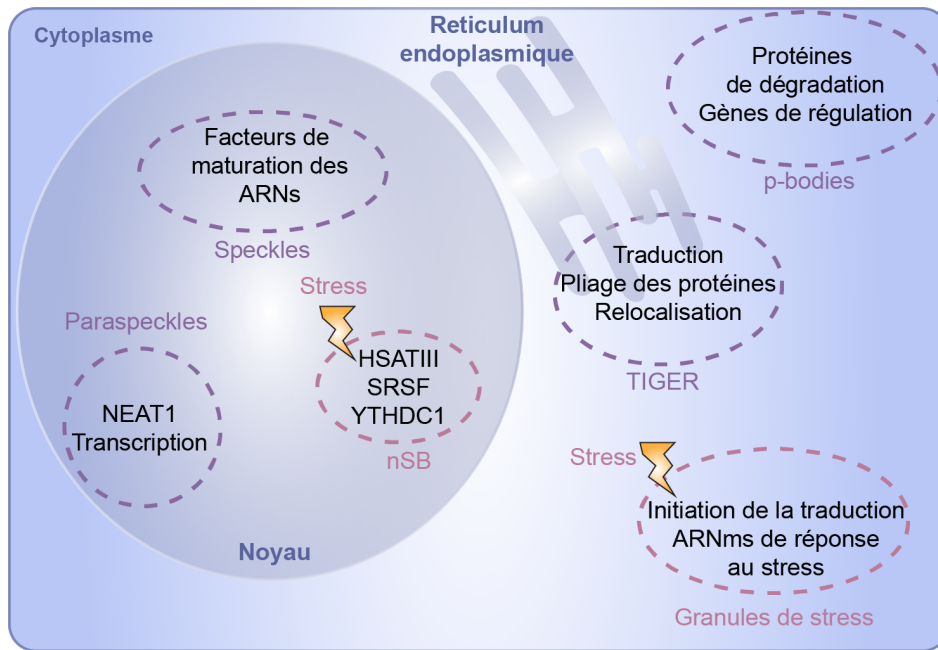


Figure 3.19: Localisation et rôles des organites sans membranes. Les organites sans membranes sont situées dans le noyau ou le cytoplasme et sont constitutivement présentes (délimitation violette) ou formées en condition de stress (délimitation rose). Les fonctions de chaque organite sont décrites dans les bulles correspondantes.

3.2.2 Surveillance de l'intégrité des ARN

3.2.2.1 Le NMD, un système de contrôle qualité de l'ARN

La transcription ou la maturation des ARNm ne sont pas infaillibles et peuvent générer des transcrits incomplets ou aberrants. La traduction d'ARNm de mauvaise qualité peut provoquer l'accumulation de protéines anormales et perturber l'homéostasie cellulaire [157]. Pour éviter cela, il existe des systèmes de surveillance de l'ARN qui ciblent les transcrits de mauvaise qualité pour être dégradés. Il existe de nombreux systèmes de contrôle-qualité de l'ARN, qu'ils soient co-transcriptionnels, post-transcriptionnels ou spécifiques à un certain type d'ARN. Le plus connu est le NMD (Nonsense mediated decay), découvert en 1993 [158]. Ici, je vais détailler les rôles et mécanismes du NMD, un système de dégradation associé à la terminaison de la traduction. Ce paragraphe s'inspire de plusieurs revues, dont celle de Kurosaki *et al.* [159] et Le Hir *et al.* [160], dont les figures sont inspirées ou directement tirées.

3.2.2.1.1 Reconnaissance des ARN cibles du NMD

Initialement identifié comme ciblant uniquement des ARN aberrants portant un codon de terminaison précoce de la traduction (première terminaison codon, PTC), il a récemment été montré que le NMD pouvait aussi cibler des transcrits codants pour des protéines parfaitement fonctionnelles, dans un effort de régulation de l'expression des gènes [161] et impacterait environ 10% des gènes humains [162]. Actuellement, l'activation du NMD est attribuée à un environnement défavorable à la terminaison de la traduction et certaines spécificités de transcrits vont être favorablement ciblées par le NMD [163], comme illustré dans la figure 3.20. Historiquement, la présence d'une jonction exon-exon à plus de 50 nucléotides après le codon stop résultant de l'épissage d'un intron dans la région 3'-UTR a été caractérisée comme indicatrice de la présence d'un PTC potentiel, ce qui constitue un puissant inducteur du NMD [161]. En effet, lors du premier cycle de traduction d'un ARNm, le ribosome dissocie les EJC

de la séquence traduite. En aval de ce codon stop, le maintien d'un EJC sur le transcrite à la suite du premier cycle de traduction sert de plateforme de recrutement de la machinerie du NMD [164] et amplifie l'efficacité de l'activité endonucléolytique de SMG6, une endonucléase dont l'activité initie la dégradation des cibles du NMD [165]. Un long 3'-UTR (>1000 nt) peut aussi favoriser le NMD [166] et concerne 28% des transcrits humains. Le codon UGA est un codon stop qui peut être réassigné dans certains contextes, comme la traduction des sélénoprotéines, à l'ARNt Sec catalysant l'ajout d'une sélénocystéine au peptide naissant plutôt que le recrutement de la machinerie de terminaison de la traduction [167,168]. Dans ces contextes, en présence de sélénocystéine, un élément spécifique (SECIS) à l'incorporation de cet acide aminé rare en aval du codon va permettre sa lecture et l'ajout de la sélénocystéine au polypeptide naissant. En absence de sélénocystéine, le codon UGA est lu comme un codon stop et joue le rôle d'un PTC. Enfin, la présence de petits ORF (uORF) en amont de l'ORF principal peut aussi cibler les transcrits vers la dégradation, car si l'ORF principal n'est pas traduit, ses EJC peuvent persister après la terminaison de la traduction de ce petit ORF [169]. Ces spécificités ne sont toutefois que de indicateurs d'activation du NMD mais ne sont pas universels et il n'est pas possible aujourd'hui de prédire avec certitude quels transcrits sont ciblés par le NMD. Pourtant, il semblerait que l'interaction de PABPC1, une protéine retrouvée dans le complexe de liaison à la queue poly(A) avec un facteur de terminaison de la traduction, eRF3, restreint l'interaction entre UPF1 et eRF3 [170] et donc l'initiation de la dégradation.

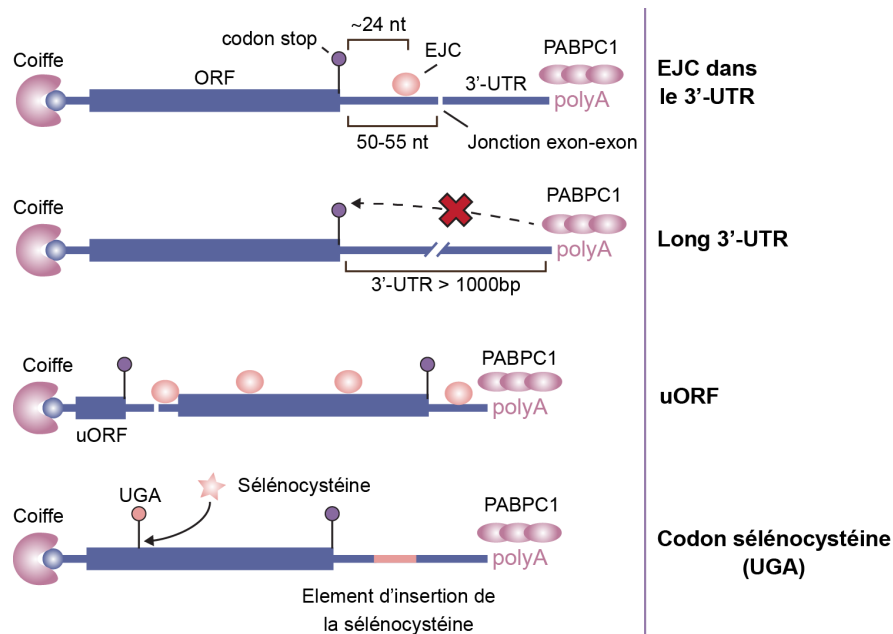


Figure 3.20: Description des types de transcrits ciblés par le NMD. Le NMD peut être activé si sont détectés dans les transcrits la persistance d'un EJC dans le 3'-UTR en raison d'un codon stop prématuré; un long 3'-UTR; la présence d'un petit ORF en amont de l'ORF principal ou la présence d'un codon sélénocystéine (UGA) en absence de sélénocystéine.

3.2.2.1.2 Activation du NMD et dégradation des transcrits

Comme précisé dans le paragraphe précédent, le NMD est souvent associé à la présence d'un EJC après un codon stop. Au cours de l'épissage des ARN, le complexe EJC s'assemble autour des jonctions exon-exon, à 20-24 nt d'écart (figure 3.21). Il est composé d'un cœur de quatre protéines (MAGOH, Y14, eIF4A3 et MLN51) et de facteurs périphériques variables au cours de la vie du transcrite, notamment UPF3 et UPF2 dans le cytoplasme [160]. Fonctionnellement, il intervient dans la translocation cytoplasmique des transcrits [171] et favorise la traduction [172]. D'autres facteurs viennent aussi se déposer sur le transcrite avant sa traduction, dont l'hélicase UPF1, qui est un facteur clé du NMD et sert de plateforme de recrutement des autres facteurs. UPF1 est aussi un marqueur des transcrits cibles car, comme l'EJC, il est déposé sur toute la longueur des ARN (figure 3.21), puis enlevé des transcrits lors du passage des ribosomes. Lors de la terminaison de la traduction, quand le ribosome arrive sur le

codon stop, le facteur eRF1 est recruté dans le site A désormais vide du ribosome en compagnie du complexe eRF3-GTP. L'hydrolyse de la GTP par eRF3 induit un changement conformationnel de eRF1 qui permet au peptide d'être libéré du ribosome [173]. UPF1, qui se retrouve alors enrichi dans le 3'-UTR peut alors interagir avec eRF1 et eRF3 et, dans un contexte NMD-permissif, pourra alors amorcer le processus de dégradation [142].

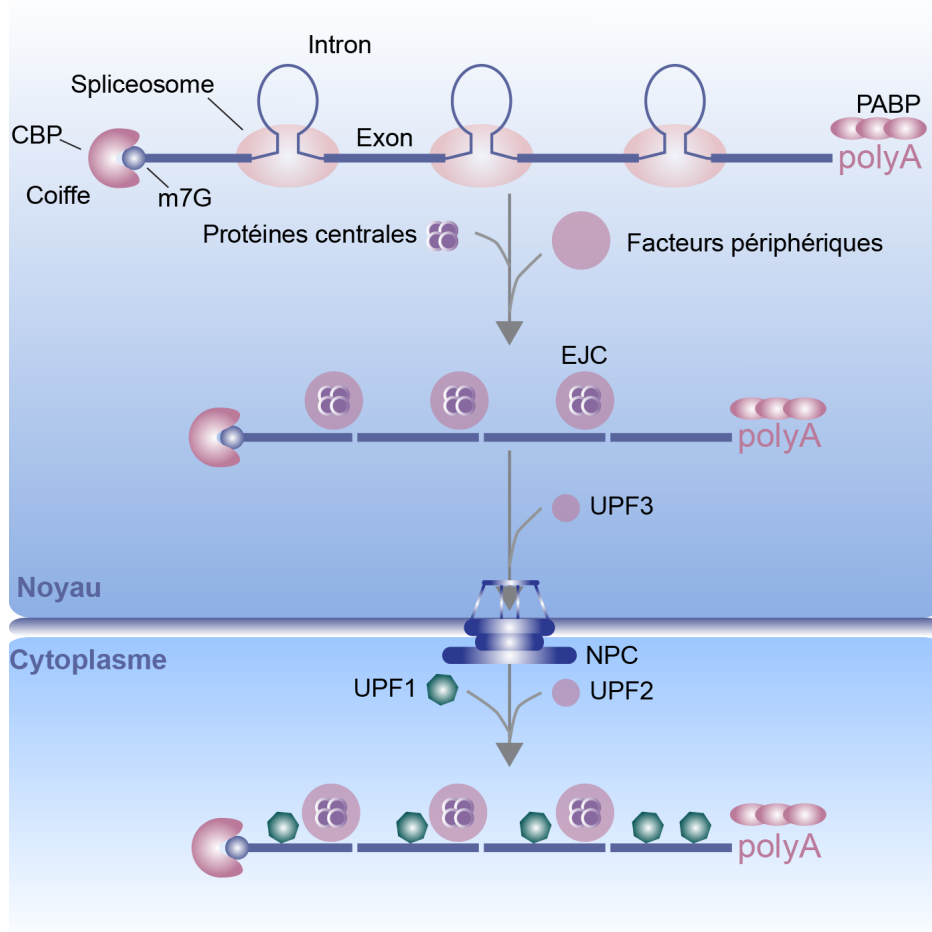


Figure 3.21: Assemblage de l'exon-junction complex (EJC). Figure inspirée de Le Hir *et al.* [160]. Représentation simplifiée de la dynamique d'assemblage de l'EJC sur les nouveaux ARNm et l'apposition de UPF1 .

Si le transcrite est une cible du NMD, par exemple si il possède un PTC et comporte des EJC dans son 3'-UTR, alors UPF1 va s'associer avec sa kinase SMG1 et ses facteurs associés (SMG8 et 9) et avec eRF1 et eRF3 pour former le complexe SURF (figure 3.22). Ce complexe peut alors interagir avec l'EJC *via* UPF2 et UPF3, formant ainsi le complexe DECID (Decay inducing complex), où UPF1 pourra alors être phosphorylé par SMG1 pour sceller définitivement le sort du transcrite et inhiber sa traduction [160]. Le NMD peut aussi être activé de manière EJC-indépendante, notamment si la région 3'-UTR est très longue. Dans ce cas, c'est l'enrichissement en UPF1 sur cette région qui va augmenter la probabilité que la protéine soit phosphorylée [174].

Une fois ce complexe établi, phospho-UPF1 peut directement activer deux voies de dégradation qui vont dégrader les transcrits cibles par deux voies différentes : la voie endonucléolytique et la voie exonucléolytique, qui ciblent essentiellement les mêmes transcrits [161]. Phospho-UPF1 peut donc directement recruter SMG6, une endonucléase qui va cliver l'ARN près du PTC. Le produit de clivage avec une extrémité 5' pourra être dégradé par l'exosome

et l'extrémité de clivage 3' va être désencombrée de ses protéines associées par l'activité hélicase de UPF1 avant d'être digérée par l'exo-ribonucléase XRN1 [159]. Ce mécanisme compose la voie de dégradation endonucléolytique. De plus, phospho-UPF1 va aussi recruter le complexe SMG5/SMG7, qui va à son tour recruter le complexe de dé-adénylation CCR4-NOT, qui va dégrader la queue poly(A) et participer au recrutement du complexe de décoiffage (DCP1a et DCP2). C'est la voie exonucléolytique. Une fois les ARN dégradés, UPF1 est déphosphorylé par PP2A [159] et recyclé.

La question de la redondance des deux voies de dégradation est longtemps restée en suspens. Comme expliqué dans l'introduction de l'article de mon collaborateur Volker Boehm [175], jusque récemment, les deux voies étaient considérées comme redondantes car elles dégradaient les mêmes cibles, mais parallèles dans le sens où l'inhibition de l'une des protéines SMG5/6/7 n'avait qu'un effet partiel sur l'activité de dégradation du NMD. De même, il était suggéré que SMG6 était le facteur de dégradation majeur car c'est l'inhibition partielle de SMG6 qui avait le plus d'effet et que c'était donc la voie endonucléolytique qui était la plus importante pour la dégradation des transcrits. Cependant, dans cette étude, des analyses de transcriptomes dans des cellules modifiées pour ne plus exprimer SMG5, SMG6, SMG7 ou SMG5/7 respectivement, ont démontré que, non seulement les cibles de chaque voie étaient redondantes, mais aussi que le complexe SMG5/7 était nécessaire à l'activation de SMG6 et donc à la dégradation endonucléolytique. Toutefois, la voie de dégradation endonucléolytique semble toujours être la voie majeure de dégradation [175] (figure 3.23). Cet article indique aussi que SMG5 peut maintenir une activité résiduelle de dégradation en absence de SMG7. Ainsi, ces deux voies que l'on pensait parallèles sont en fait étroitement liées et participent ensemble à la dégradation des cibles du NMD.

Le NMD est loin d'être le seul système de surveillance et de dégradation des transcrits. Par exemple, UPF1 gouverne la mise en place de plusieurs autres voies de dégradation, comme le SMD ((STAU)-mediated mRNA decay) ou le HMD (replication-dependent histone mRNA decay) [176] et se place comme un facteur central de surveillance et de maintien de l'intégrité des transcrits. D'autres systèmes de dégradation cytoplasmique de transcrits aberrants liés à la traduction existent aussi, comme le nonstop decay (NSD) spécifique aux transcrits sans codon stop ou le no-go decay, qui s'active dans le cas de ribosomes bloqués sur un transcrit à cause d'une structure secondaire ou de l'absence d'un ARNt concordant au codon [177]. Ces deux mécanismes viennent compléter l'action du NMD pour résoudre d'autres échecs de la traduction.

3.2.2.1.3 Fonctions du NMD

Au-delà de son rôle de dégradation des ARNm, le NMD a aussi été reconnu pour son rôle dans la régulation d'autres classes d'ARN, comme les ARNlnc [178]. Physiologiquement, le NMD est impliqué dans le contrôle des infections virales [179], dans la réponse immunitaire en modulant l'expression de cytokines [180], dans la modulation de la réponse au stress (notamment dans l'ISR, décrite plus haut)[181–183] mais aussi dans le développement et la différenciation cellulaire [184]. Des perturbations du NMD peuvent avoir des conséquences graves sur l'organisme [184]. Si la dégradation des ARN aberrants peut agir comme filet de sécurité contre le développement de certaines maladies comme la β -thalassémie [185], la dégradation systématique des transcrits à PTC aggrave le phénotype de la dystrophie de Duchesne [186]. La production de facteurs du NMD mutés, comme UPF3X est aussi associée au développement de pathologies neurodéveloppementales comme l'autisme ou la schizophrénie [187]. Enfin, le NMD peut intervenir dans le développement de cancers [188], notamment en permettant aux tumeurs de s'adapter à leur micro-environnement [189] ou en compensant les défauts de stabilité génétique par la dégradation des transcrits aberrants en résultant [190]. A l'avenir, il serait intéressant d'arriver à identifier précisément quels ARN sont ciblés par le NMD selon les conditions et les types cellulaires, ce qui, dans un but thérapeutique, permettrait d'établir une signature transcriptomique propre à une condition et mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. En ce sens, des études ont déjà été réalisées sur le ciblage du NMD dans la lutte contre le cancer [191].

3.2.2.2 Différentes classes de transcrits

Un locus d'ADN peut être transcrit en plusieurs types de transcrits, qui peuvent eux-même être maturés de plusieurs manières, notamment par épissage alternatif comme décrit ci-dessous. Ainsi, un gène exprimé de façon canonique sous la forme d'un ARNm peut être maturé dans certaines conditions en un autre type d'ARN non-codant ou

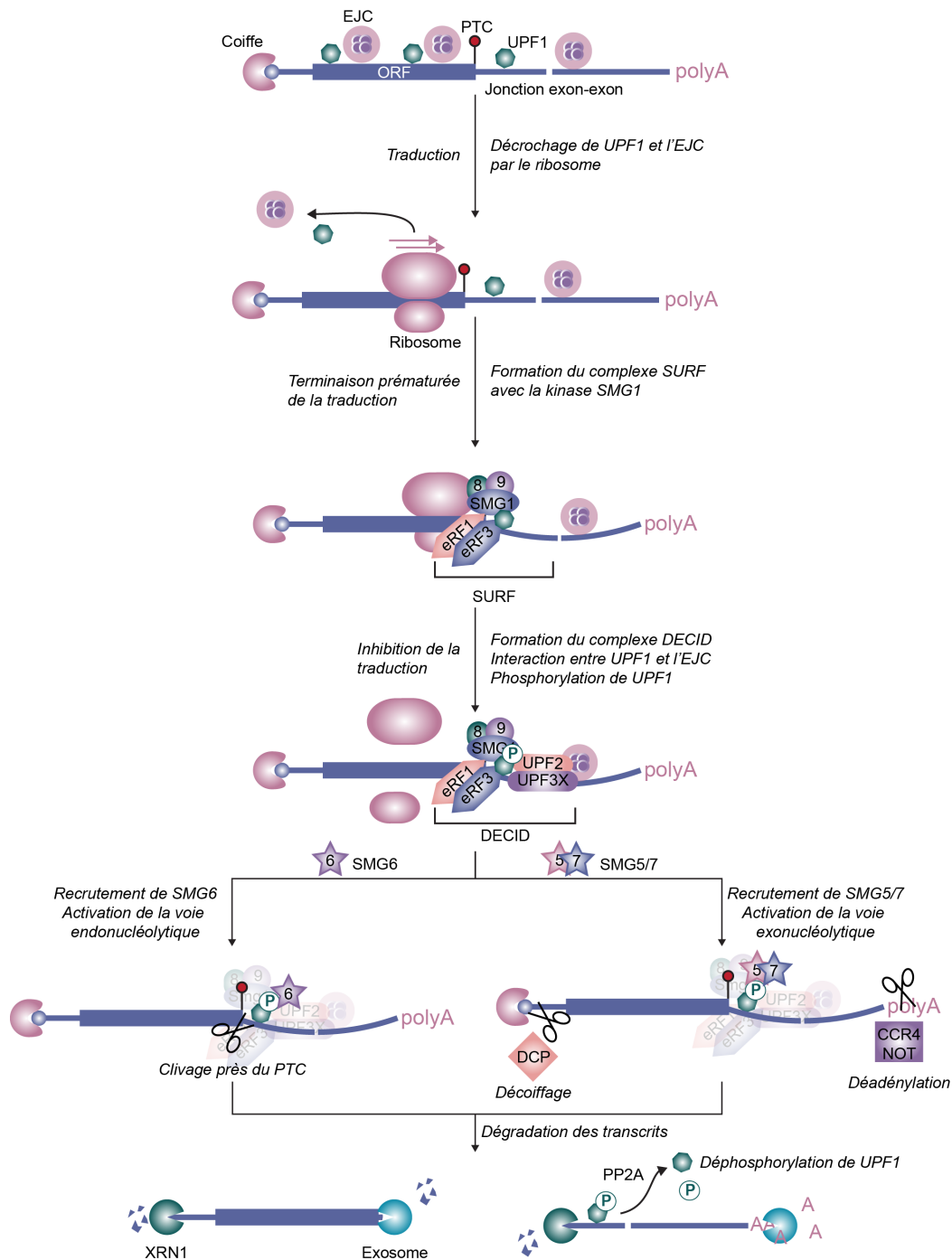


Figure 3.22: Détection et dégradation des ARNm présentant un PTC par le NMD. Figure adaptée de Kurosaki *et al.* [159]. Mécanisme général de détection et dégradation de transcrits comportant un codon de terminaison prématuré par le NMD.

instable. Les produits de transcription et de maturation des ARN sont classifiés selon plusieurs critères selon leurs spécificités biologiques et leurs fonctions, ce qui permet de prédire leur stabilité et leur impact sur l'expression du gène. Les différents types de transcrits sont décrits dans le tableau en annexe 8.2 (tableau 8.2, inspiré de la description des transcrits donnée par la base de données ENSEMBL). Ils y sont classés par catégorie :

- Le groupe “cible de dégradation” contient les types de transcrits qui comportent une spécificité qui va les

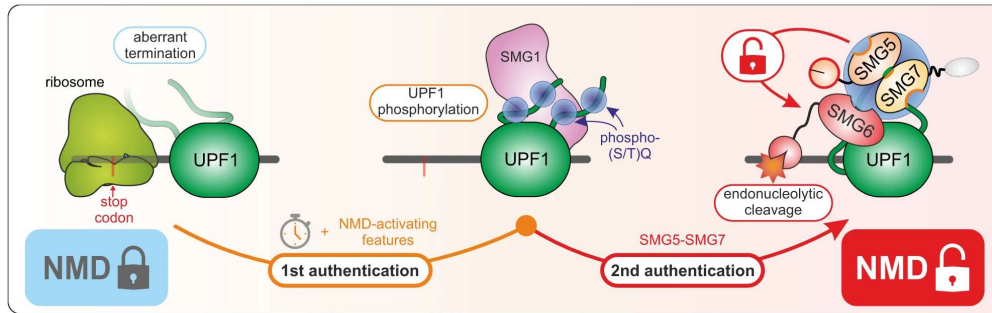


Figure 3.23: Modèle de double authentification des cibles du NMD Figure tirée de Boehm *et al.* [175]. A la suite d'une terminaison précoce de la traduction et de la phosphorylation de UPF1, qui sert de première authentification, le recrutement de SMG5/7 va servir de deuxième clé d'activation du NMD.

rendre sensibles à la dégradation par un système de surveillance de l'ARN, comme le nonsense mediated decay ou le nonstop decay, décrit plus bas.

- Le groupe ARNinc (long non-coding, long non-codant) contient les transcrits non-codants de plus de 200 bp.
- Le groupe ARN non-codant contient les transcrits non-codants de moins de 200 bp.
- Le groupe "codant" contient les transcrits pour lequel un ORF actif a été détecté.
- Le groupe "pseudogène" contient les ARN homologues à des transcrits codants mais pour dont l'ORF a été perturbé par une insertion ou une délétion. Il se pourrait que ces pseudogènes soient issus d'une duplication du gène parent suivi d'une perte de fonction. La classification des pseudogènes en "processed" ou "unprocessed" dépend de la présence d'intron.

3.2.2.1 La notion de transcrit canonique

En moyenne, un gène humain possède 3,4 transcrits [192]. Souvent, dans le cas d'analyses bio-informatiques d'un jeu de donnée de séquençage d'ARN, il est nécessaire de pouvoir se référer à un transcrit représentatif du gène principal de séquence connue. Toutefois la définition de transcrit de référence n'est pas encore unifiée à travers les bases de données. Par exemple, pour la base de données UCSC, le transcrit canonique est celui qui possède le plus long domaine codant (CDS) si le gène est codant, sinon, le plus long transcrit. Pour la base de données APPRIS, c'est le transcrit avec la meilleure annotation fonctionnelle ou celui exprimé dans la majorité des tissus mais aussi le plus conservé [193]. Enfin, la base de données ENSEMBL a établi sa définition du transcrit canonique comme étant le plus conservé, le plus exprimé, avec la plus longue séquence codante, avec un potentiel fonctionnel et des concordances avec la base de données APPRIS et la protéine de référence pour le gène dans la base de données UNIPROT. Ainsi, la notion de transcrits canoniques peut être adaptée aux besoins des analyses qui en dépendent, en fonction d'un besoin de longueur et couverture du transcrit ou de pertinence biologique. Par exemple, dans le cas de CIRBP, dans la base de données ENSEMBL, c'est le transcrit CIRBP-214, qui code pour un isoforme protéique de 297 AA, qui est désignée comme canonique, alors que souvent minoritairement exprimée par rapport à une protéine de 172 AA. Toutefois, dans la base de données APPRIS, c'est le transcrit CIRBP-201, qui code une protéine de 172 résidus, qui est désigné comme canonique car il a le plus haut score APPRIS et le meilleur score TSL (transcript support level), une méthode destinée à identifier les transcrits avec des jonctions exons-exons expérimentalement validées.

3.2.3 Régulation de l'expression des gènes par épissage alternatif

3.2.3.1 Fonctions et mécanismes de l'épissage alternatif

L'avènement des études transcriptomiques a permis de mettre à jour la complexité du transcriptome humain. Au-delà de la transcription et traduction des quelques 20 000 gènes codants des protéines, il existe un mécanisme appelé épissage alternatif (Alternative splicing, AS), qui permet de multiplier le nombre de transcrits différents, produits à partir d'un même gène et altérant éventuellement les fonctions du produit. Ce mécanisme essentiel repose sur le réarrangement des introns et des exons en de multiples combinaisons, ce qui résulte en la production

de divers transcrits (isoformes) pour un même gène. Ces isoformes participent à la régulation de l'expression du gène : en codant différentes protéines, en n'étant pas codantes, en ayant des différences de stabilité ou même en ayant des fonctions différentes. En moyenne, chaque gène codant possède 11 exons [194] et l'épissage alternatif toucherait jusqu'à 95% des gènes [195]. C'est un mécanisme co-transcriptionnel, dépendant du type cellulaire mais aussi de la condition dans laquelle se trouve la cellule ; par exemple, il peut intervenir dans la réponse à certains stress [196,197].

Pour orchestrer le sort des exons au cours de ce mécanisme co-transcriptionnel, de nombreux facteurs entrent en jeu, tant en cis qu'en trans, en tant que régulateurs d'épissage et ils seront décrits dans ce paragraphe. Concernant les types d'épissage, on retrouve les exclusions d'exon et inclusions d'intron, les sites d'épissage alternatifs en 5', où une partie 3' d'un exon va être épissée, les sites d'épissage alternatifs en 3', où une partie 5' d'un exon va être épissée, l'utilisation d'exons mutuellement exclusifs, c'est-à-dire qui ne seront jamais raboutés dans un même transcrit ou encore l'utilisation de sites de polyadénylation alternatifs, ce qui va donc impacter la structure du transcrit dans son ORF, ses régions 5'- et 3'-UTR et son site de polyadénylation (figure 3.24). Certains exons, appelés exons constitutifs, sont systématiquement présents dans le transcrit.

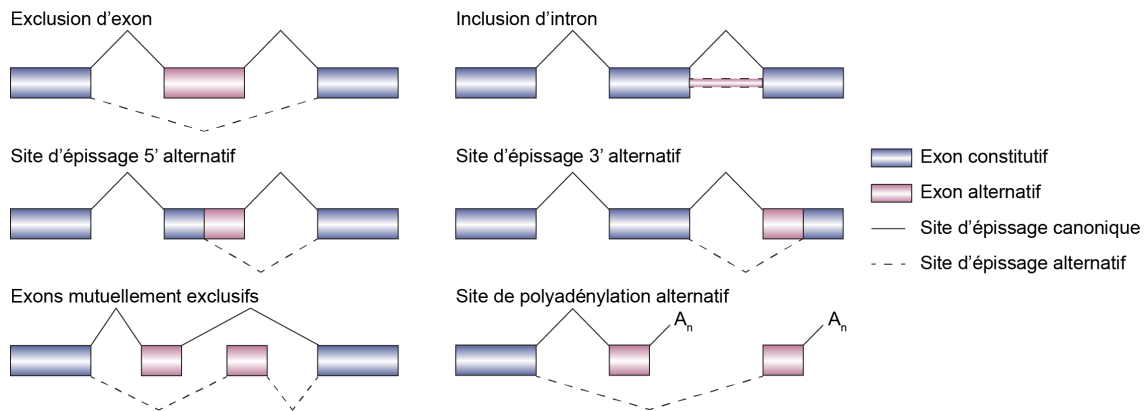


Figure 3.24: Les différents types d'évènements d'épissage alternatif. Les évènements d'épissage alternatifs peuvent être classés selon le résultat de la réaction. En bleu sont représentés les exons constitutifs, en trait plein les jonctions canoniques et en rose et trait pointillé, les exons et jonctions alternatifs. Les transcrits sont représentés dans le sens 5'-3'.

3.2.3.2 Facteurs de régulation de l'épissage

3.2.3.2.1 Facteurs cis et trans

Outre les frontières introniques décrites ci-dessus, il existe aussi d'autres types de séquences régulatrices, appelées des éléments régulateurs d'épissage (Splicing regulatory element, SRE). Il en existe 4 types, répartis soit dans les exons soit dans les introns :

- Les exhausteurs d'épissage d'exons (Exon splicing enhancer, ESE)
- Les inhibiteurs d'épissage d'exons (Exon splicing silencer, ESS)
- Les exhausteurs d'épissage d'introns (Intron splicing enhancer, ISE)
- Les inhibiteurs d'épissage d'introns (Intron splicing silencer, ISS)

Ces SREs sont reconnus par des protéines de liaisons à l'ARN (RNA-binding protein, RBP) qui vont définir le sort de l'exon ou de l'intron. Il existe deux principales classes de RBP régulatrices d'épissage ; les hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoparticles) et les SRSF (Serine/Arginine splicing factors) (figure 3.25).

Les hnRNP sont au nombre de 23, [198], dont CIRBP (hnRNP A18), RBMX (hnRNP G) ou encore PTBP1 (hnRNP I), et beaucoup appartiennent à la sous famille des protéines RGG décrites plus bas. Outre la régulation de l'épissage, les protéines RGG sont aussi impliquées dans des mécanismes comme la régulation de la transcription

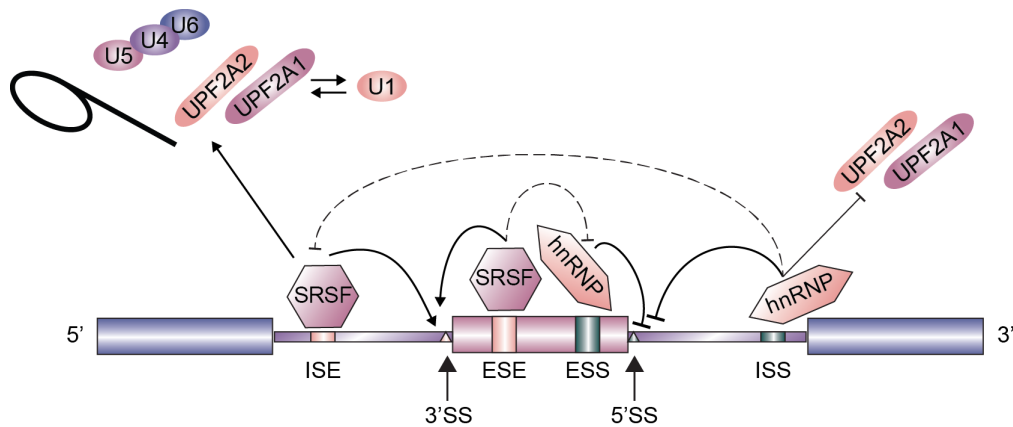


Figure 3.25: Régulateurs cis et trans de l'épissage alternatif. Figure adaptée de Kornblihtt *et al.*, [242]. Les éléments cis promouvant l'inclusion d'un exon (ESE et ISE) sont liés par les protéines SRSF, qui favorisent le recrutement et l'activité du spliceosome. Les éléments promouvant l'exclusion des régions (ESS et ISS) sont liés par les hnRNP et vont directement empêcher la liaison de facteurs d'épissage au transcrit. Les mentions 5'SS et 3'SS correspondent aux sites d'épissage (splice site) en 5' et 3' d'un exon.

et de la traduction, et la stabilisation des ARNm. Elles lient les ESS et ISS et favorisent l'exclusion des exons, notamment en empêchant l'accès de U2AF1 à la région poly-pyrimidine [199], de U1 au site d'épissage 5' [200], en antagonisant l'activité des protéines SR [201] et en déstabilisant l'interaction entre U1 et U2AF1/2 [202].

Les protéines SRSF sont au nombre de 12 [203] et m'ont particulièrement intéressé au cours de ma thèse. Très conservées [204], elles sont composées d'un domaine de liaison à l'ARN et d'un domaine SR riche en sérine et en arginine, qui sert de plateforme d'interaction protéine-protéine [205,206]. Certaines SRSF (SRSF1, SRSF2, *etc.*) participent à la réaction d'épissage canonique, en promouvant l'interaction entre U1 et U2, mais leur présence ne semble pas obligatoire [207]. Originellement, il a été décrit que les SRSF étaient recrutés au niveau des ESE et ISE et promouvaient donc l'inclusion des exons, en augmentant la sensibilité de reconnaissance du site d'épissage [196], en stabilisant l'interaction entre U1 et U2AF1/2 [208,209], en inhibant l'action antagoniste des hnRNP liés sur les ISS [210], et en favorisant le recrutement du complexe U4/5/6 [211] et la formation du lariat [205].

Le modèle manichéen des fonctions des hnRNP et des SRSF a été revu par la suite, notamment en démontrant que des protéines SRSF pouvaient aussi empêcher l'épissage d'une région [212], et que l'action de ces RBP dépend de leur position par rapport au site d'épissage. En effet, par rapport à un site d'épissage en 5', une SRSF intronique a un effet répressur sur l'épissage du site, et *a contrario*, une hnRNP exonique peut l'activer en favorisant le recrutement du spliceosome [213]. Pour les SRSF, il a aussi été démontré que leur liaison dans un exon alternatif promeut son inclusion, mais si elles se lient dans un exon constitutif adjacent à un exon alternatif, ce dernier sera plutôt exclu [214]. En plus d'antagoniser les fonctions des hnRNP, les protéines SRSF sont aussi en interaction et en compétition entre elles pour la liaison à l'ARN [215]. Au-delà de leur fonction de régulation de l'épissage alternatif, les protéines SRSF sont aussi impliquées dans la modulation de l'architecture chromatinienne par modification des histones, l'export et la stabilité des ARNm, la transcription, la progression du cycle cellulaire et la régulation de la traduction [207].

3.2.3.2.2 Régulation des SRSF par modifications post-traductionnelles

Une manière de moduler l'activité des SRSF se fait par les modifications post-traductionnelles. Si leur méthylation ou acétylation ont été décrites [207], c'est surtout la phosphorylation réversible de leur domaine SR qui impacte leurs fonctions [216]. En effet, leur phosphorylation est nécessaire pour promouvoir l'assemblage du spliceosome, tant pour empêcher les interactions du domaine SR avec l'ARN [217], que pour favoriser les interactions avec U1 [218]. Étonnamment, une phosphorylation persistante des protéines SRSF va empêcher la catalyse de l'épissage; une étape de déphosphorylation est donc nécessaire [219]. Plus récemment, il a même été montré que c'était le degré de phosphorylation qui conditionnait la progression du mécanisme d'épissage si associé avec des protéines SRSF. Par exemple, la phosphorylation partielle de SRSF1 est corrélée à une meilleure liaison à l'ARN et la phosphorylation

graduelle de SRSF1 favorise son interaction avec U1 [220]. Un phénomène semblable a été démontré par la suite pour SRSF10, dont la déphosphorylation en cas de stress chaud induit une répression de l'épissage de ses ARN cibles [221] (figure 3.26 A).

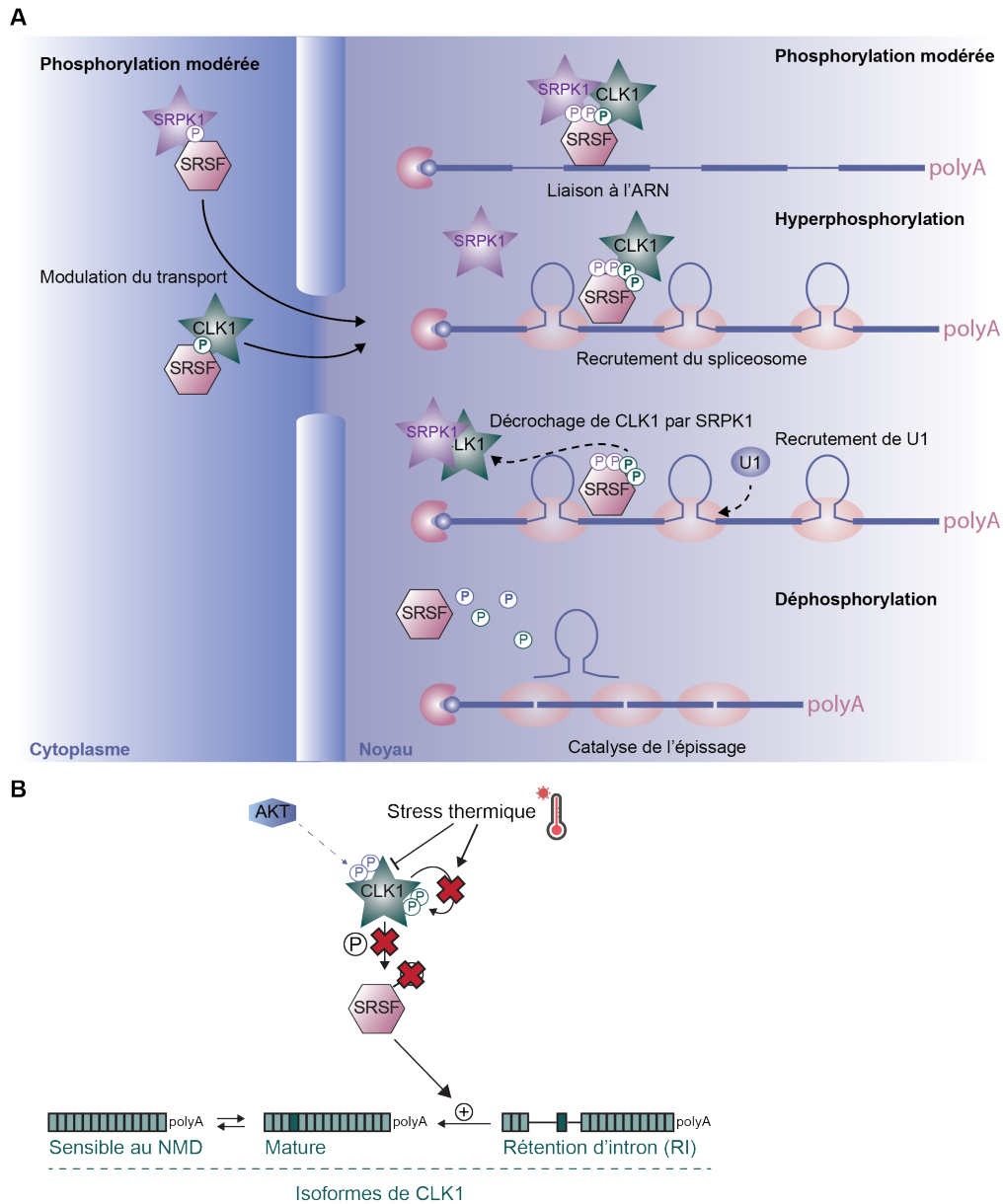


Figure 3.26: Régulation des facteurs d'épissage par les kinases CLK1 et SRPK1. (A) Les kinases CLK1 et SRPK1 participent à la régulation de l'épissage par phosphorylation graduelle des SRSF, modulant ainsi leur localisation cellulaire, leur liaison à l'ARN et le recrutement de facteurs du spliceosome. SRPK1 participe aussi au décrochage de CLK1 du complexe d'épissage pour catalyser la réaction. (B) Régulation de l'activité de CLK1. En cas de stress chaud, l'activité kinase de CLK1 est inhibée, provoquant sa déphosphorylation et celle des SRSF cibles de CLK1, ce qui impacte l'épissage de l'ARNm de CLK1, favorisant l'accumulation d'un isoforme mature au dépit d'un isoforme non-codant (RI). Il existe aussi constitutivement un isoforme NMD-sensible de CLK1. CLK1 peut aussi être phosphorylée par AKT .

Deux familles principales de kinases ont été identifiées comme phosphorylant les protéines SRSF, la famille des SRPK (Serine Arginine protein kinase), en particulier SRPK1 [222] et les kinases CLK (Cdc2-like kinase), en particulier CLK1 [223]; qui co-localise avec les SRSF dans le noyau. L'activité de ces kinases influe en particulier

sur la localisation cellulaire des protéines SRSF. Les spécificités des protéines CLK sont décrites dans un article de Martin-Moyano *et al.* [224], je concentre ici sur CLK1. Cette kinase va directement phosphoryler SRSF1, SRSF2, SRSF4, SRSF5, SRSF6 et SRSF10 et moduler leur action [225]. De manière intéressante, cette kinase est elle-même régulée par des événements d'AS. Initialement, deux isoformes de CLK1 ont été détectés, l'un codant pour un transcrite mature, l'autre épissé sans l'exon 4, codant donc une protéine tronquée non-fonctionnelle [226]. Au cours du stress chaud, CLK1 subit une déphosphorylation, entraînant ainsi une perte de fonction et donc de déphosphorylation des protéines SRSF. Parmi les altérations d'épissage résultantes, on trouve l'ARNm de CLK1, qui subit une reprise de l'épissage : un isoforme non-codant ayant retenu les introns 3 et 4 et séquestré dans le noyau se retrouve épissé, donnant lieu à l'isoforme codant mature. En réponse à la levée du stress, ce jeu d'isoformes fonctionnels va pouvoir être rapidement traduit pour rétablir le taux de phosphorylation des protéines SRSF, notamment SRSF4 et 10 [227] (figure 3.26 B). CLK1 est donc centrale dans un réseau complexes de régulations, où son auto-régulation s'interconnecte avec des boucles de régulations de ses cibles. De plus, une fois ses cibles phosphorylées, CLK1 nécessite l'intervention de SRPK1 pour défaire son interaction avec les SRSF et permettre la progression du mécanisme d'épissage [228] (figure 3.26 A). Outre son activité d'autophosphorylation, CLK1 est aussi directement phosphorylée par la sérine/thréonine kinase AKT en réponse à l'insuline [229]. Cette phosphorylation pourrait avoir lieu dans d'autres contextes; il serait judicieux de déterminer si les liens entre stress, AKT, CLK1 et épissage sont généralisables (figure 3.26 B). Concernant AKT, il a aussi été montré que la kinase GSK3- β , mentionnée dans le contexte du paragraphe sur CIRBP, est inhibée par AKT en réponse à l'activation des récepteurs de lymphocytes T et pourrait aussi influencer sur l'épissage de centaines de gènes, notamment en phosphorylant SRSF2 [230]. Enfin, l'activité de CLK1 et des SRSF a directement été liée à la régulation de CIRBP, toujours dans le contexte du stress chaud [197].

3.2.3.2.3 Régulation des SRSF par épissage alternatif

Outre la régulation de l'activité des SRSF, leur expression est modulée par l'expression d'isoformes alternatifs. Effectivement, chaque SRSF comporte des éléments ultra-conservés, qui sont utilisés comme "exon-cassette" ou "exon-poison", ou comme intron retenu au cours événements d'AS (Tableau 3.2). Pour 8 SRSF sur 12, l'isoforme alternatif comporte un codon stop prématuré (PTC) et 3 d'entre eux auto-régulent leur épissage en faveur des isoformes alternatifs. Les 4 autres subissent des modifications de leur 3'-UTR, conduisant à l'inclusion de nouvelles jonctions exon-exon dans cette région. Tous ces isoformes sont donc sensibles à la dégradation par le NMD, ce qui permet de maintenir un haut taux de production des transcrits tout en modérant l'expression des SRSF pour la garder constante, et permet donc une adaptation rapide de l'expression des SRSF au contexte cellulaire [231]. Par exemple, en cas de stress hypoxique, l'épissage alternatif de SRSF6 en faveur de l'inclusion de l'exon-poison va permettre la mise en place d'une réponse de stress bénéfique à la cellule [232]. Les hnRNP subissent des régulations similaires par la présence d'éléments ultra-conservés [233]. Dans le contexte du modèle présentant les SRSF comme des inducteurs d'épissage et les hnRNP comme des inhibiteurs d'épissage, il a été montré qu'une activation de l'épissage favorisait les isoformes à PTC chez les SRSF, alors qu'une répression de l'épissage allait favoriser celles chez les hnRNP [234]. Ces boucles de régulations permettent ainsi de stabiliser l'expression des gènes et des régulateurs d'épissage en réponse à des changements environnementaux.

3.2.3.2.4 Rôle des modifications de l'ARN, accessibilité et structures secondaires dans l'épissage alternatif

Des mécanismes de régulations additionnels de l'AS ont aussi été décrits. Par exemple, des marques d'édition du transcrite naissant comme la pseudouridinylation, les 5-méthylcytosine ou les conversions d'adénine vers inosine ont toutes un impact sur l'inclusion des exons [235]. La méthylation des ARN est la modification la plus étudiée. Apposée par de nombreux facteurs [236], la méthylation de l'ARN va ensuite être reconnue par des protéines de lecture (m6A-reader), dont YTHDC1, qui va directement interagir avec SRSF3 et antagoniser la liaison de SRSF10 à l'ARN pour promouvoir l'inclusion d'exons [237]. Une marque de méthylation peut aussi directement recruter hnRNP C et impacter l'épissage de ses cibles [238] (figure 3.27 A).

Les interactions entre les bases au sein d'une molécule d'ARN peuvent provoquer la formation de structures secondaires et tertiaires, qui peuvent alors servir de signalisation pour réguler l'AS. Par exemple, les quadruplexes de G vont permettre le recrutement de hnRNP F et fortifier l'inclusion de l'exon associé [239] (figure 3.27 B). Les

Nom	Domaine	Cible	Fonction cellulaire	Epissage alternatif
SRSF1	RRM + RRMH + SR	Cycline D1 CASP9 BIN1	Prolifération Invasion Migration Apoptose	A3SS
SRSF2	RRM + SR	Caspase8 Bcl-x MCL1 Survivin	Apoptose	A3SS
SRSF3	RRM + SR	MCL-1 SRSF3	Apoptose Epissage	Exon poison
SRSF4	RRM + RRMH + SR	Caspase8	Apoptose	Exon poison
SRSF5	RRM + RRMH + SR	MCL-1	Apoptose	Exon poison
SRSF6	RRM + RRMH + SR	BIM	Apoptose	Exon poison
SRSF7	RRM + ZnF + RRMH	Tau SRSF7	Cytosquelette Epissage	Exon poison
SRSF8	RRM + SR	Fas	Apoptose	A3SS
SRSF9	RRM + RRMH + SR	β -caténine	Signalisation	RI
SRSF10	RRM + SR	BCLAF1	Apoptose	Exon poison + A5SS
SRSF11	RRM + SR	Tau	Cytosquelette	Exon poison
SRSF12	RRM + SR	Inconnu	Inconnu	ATSS + exon poison

Table 3.2: Description des structures, régulation et fonctions des protéines SRSF.

structures en tige-boucle ont un effet semblable: lorsqu'elles ont positionnées à proximité d'un exon cassette, elles favorisent le recrutement du spliceosome et l'inclusion de l'exon [240] (figure 3.27 C). L'état de la condensation de la chromatine peut aussi impacter l'épissage. En effet, une chromatine compacte (caractérisée par l'état désacétylé des queues d'histones) va diminuer la vitesse d'élongation de la polymérase, ce qui donne le temps au spliceosome de s'assembler aux sites d'épissage faibles et donc de promouvoir l'inclusion d'exons. Si les histones sont acétylées, l'élongation sera beaucoup plus rapide et seuls les sites forts d'épissage seront utilisés par le spliceosome (figure 3.27 D). En plus de réguler les modifications d'histones, il est suggéré que les histones dé-acétylases (HDAC) modifient d'autres cibles impliquées dans l'épissage et participeraient d'autant plus à la régulation de l'expression des gènes [241].

Enfin, comme l'épissage est un mécanisme co-transcriptionnel, le spliceosome et l'ARN polymérase II sont physiquement rapprochés et amenés à interagir, de même qu'avec d'autres facteurs d'épissage, généralement avec la queue C-terminale de la pol II (CTD, carboxy-terminal domain) [242]. Ainsi, l'interaction de la pol II avec le spliceosome va favoriser le recrutement de RBP régulatrices et diminuer l'inclusion d'exons alternatifs (figure 3.28 A). La présence d'obstacles sous la forme de complexe protéiques (roadblocks) sur l'ADN va ralentir la processivité de la pol II et ainsi promouvoir l'inclusion d'exons (figure 3.28 B), similairement à la condensation de la chromatine. Au contraire, l'interaction de la pol II avec le facteur DBIRD va accélérer l'élongation de l'ARN naissant et donc ne

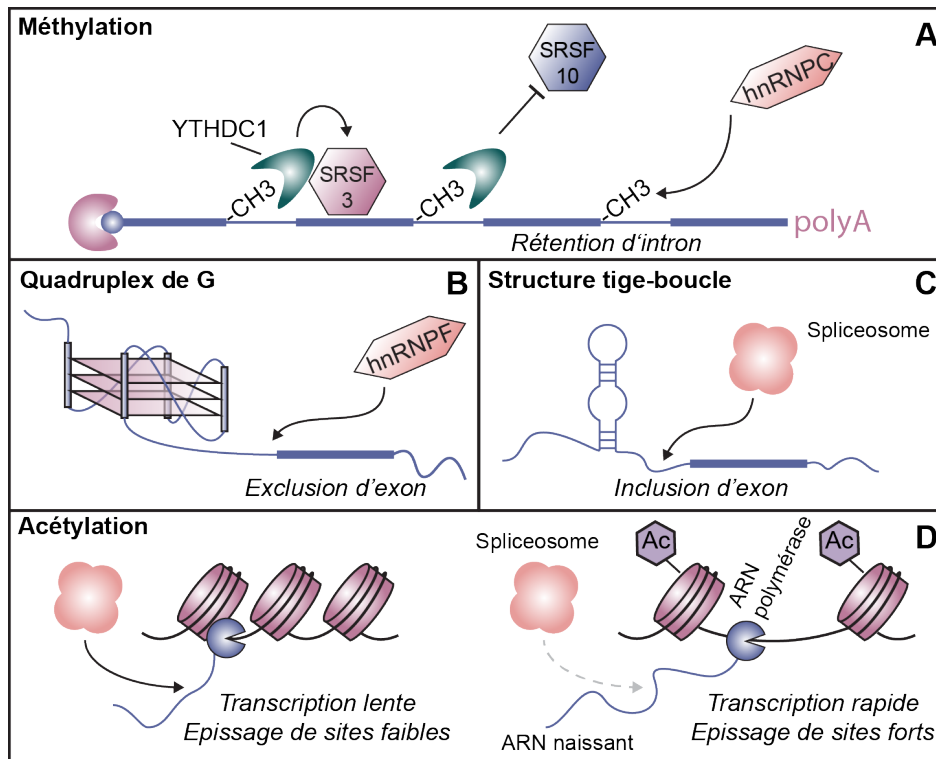


Figure 3.27: Régulation de l'épissage par modification des acides nucléiques. L'épissage d'un exon peut être directement modulé par des modifications de l'ARN, comme (A) la méthylation qui va favoriser la rétention d'intron, l'interaction avec SRSF3 et hnRNP c et l'inhibition de la liaison de SRSF10 à l'ARN. Les structures secondaires de l'ARN sous la forme de tige-boucle (B) ou de quadruplex de G (C) vont favoriser l'exclusion d'exon. L'acétylation des histones (D) va impacter la condensation de la chromatine et l'élongation des transcrits naissants, modulant la cinétique de la transcription et de l'épissage.

garder que les site forts d'épissage (figure 3.28 C). Enfin, des perturbations environnementales, comme la présence d'UV peuvent induire une hyper-phosphorylation du CTD [243], ce qui ralentit l'élongation et favorise l'inclusion d'exons alternatifs [242] (figure 3.28 D).

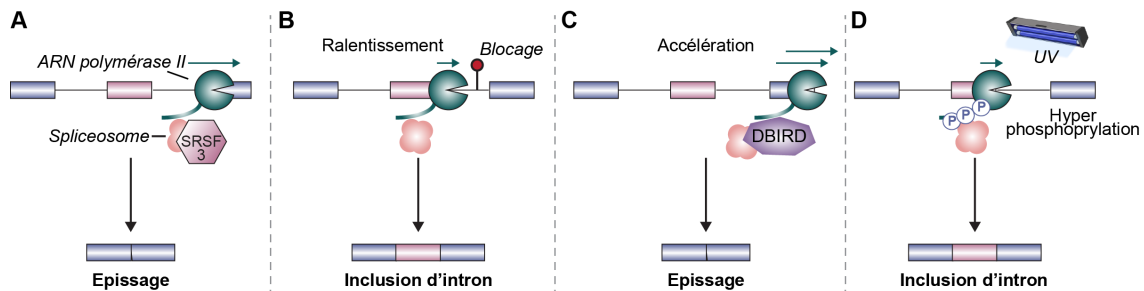


Figure 3.28: Interférence de la transcription avec l'épissage. Figure adaptée de Kornblihtt *et al.* [242]. Le spliceosome et la queue de l'ARN pol II peuvent interagir. (A) La présence de SRSF3 favorise l'exclusion d'exon. (B) La présence d'obstacle physique sur la région transcrite ralentit la vitesse d'élongation de l'ARN naissant et promeut l'inclusion d'exon alors que l'accélération de l'élongation par le facteur DBIRD (C) favorise l'exclusion d'exon. (D) L'hyperphosphorylation de la queue de l'ARN pol II par des UV va ralentir la vitesse d'élongation et promouvoir l'inclusion d'intron.

3.2.3.3 Enjeux nouveaux

Le travail réalisé ces dernières années sur la place de l'épissage alternatif dans le contrôle de l'expression des gènes a permis de mettre à jour une strate additionnelle de régulation, qui fait intervenir des réseaux complexes d'interactions entre des molécules comme l'ADN, l'ARN et les protéines, mais aussi entre mécanismes, à travers le couplage entre transcription, épissage et modification post-transcriptionnelles. L'épissage alternatif est aussi un mécanisme clé dans la diversification des macro-molécules produites, en multipliant le nombre de produits exprimables à partir d'un seul ARN pré-messager. La perturbation d'un réseau si complexe et faisant intervenir tant de facteurs peut s'avérer désastreux pour la cellule. Le lien entre pathogenèse et AS a été consciencieusement récapitulé par Liu *et al.* [244] en 2022, dont s'inspire le paragraphe ci-dessous.

Récemment, les analyses de transcriptomes de cellules cancéreuses ont permis de mettre en relation perturbation de l'épissage et développement de nombreux cancers, en impactant l'équilibre de fonctions cellulaires comme la survie, la prolifération, le métabolisme, l'angiogenèse, *etc.* La perturbation des fonctions des SRSF, par mutation ou défaut de régulation notamment, a été décrite dans les cancers du poumon, de sein, du colon, du cerveau, *etc.* [245]. Un exemple qui illustre bien l'importance de l'équilibre entre tous les acteurs de l'épissage est décrit dans Liu *et al.* en 2021 [246], où il a été détecté une surexpression de CLK1 dans l'adénome canalaire pancréatique. En conséquence, SRSF5 se retrouve hyper-phosphorylé et promeut l'exclusion d'exons alternatifs dans les ARN codants la méthyltransférase METTL4 et la cycline L2, ce qui aboutit à une augmentation aberrante de la méthylation de l'ARN (pro-métastatique) et de la prolifération cellulaire [246].

Au-delà des cancers, les déficiences d'épissage alternatif ont été impliquées dans la pathogenèse de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, de Huntington et d'Alzheimer, par exemple en perturbant l'épissage alternatif de la protéine Tau [247]; mais aussi dans des maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité.

De par son implication dans la progression de tant de pathologies, l'AS ressort comme une cible thérapeutique très prometteuse. Des motifs d'AS sont déjà très utilisés comme marqueurs thérapeutiques [248] et des molécules ciblant spécifiquement des acteurs de l'AS sont développées. Par exemple, en ciblant l'activité des kinases CLK avec la molécule SM09419, la déphosphorylation des SRSF va favoriser l'apoptose de cellules cancéreuses dans le cas de la leucémie myéloïde aigüe [249]. D'autres technologies utilisent aussi les ARN antisens, comme par exemple dans le traitement du cancer du sein, où les oligonucléotides antisens forcent l'épissage de STAT3 vers un isoforme suppresseur de tumeur, pro-apoptotique [244].

Ces résultats encourageants invitent à regarder le rôle de l'épissage alternatif dans d'autres contextes physiopathologiques, comme les infections. En effet, l'AS dans la réponse aux infections virales est bien décrit et démontre son importance dans la mise en place rapide de la réponse immunitaire [250] anti-virale, mais indique aussi que les virus eux-mêmes peuvent directement affecter l'AS [251] et certains, comme le VIH, vont même jusqu'à utiliser la machinerie d'épissage pour se répliquer [252]. Comparativement, l'état de l'art s'avère restreint concernant l'épissage alternatif en réponse aux infections bactériennes. Une étude décrit un remaniement du paysage d'épissage des macrophages au cours d'infection par *Mycobacterium tuberculosis* [253] mais il serait précieux de venir la compléter par des observations pour d'autres infections bactériennes. En effet, dans un contexte d'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, il devient urgent de développer de nouvelles stratégies antibactériennes et cibler l'AS pourrait en faire partie; en particulier, les stratégies visant l'hôte présentent l'avantage de ne pas constituer une pression de sélection sur les bactéries qui favorise l'acquisition de mécanismes d'échappement.

3.2.4 Optimisation de la détection de modification de l'épissage avec les technologies de séquençages

3.2.4.1 Développement de l'identification d'évènements d'épissage alternatif par séquençage en lectures courtes

La transcriptomique est un domaine découlant de la génomique et a pour but de déterminer l'expression des ARN dans un organisme. Dans le but de comparer l'expression des gènes entre plusieurs conditions, il est commun de réaliser une analyse d'expression différentielle des gènes à partir de données de transcriptomique, mais il s'avère que ne considérer que le taux d'expression des gènes ne permet pas de détecter les mécanismes plus discrets de

régulation de l'expression des gènes, comme l'AS, mais dont les conséquences sont tout aussi importantes. Pour cela, depuis une quinzaine d'années, la communauté scientifique a développé des technologies et outils destinés à cataloguer les variants de transcrits et identifier les motifs d'épissage, la structure transcriptionnelle des gènes et d'autres modifications post-transcriptionnelles, dans différents contextes [254].

L'étude de l'ARN se fait souvent à partir d'un extrait d'ARN rétro-transcrit en ADNc, par souci de stabilité moléculaire. Pour identifier les événements d'AS entre plusieurs conditions, plusieurs techniques se sont succédées. La première était basée sur des puces à ADN, dans lesquels se trouvaient des sondes spécifiques aux jonctions exons-exons et dont le taux d'hybridation entre sonde et de l'ADNc marqué par fluorescence [255] était donc proportionnelles à la présence de cette jonction. Ces analyses se faisaient à haut débit et à moindre coût mais induisaient beaucoup de bruit de fond en raison d'hybridation aspécifique nécessitant une normalisation compliquée mais aussi car elles ne permettaient de n'étudier que les jonctions connues et rendaient impossible l'identification de nouveaux isoformes. Par la suite, le séquençage par la méthode de Sanger sur des ADNc tagués a été développé, mais ne permettait pas un alignement précis sur le génome, et son coût élevé ne permettait pas d'études à haut débit [256]. Puis, la démocratisation des nouvelles technologies de séquençage (Next generation sequencing, NGS) a fait baisser le coût des expériences et a permis de développer la technique du RNA-Seq (Séquençage d'ARN), encore basée sur l'ADNc. Elle est aujourd'hui essentiellement réalisée avec la technologie Illumina, décrite plus bas [257]. Les avantages de cette méthode sont nombreux : le séquençage profond de l'ADNc améliore la quantification des événements d'AS et accroît la possibilité de découvrir de nouvelles jonctions exons-exons. Si la taille relativement petite de fragments séquencés permet surtout de relier deux exons entre eux, l'utilisation de données en "paired-end" peut renseigner sur la connectivité de plusieurs exons.

Pour séquencer de l'ARN avec la technologie Illumina, plusieurs étapes sont nécessaires (figure 3.29 A). Une fois l'ARN extrait, il va être fragmenté en oligonucléotides de 150 à 200 bp et rétro-transcrit en ADNc simple-brin, lui-même amplifié pour générer le brin complémentaire. Ensuite, les extrémités 5' vont être complétées, les extrémités 3' adénylées et des adaptateurs composés d'un code barre et d'une séquence d'attachement à la cellule d'amplification (flowcell) vont être ajoutés à chaque ADNc double-brin. Ces étapes constituent la préparation de la librairie. Les fragments sont ensuite hybridés et amplifiés sur la flowcell pour générer des clusters pour chaque fragments (35 cycles d'amplification) et enfin, au cours d'un cycle d'amplification à l'aide de nucléotides fluorescents. Les signaux spécifique émis par chaque nucléotides sont détectés pour chaque cluster et convertis en leur base correspondante, permettant ainsi la reconstruction de la séquence nucléotidique [258] (figure 3.29 B). A cette étape interviennent les notions de couverture et de profondeur de séquençage (Sequencing coverage and depth). La couverture correspond au nombre moyen de fois où une base ou une région du génome / transcriptome est séquencée et informe sur la quantité de données générées par le séquençage et la proportion du génome/transcriptome couverte par le séquençage. Elle se calcule en divisant le nombre de bases générées par le séquençage par le nombre de bases dans le génome / transcriptome. La profondeur correspond au nombre de fois où une base ou une région du génome est séquencée et se calcule en comptant le nombre de lectures à une région donnée du génome/transcriptome. Elle reflète la qualité du séquençage et permet d'identifier avec plus ou moins de certitude des variants locaux. En général, la qualité de ces paramètres est indiquée à 30x et 50x, signifiant que chaque position a été séquencée en moyenne 30 à 50 fois. Plus ces valeurs sont grandes, le plus peuvent être considérée comme fiables les données du séquençage [259]. L'un des atouts de la technologie Illumina est la grande profondeur générée, permettant une analyse quantitative robuste par la suite.

En effet, à la suite du séquençage, les données brutes, compilées dans des fichiers de type FASTA ou FASTQ, vont être nettoyées, c'est-à-dire déplétées de leur adaptateurs et alignées sur un génome de référence (fichier de type BAM ou SAM), ce qui permet donc d'assigner chaque lecture à une position du génome. Ces fichiers peuvent servir par la suite à l'analyse quantitative et qualitative de l'expression des gènes entre plusieurs conditions, mais aussi d'identifier des événements d'épissage alternatifs. Cette technique a aussi permis de démontrer les différences d'utilisation d'isoformes à travers les tissus [260]. Une méta-analyse d'expériences de RNA-Seq a permis de valider que ces données étaient bien adaptées à la détection d'AS entre plusieurs conditions [195].

Si la technologie Illumina a longtemps dominé, elle présente pourtant quelques limites [254]. En effet, si la petite taille des fragments séquencés permet l'identification de jonctions exon-exon, elle ne permet pas de discriminer précisément les isoformes auxquels ils appartiennent, puisque une même jonction exon-exon ou même une lecture peut être présente dans de multiples isoformes d'un ARN, voire correspondre à d'autres gènes (multi-mapping) (figure 3.29 C). Les étapes de fragmentation et d'amplification peuvent aussi introduire des biais de séquençage

qui seront reflétés dans l'analyse d'expression des gènes, voire une incertitude sur l'orientation du transcrit en fonction des protocoles utilisés. Enfin, la taille réduite des fragments peut aussi poser des problèmes d'alignement et d'identification d'isoformes si le génome de l'organisme de référence est incomplet ou mal annoté.

3.2.4.2 L'avènement des lectures longues pour une meilleure identification des isoformes

Pour pallier ces limites, de nouvelles technologies ont été développées, basées sur le séquençage de transcrits pleine-longueur, comme la technologie Oxford Nanopore (ONT) à l'aide du séquenceur MinION. Dans ce cas aussi, les ARN sont rétro-transcrit en ADNc, possiblement amplifiés par PCR, mais ne sont pas fragmentés (figure 3.29 A). Les ADNc passent ensuite à travers un pore incrusté dans une membrane synthétique par lequel passe un flux d'ions. En passant par le pore, chaque base va induire une perturbation du flux d'ion qui lui est propre. La variation de courant mesurée est ensuite interprétée en sa base correspondante [261] (figure 3.29 B). Après l'alignement et la quantification des données, chaque lecture peut être assignée en théorie à un transcrit unique, permettant ainsi de différencier l'expression de chaque isoforme à travers plusieurs conditions et permet aussi de découvrir de nouveaux isoformes (figure 3.29 C). Toutefois, la technologie ONT doit encore évoluer dans de nombreux domaines avant de remplacer les lectures courtes. Le premier handicap est la profondeur de séquençage [257], 100 à 10 000 fois moins importante que pour Illumina, ce qui ne permet pas pour l'instant l'analyse quantitative précise de changements d'expression détectés (excepté les gènes très fortement exprimés). Deuxièmement, le taux d'erreur de lecture est sensiblement plus important (5 à 10%) que celui d'Illumina (<1%), rendant ainsi impossible la détection de SNP. Enfin, la technologie ONT est beaucoup plus sensible à la dégradation d'ARN et demande donc plus d'attention lors de l'extraction d'ARN [257]. De même, la processivité des enzymes de RT est limitante pour les longs transcrits et peut décrocher avant la fin de celui-ci, induisant des biais en 3'. Cette technologie est cependant en évolution constante et progresse pour chacune de ces limitations, notamment avec la sortie d'un nouveau séquenceur, le PromethION, dont la couverture et le taux d'erreur rivalisent avec les lectures courtes [262]. De même, ONT développe déjà des stratégies de séquençage d'ARN direct, qui permettraient d'abolir les biais engendrés par la rétro-transcription de l'ARN et pourraient même aboutir à la détection de bases modifiées de l'ARN [263,264]. A l'avenir, les technologies de séquençage en lecture longue seront amenées à remplacer les lectures courtes pour un bon nombre d'applications donc l'étude de l'épissage alternatif, mais doivent encore évoluer avant d'offrir la meilleure qualité de séquençage.

3.2.4.3 Comparaison des outils de détection d'évènements d'épissage alternatif

Comme précisé ci-dessus, les données de séquençages alignées à un génome de référence sont le point de départ des analyses d'épissage alternatif (figure 3.30 A). En fonction des jeux de données (lectures courtes ou longues), il est nécessaire d'adapter son outil d'alignement. Dans un premier temps, en raison de l'épissage, les différentes régions des transcrits ne sont pas contiguës sur le génome et nécessitent donc des outils qui prennent en compte l'épissage. Une étude comparative de ces aligneurs a démontré d'importantes divergences en termes de précision d'alignements, de détection de jonctions exoniques et de prise en compte des annotations du génome de référence [265]. De même, une autre étude indique des différences de détection de SNP pour un même jeu de données alignées avec plusieurs outils différents [266]. De manière générale, pour les données en lecture courtes, c'est l'outil STAR qui obtient les meilleures performances dans le meilleur temps [267]; il a donc été choisi pour les analyses présentées dans ce manuscrit. Malheureusement, l'outil STAR et de manière générale les aligneurs optimisés pour les lectures courtes ne sont pas adaptés à l'alignement de lectures longues, en raison de la taille des lectures mais aussi du taux d'erreur supérieur aux lectures courtes. C'est pour pallier ces incompatibilités que l'aligneur Minimap2 a été développé [268], et permet l'alignement de lectures allant jusque 1 000 bp et 15% d'erreur, sans ralentissement notable par rapport aux autres aligneurs.

Une fois les lectures alignées, plusieurs techniques sont disponibles pour identifier les variants d'épissage (figure 3.30 A). Pour les lectures courtes, comme revu dans Mehmood *et al.* [269], certaines sont basées sur les isoformes, c'est-à-dire que ces derniers sont reconstitués avant d'estimer leur quantité relative dans chaque condition. C'est une approche qui permet de détecter le type de variation d'épissage (voir figure 3.24). Une autre approche est basée sur le comptage des exons. Comme les lectures sont courtes, elles sont assignées à des exons et des jonctions

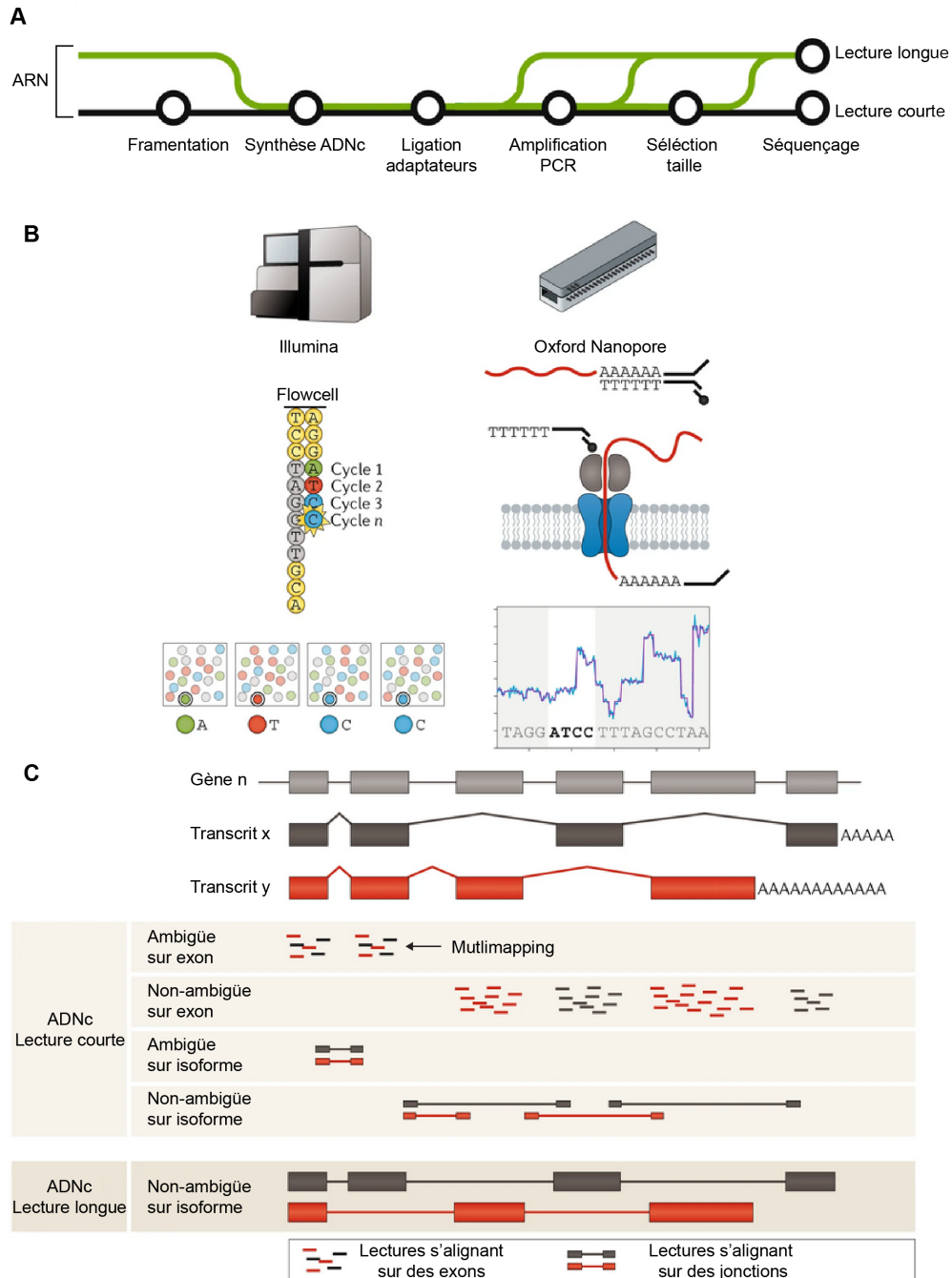


Figure 3.29: Illustration des technologies NGS Illumina et Oxford nanopore technologie et leur utilisation en RNA-Seq. Figure adaptée de Stark *et al.* [257]. (A) Les différentes étapes de préparation des échantillons d'ARN avant le séquençage pour Illumina (ligne noire) et ONT (vert). (B) Schématisation de la réaction de séquençage pour les deux technologies. (C) Alignement des lectures sur le génome et discrimination des transcrits.

plutôt que des isoformes et les lectures situées dans les unités de comptage sont ensuite dénombrées. Une analyse d'expression différentielle de l'utilisation des exons est ensuite réalisée. Parmi les outils, DEXSeq [270], Limma [271] et EdgeR [272] sont les plus cités. L'application de ces techniques nécessitent donc un compte préalable des lectures par unité (exons, jonctions, etc.) grâce à des outils comme DEXSeqCount, HTSeq-count ou Featurecounts.

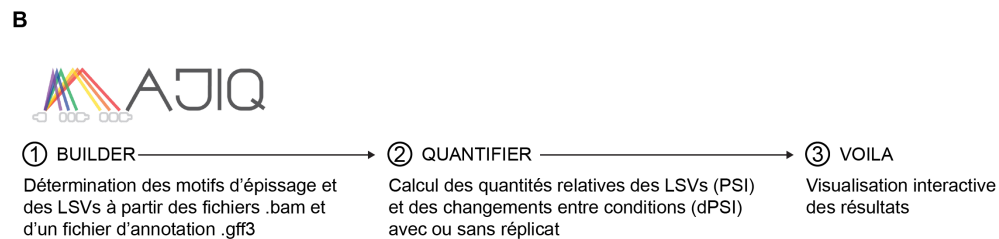
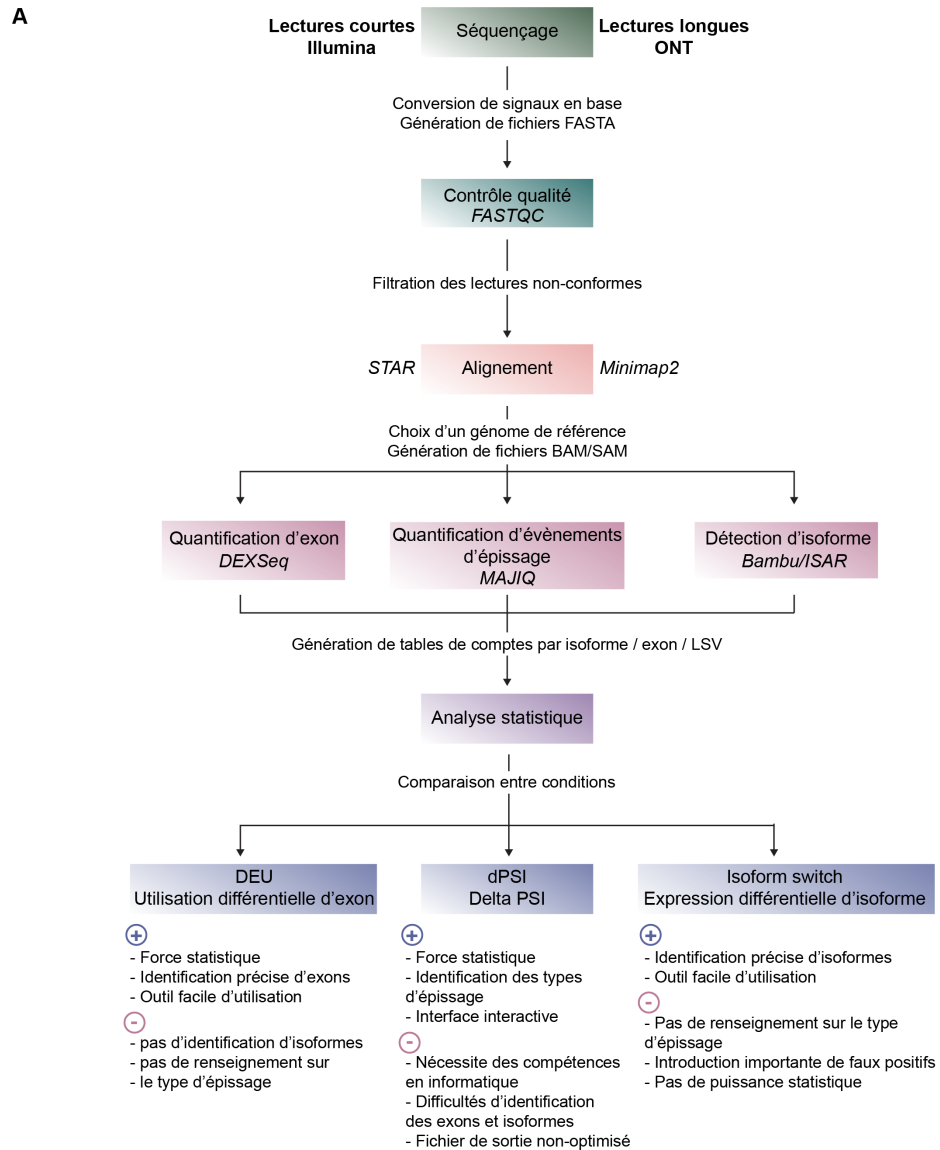


Figure 3.30: Etapes de détection d'événements d'épissage alternatif à partir de données NGS. (A) Description des étapes et des outils disponibles (en italique) en précisant les avantages (+) et inconvénients (-) de chaque approche. (B) Détails des étapes de l'outil MAJIQ pour détecter les variants locaux d'épissage (LSV).

Enfin, une approche similaire consiste à quantifier les événements d'épissage, en calculant le PSI (percent spliced in) pour chaque évènement. Cet indice reflète le pourcentage de transcrits d'un gène qui contiennent un évènement spécifique [271,273]. C'est sur cette stratégie qu'est basé l'algorithme MAJIQ [274,275], utilisé pour mon travail et qui quantifie les variants locaux d'épissage (local splice variant, LSV) entre plusieurs conditions et permet même de détecter le type d'épissage (figure 3.30 B).

Mehmood et al. [269] a comparé différents outils pour chaque approche et en a conclu que les approches basées sur les comptes d'exons et MAJIQ étaient les plus pertinentes dans l'analyse d'épissage différentiel, tant en termes de détection, de précision et avec un assez bas taux de faux positifs. Toutefois, bien que quantitatives, ces approches en lectures courtes ne permettent d'identifier avec certitude quels isoformes sont affectés par les changements d'épissage. En effet, ce sont surtout les données de séquençage en lecture longue qui peuvent donner ces informations. Ces dernières années, beaucoup d'outils de détection d'isoformes dans des lectures longues ont vu le jour et sont recensés dans la base de données [276]. Dans cette étude, j'ai utilisé une conjugaison du package R Bambu avec le package IsoformSwitchAnalyzeR, qui se rapproche beaucoup de la stratégie basée sur la reconstitution d'isoformes à partir de lectures courtes mentionnées ci-dessus. Bambu a été développé pour détecter et quantifier les isoformes dans plusieurs échantillons à partir de lectures longues et permet aussi la découverte de nouveaux variants de transcrits [277]. Le fichier de sortie peut être directement utilisé dans le deuxième package pour la quantification de l'expression différentielle d'isoformes et la prédiction des conséquences fonctionnelles de ces changements d'isoformes [278], tout en informant sur les isoformes impactés. Pourtant se pose encore le problème de la profondeur de séquençage pour le cas des lectures longues. En effet, il a été montré que ce paramètre avait un impact important sur la détection d'évènement d'épissage ou de changement d'isoforme statistiquement pertinents [279]. Une étude comparative a en effet montré que la quantification des évènements d'épissages basée sur les isoformes n'était pas reproductible à ce jour [280], essentiellement en raison du manque de profondeur des lectures longues ou de précision d'assemblage des lectures courtes. L'analyse de lectures courtes est aussi plus performante pour la détection de gènes et d'exons différentiellement exprimés. Toutefois, cette étude suggère aussi une complémentarité des deux techniques : les lectures courtes détecteraient plus d'évènements d'utilisation différentielle d'exons, alors que les lectures longues en détecteraient plus dans les UTR. En conclusion, le meilleur moyen d'allier quantification et qualification des isoformes est encore aujourd'hui une approche hybride entre les deux technologies [281] (Tableau 3.3) mais les progrès attendus pour la technologie Nanopore vont certainement changer la donne concernant les analyses d'épissage alternatif et permettre quantification et qualification précise des changements d'isoformes à travers les conditions.

Technologie	Lectures	Avantages	Inconvénients	Applications
Illumina	Courtes (150-200 bp)	Haut débit Grande profondeur Technologie éprouvée et biais maîtrisés Multiples outils disponibles Fonctionne avec des ARN dégradés	Introduction de biais dans la préparation des librairies (Rétro-transcription, PCR, sélection de taille) Petite taille de fragments Limitation de l'identification et la quantification d'isoformes Détection d'isoformes qui nécessite une étape d'assemblage	Utilisation différentielle d'exons Quantification de LSV
Oxford Nanopore Technologie	Longues (10.1 - 10kb)	Transcrits pleine longueur Identification d'isoforme Détection de marques d'édition de l'ARN Pas de fragmentation / amplification nécessaire Technologie en développement rapide	Débit bas à moyen Introduction de biais dans la préparation de certains échantillons Pas adapté aux ARN dégradés	Identification d'isoformes

Table 3.3: Comparaison des avantages et inconvénients des technologies de séquençage Illumina et Oxford Nanopore. Tableau adapté de Stark et al. [257].

3.3 CIRBP, un acteur essentiel de la coordination de la réponse au stress

Le gène codant pour la protéine CIRBP (Cold inducible RNA-binding protein) est un facteur particulièrement intéressant en raison des nombreux rôles qu'il occupe dans la coordination de la réponse au stress, mais aussi dans le développement et l'évolution de la cellule. De plus, l'expression de CIRBP est contrôlée par divers types de régulation, affectant son locus sur le génome jusque la localisation cellulaire de la protéine. Ce facteur ayant occupé une place centrale dans mon travail de thèse, je décris ci-dessous la famille de protéines à laquelle CIRBP appartient, la régulation de CIRBP (sous la forme d'une revue de littérature publiée en 2023) et enfin les nombreux rôles et potentielles applications de CIRBP.

3.3.1 La famille des protéines RGG

3.3.1.1 Les motifs RGG

CIRBP appartient à la famille des protéines RGG, soit une sous-famille des protéines de liaison à l'ARN, comportant des répétitions de motifs RG ou RGG dans leur cadre de lecture ouvert [282]. Si d'autres organismes encodent aussi des protéines RGG, comme les virus par exemple, je vais ici me concentrer sur les protéines RGG humaines.

Le domaine RGG de la nucléoline a été décrit dès 1985 [283] et caractérisé dans hnRNP U en 1992 [284]. L'enrichissement en arginine de ce domaine n'est pas anodin : en effet, la chaîne latérale de cet acide aminé présente trois groupements amines, chacun en capacité de former une liaison hydrogène avec un groupement carbonyle [285], permettant plus de potentielles interactions avec les molécules avoisinantes (figure 3.31 A). A leur tour, les glycines permettent une certaine flexibilité de la chaîne polypeptidique [286]. Les motifs RG ou RGG, doubles ou triples, sont espacés de combinaisons variables d'acides aminés [287]. Tous ces paramètres forment un domaine en apparence désorganisé mais dont la variabilité et flexibilité permettent d'élargir le spectre d'interaction des protéines RGG avec d'autres protéines ou même avec des acides aminés. Par exemple, dans le cas de CIRBP, la région RGG interagit avec la protéine TNPO1 et affecte ainsi la relocalisation cellulaire de CIRBP [288]. Dans d'autres cas, le domaine RGG de CIRBP peut aussi interagir de manière aspécifique avec des ARN au sein de granules de stress et impacter négativement leur traduction [289]. En effet, l'ARN, chargé négativement et les arginines et glycines chargées positivement forment des interactions électrostatiques [290], ou bien la reconnaissance de structure tertiaires de l'ARN par les arginines permettent la formation de liaisons hydrogènes entre ces molécules [291,292]. Le domaine RGG peut aussi lier des ARN de manière séquence-spécifique, comme démontré pour le RGG de la protéine hnRNP U, qui lie spécifiquement des séquences enrichies en A,T et G [284], ou bien le domaine RGG de CIRBP, qui peut spécifiquement lier les quadruplets de G, à la fois dans l'ARN et dans l'ADN [239]. Outre les domaines comprenant les motifs RGG, d'autres types de domaines sont fréquemment retrouvés dans les protéines RGG : des régions riches en sérine et tyrosine (SY), des signaux d'import ou d'export nucléaire (NLS, NES), des domaines à doigts de zinc ou encore, comme pour CIRBP, un ou plusieurs domaines de reconnaissance de l'ARN (RNA recognition motif, RRM). Ces dernières composent alors la sous-famille des protéines de liaison à l'ARN riche en RG/RGG, dont les RRM sont structurés et permettent de spécifiquement lier des ARN cibles. L'organisation des régions de cette sous-famille de protéines est diversifiée et quelques exemples, dont la structure de CIRBP, sont présentés dans la figure 3.31 B.

3.3.1.2 Fonctions des protéines RGG

Parmi les fonctions les plus notables des protéines RGG, on peut citer leur rôle dans la formation des organites sans membranes (MLO), décrites précédemment, notamment dans leur nucléation ou leur stabilisation. Par exemple, la déméthylation des motifs $\overline{\text{RGG}}$ de G3BP1 promeut la formation de SG en cas de stress oxydatif mais pas en cas de stress chaud, en offrant probablement une plateforme de condensation des différents composants des SG grâce à ses nombreuses interfaces [293], sans que les interactions soient spécifiques [294]. Il a aussi été montré que l'assemblage et le maintien des SG dans le temps étaient partiellement dépendants de la capacité de G3BP1 à former un homodimère [294]. Ces études suggèrent un rôle essentiel de plateforme de condensation, notamment par le domaine RGG, de G3BP1 dans la formation des SG. D'autres études démontrent aussi l'importance de la

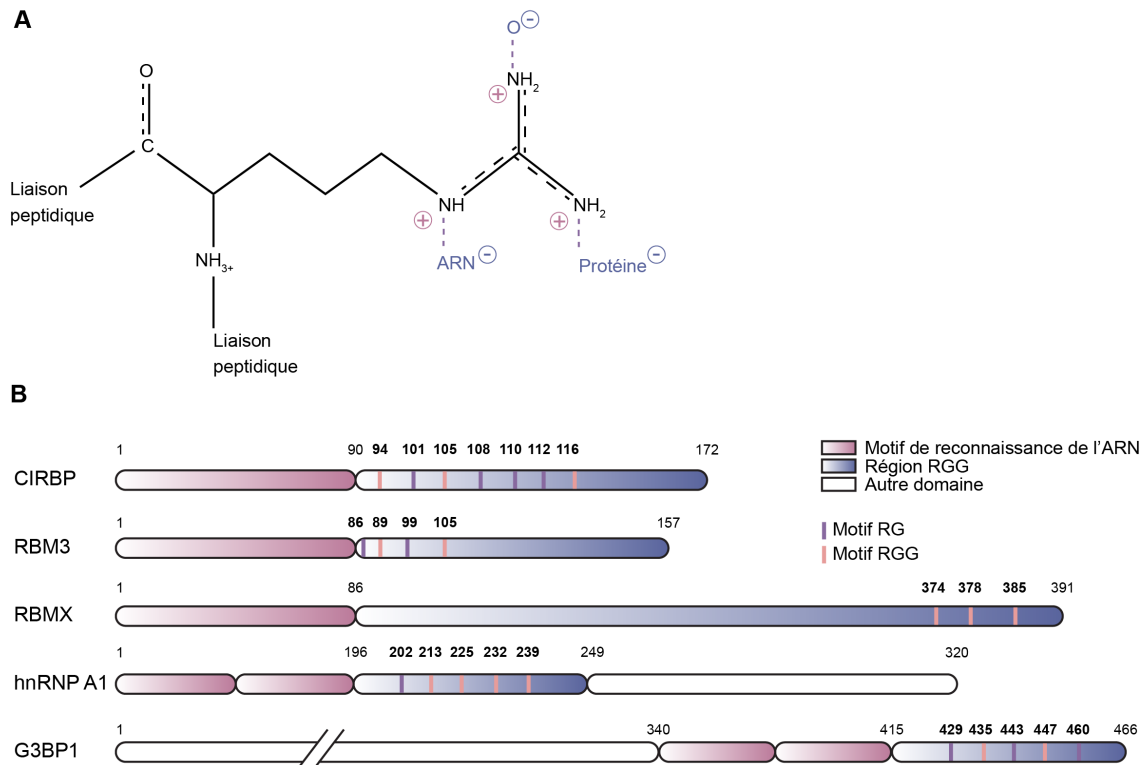


Figure 3.31: Organisation structurale des protéines RGG. (A) Représentation des sites potentiels d'interaction des résidus arginines dans les motifs RG/RGG avec des molécules chargées négativement. (B) Diversité d'organisation structurale de protéines RGG illustrées par des exemples représentatifs. En rose, les domaines de reconnaissance et de liaison à l'ARN (RRM), en bleu les régions contenant les motifs RG (marque violette) et RGG (marque orange) et en blanc les autres domaines des protéines présentées. La longueur des protéines et des domaines est désignée en nombre de résidu.

méthylation de domaines RGG dans la LLPS et la formation de SG, notamment de FUS [295] ou encore UBAP2L [296].

La formation des p-bodies a aussi été décrite pour être liée à la protéine RGG RAP55 [297], puisque son inhibition déstabilise la formation des p-bodies et d'autres granules ribonucléiques. Ici aussi, la méthylation de RAP55 est essentielle à sa localisation aux organites, puisque l'inhibition de PRMT1 n'induit pas l'adressage de RAP55 aux p-bodies. Enfin, si beaucoup d'autres protéines RGG sont retrouvées localisées dans des organites sans membrane, il n'est pas défini si elles participent à leur formation [298].

Au-delà de leur implication dans la formation des organites sans membranes, les protéines RGG sont impliqués dans de nombreuses autres fonctions cellulaires [287]. En effet, un défaut de méthylation du domaine RGG de la protéine MRE11 rend les cellules hypersensibles aux dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes, affecte le cycle cellulaire et l'activité de la kinase ATR, essentielle à la réparation de l'ADN [299,300]. Similairement, un défaut de méthylation de hnRNP UL1 empêche son interaction avec le complexe MRN, un coordinateur de la réponse aux dommages à l'ADN [301]. La méthylation d'autres protéines RGG, comme 53BP1 [302] ou DHX9 [303], semble aussi avoir un rôle dans la réparation de l'ADN et il reste à définir l'étendue du rôle des protéines RGG dans le maintien de la stabilité du génome.

Les protéines RGG sont aussi impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, comme illustré par la nucléoline qui interagit avec l'histone H1 et participe à la décondensation de la chromatine [304] et le facteur de transcription E2f-1 qui a régulé l'expression des gènes de la phase S et qui est lui-même inhibé par méthylation de domaine RGG [305]. Les protéines RGG peuvent aussi intervenir dans l'épissage de transcrits spécifiques. Il a été montré que l'expression d'un isoforme de hnRNP A1 peut réguler l'épissage des ARN du VIH et inhiber leur expression [306]. SF3A1 peut favoriser la formation du spliceosome, lorsque son domaine RGG catalyse l'interaction entre les snRNP

U1 et U2, en liant spécifiquement l'ARN dans U1 [307]. Les protéines hnRNP A1 et RBMX quant à elles régulent l'épissage de la protéine PKM, un médiateur de la conversion du phosphoenolpyruvate en pyruvate + ATP, dont la dérégulation d'épissage est favorable au développement de nombreux cancers. En ce sens, l'épissage alternatif favorisé par hnRNP A1 et RBMX a un effet antitumoral démontré dans des cellules cancéreuses de vessie [308]. L'inhibition de hnRNP A1 a aussi été décrite pour perturber l'épissage d'un grand nombre de transcrits [309]. Enfin, la protéine hnRNP G va directement lier la région carboxy-terminale de l'ARN polymérase II et participer à l'épissage co-transcriptionnel de ses ARN cibles [310]. Pour finir, beaucoup de protéines RGG ont été décrites pour inhiber la traduction de transcrits spécifiques : FRMP se lie sur des transcrits cibles et provoque un arrêt des ribosomes [311], comme illustré par son interaction avec CYFIP1 qui inhibe le facteur d'initiation de la traduction eIF4E [312]. Dans les granules de stress, CIRBP inhibe la traduction de ses transcrits cibles *via* son domaine RGG [289]; en revanche, en cas d'exposition aux UV, CIRBP promeut la traduction de ses cibles, comme ATR ou la thioredoxine, notamment en interagissant avec eIF4G et en stabilisant le transcrit [313]. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, beaucoup de protéines RGG interagissent avec eIF4G [314]; il serait donc intéressant à l'avenir d'étudier plus en profondeur l'interaction de ce facteur d'initiation de la traduction avec d'autres protéines RGG humaines.

Enfin, les protéines RGG sont impliquées dans d'autres grandes fonctions cellulaires, comme l'apoptose. Par exemple, la nucléoline stabilise la polyadénylation (et donc le transcrit) du facteur Bcl-x1 par interaction avec PABP [315,316] et favorise donc son activité anti-apoptotique.

En conclusion, les protéines RGG, fortement régulées par méthylation de leurs motifs RGG, sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, qui sont illustrées dans la figure 3.32, notamment en réponse aux stress. Étonnamment, elles n'ont été que peu décrites dans le contexte d'infection par un pathogène [317,318], dont les infections sont pourtant une source connue et majeure de stress. C'est pourquoi étudier le rôle de l'une d'entre elle, CIRBP, dans le contexte d'une infection bactérienne peut se révéler pertinent.

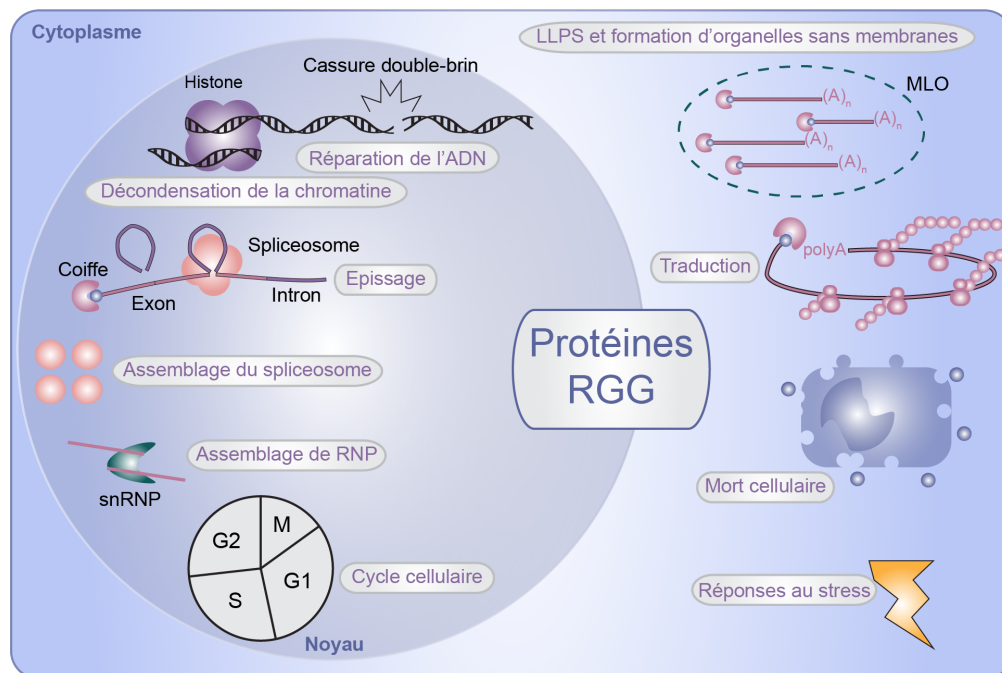


Figure 3.32: Fonctions cellulaires des protéines RGG.

3.3.1.3 Régulations des protéines RGG

De par sa configuration, le domaine RGG peut aussi servir de plateforme de régulation pour finement moduler les interactions et la localisation des protéines RGG (figure 3.33). En effet, dès 1985, ces protéines ont été décrites

comme méthylées [283] et donc cibles des méthyltransférases PRMT, qui catalysent l'ajout d'un groupement méthyle sur les groupements amines, notamment des arginines et préférentiellement dans la région comportant les motifs RGG [319]. L'introduction d'un groupe méthyle peut avoir des conséquences sur la structure de la protéine et ainsi perturber ses interactions. Par exemple, la méthylation de la protéine FRMP inhibe son interaction avec l'ARN [320] ou celle de CIRBP empêche la liaison avec TNPO1 et donc sa relocalisation dans le noyau [288]. De même, l'impact de la méthylation de CIRBP sur sa localisation promeut son export vers le cytoplasme et potentiellement son recrutement aux granules de stress [289]. Ces dernières années, il a aussi été démontré que ces méthylations étaient réversibles et intervenaient comme un moyen de moduler l'activité des protéines RGG en réponse à leur environnement, notamment en cas de stress [321]. Comme souvent pour la régulation de CIRBP [322], cette réponse peut être stress-spécifique, soulignant la subtilité des mécanismes de régulations permettant de s'adapter à l'environnement. Par exemple, la déméthylation de G3BP1 est observée en cas de stress du réticulum endoplasmique ou de stress oxydatif, mais pas de stress chaud [293]. Sa déméthylation est essentielle pour son recrutement aux granules de stress. Enfin, la méthylation des protéines RGG peut aussi favoriser certaines interactions entre protéines, comme illustré par sa reconnaissance par un domaine spécifique de SMN et SPF30 [323]. En conclusion, la méthylation des protéines RGG permet de réguler leur activités et localisation dans des conditions spécifiques et un défaut de méthylation peut même se révéler pathogène, comme dans le cas du développement du sarcome d'Ewing [324].

Dans certains cas, il semblerait aussi que la présence ou l'absence des motifs RGG puissent être régulées par épissage alternatif. Par exemple, l'isoforme 12 de FRM1 n'ayant pas inclus les exons 12 et 14 lors de son épissage, ce qui provoque l'apparition d'un codon stop prématuré et le dernier motif RGG de la protéine canonique n'est alors pas intégré au produit final. En conséquence, la localisation de la protéine est affectée [325]. Cependant, il reste encore beaucoup à découvrir quant aux fonctions de chaque motif spécifiquement et sur les mécanismes qui régulent les protéines RGG.

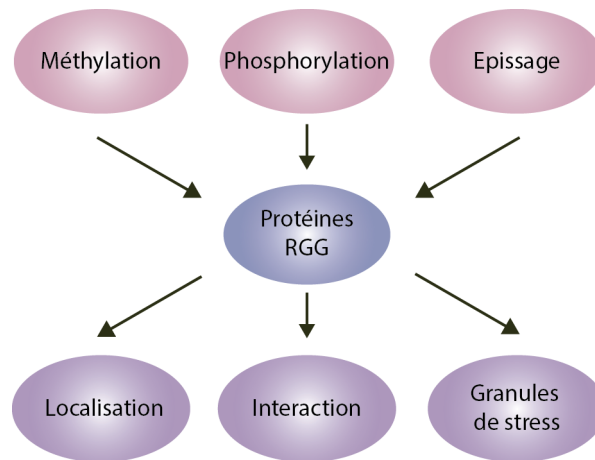


Figure 3.33: Modifications post-traductionnelles des protéines RGG et leurs conséquences.

3.3.2 Régulation de CIRBP dans les contextes de stress biotiques et abiotiques

CIRBP est un facteur dont l'expression semble particulièrement surveillée tant il existe de mécanismes de régulation. Effectivement, l'expression de ce gène est régulée à tout niveau : de la modification de son promoteur, de sa transcription, de la maturation de ses ARN, que ce soit par l'épissage ou la polyadénylation, de sa traduction, de la modification des protéines produites et de sa localisation au sein de la cellule; le tout de manière stress-dépendante et espèce-dépendante. La revue de l'état de l'art présentée ci-dessous récapitule de manière quasi-exhaustive ces événements de régulation de CIRBP dans le contexte de nombreux stress [322].

3.3.2.1 Régulation of cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP) in response to cellular stresses

3.3.2.1.1 Résumé en français

La protéine de liaison à l'ARN induite par le froid, Cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP), est un facteur de réponse au stress polyvalent. Chez les vertébrés, ce facteur comporte deux domaines : un domaine de reconnaissance de l'ARN et un domaine riche en arginine et glycine (motif RG/RGG). CIRBP a été décrit pour lier des ARNm en réponse à de nombreux stress (froid, infections, UV, hypoxie, etc.) et régule leur stabilité et traduction. Les protéines codées par ses cibles sont elles-mêmes impliquées dans des voies cellulaires clés comme l'apoptose, l'inflammation, la prolifération cellulaire ou le contrôle de la traduction; leur co-régulation permet ainsi la coordination de ces différentes voies. En raison de ce rôle de régulateur central des grands fonctions cellulaires, l'expression de CIRBP est fortement contrôlée. Ici, nous résumons les connaissances actuelles des multiples facettes mécanistiques affectant l'expression et les fonctions de CIRBP. Outre la régulation de sa transcription en réponse à l'hypothermie de l'utilisation de promoteurs et sites alternatifs d'initiation de la transcription, CIRBP subit aussi différents événements d'épissage alternatif qui, selon le contexte, modulent la stabilité des transcrits de CIRBP et/ou impacte la séquence de la protéine encodée. De manière générale, si l'expression de CIRBP est induite dans le contexte de l'hypothermie, dans d'autres contextes les événements d'épissage alternatif redirigent les isoformes nouvellement transcrits vers la dégradation par des systèmes de surveillance de l'ARN, notamment dans le contexte du stress chaud ou des infections par des bactéries produisant des cytolysines. Des modifications post-traductionnelles de CIRBP, particulièrement dans son domaine RGG conditionnent sa localisation cellulaire et son accès à ses cibles, contrôlant ainsi leur expression. Par exemple, des activités de phosphorylation ou de méthylation modulent le transport de CIRBP entre le noyau et le cytoplasme et contrôlent son recrutement aux granules de stress. Si l'on considère le potentiel thérapeutique de la régulation de ce facteur clé de la réponse aux stress, la compréhension poussée des mécanismes de régulation de CIRBP mérite plus d'attention.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Regulation of cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP) in response to cellular stresses

Morgane Corre ^a, Alice Lebreton ^{a, b, *}^a Institut de biologie de l'ENS (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 75005, Paris, France^b INRAE, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2023

Received in revised form

29 March 2023

Accepted 7 April 2023

Available online xxx

Handling Editor: Dr B Friguet

Keywords:

CIRBP

Alternative splicing

Stress

Post-translational modification

Subcellular localization

Translation

ABSTRACT

Cold-inducible RNA-Binding Protein (CIRBP) is a general stress-response factor in vertebrates harboring two domains: an RNA-recognition motif and a regulatory domain rich in RG/RGG motifs. CIRBP has been described to bind mRNAs upon various stress conditions (cold, infections, UV, hypoxia ...) and regulate their stability and translation. The proteins encoded by its targets are involved in key stress-responsive cellular pathways including apoptosis, inflammation, cell proliferation or translation, thus allowing their coordination. Due to its role in regulating central cellular functions, the expression of CIRBP is tightly controlled. We review here current understanding of the multiple mechanistic layers affecting CIRBP expression and function. Beyond transcriptional regulation by cold-responsive elements and the use of alternative promoters and transcription start sites, CIRBP undergoes various alternative splicing (AS) events which, depending on conditions, modulate the stability of CIRBP transcripts and/or impact the sequence of the encoded polypeptide. Typically, whilst CIRBP expression is induced in the context of hyperthermia or viral infection, AS events preferentially address alternative isoforms towards mRNA degradation pathways in response to heat stress or to bacterial-secreted pore forming toxins. Post-translational modifications of CIRBP, mostly in its RGG domain, also condition CIRBP subcellular localization and access to its targets, thereby promoting or inhibiting their expression. For instance, phosphorylation and methylation events gate CIRBP nuclear to cytoplasmic translocation and control its recruitment to stress granules. Considering the therapeutic potential of modulating the expression and function of this central player in stress responses, a fine understanding of CIRBP regulation mechanisms deserves further attention.

© 2023 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
2. CIRBP is a conserved RNA-binding stress response regulator	00
2.1. CIRBP sequence conservation and functional domains	00
2.2. CIRBP expression landscape across tissues	00
2.3. Functions of CIRBP in stress responses and inflammation	00
3. Quantitative and qualitative regulations of CIRBP transcripts	00
3.1. Regulation by CIRBP transcription	00
3.2. Alternative splicing in favor of the canonical CIRBP transcript increases its stability and protein production	00
3.3. Alternative splicing towards non-canonical CIRBP transcripts decreases their stability and protein expression	00

Abbreviations: AS, alternative splicing; CIRBP, cold-inducible RNA-binding protein; DAMP, damage-associated molecular pattern; ER, endoplasmic reticulum; GRP, glycine-rich RNA-binding protein; IRES, internal ribosome entry site; LLO, listeriolysin O; MCRE, mild-cold responsive element; NMD, nonsense-mediated decay; RBD, RNA-binding domain; RRM, RNA recognition motif; TSS, transcription start site; UTR, untranslated region.

* Corresponding author. Institut de biologie de l'ENS (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 75005, Paris, France.

E-mail address: alice.lebreton@ens.psl.eu (A. Lebreton).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.04.003>

0300-9084/© 2023 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Please cite this article as: M. Corre and A. Lebreton, Regulation of cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP) in response to cellular stresses, *Biochimie*, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.04.003>

4. Subcellular localization of CIRBP governs its functions	00
4.1. Intracellular CIRBP is decorated by post-translational modifications	00
4.2. Extracellular CIRBP	00
5. Conclusions and future challenges	00
Funding	00
Declaration of competing interest	00
Acknowledgements	00
References	00

1. Introduction

The cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP, also referred to as CIRP or hnRNP A18) is part of the family of glycine-rich RNA-binding proteins (GRP) carrying an RNA recognition motif (RRM) [1]. CIRBP orthologs are extremely conserved across vertebrate species, and also share strong homologies with regulators of the same family in plants (Fig. 1A) [2]. In vertebrates, CIRBP is expressed in a wide variety of tissues [3] and usually encodes several protein isoforms, the most representative one being usually a 18–21 kDa polypeptide. It was first identified as a DNA-Damage-induced transcript [1,4] and hypothermia-induced protein [5] and later described as a key response factor to a broad panel of both extracellular and intracellular stresses [2], which is also involved in the development of various diseases [6].

CIRBP preferentially binds the 3'-untranslated regions (UTRs) of

its target mRNA transcripts and regulates their polyadenylation site selection [8], stability and translation [9], thus impacting key cellular pathways, such as apoptosis, cell cycle or inflammation [2]. The polyvalence of CIRBP response to different contexts could be linked to the multiple layers of regulation of the gene itself. For instance, while the structure of the protein appears quite simple, several post-translational modifications have been described [10,11], which tune the role of CIRBP essentially by affecting its subcellular localization. Additionally, regulations of the transcription and alternative splicing (AS) of CIRBP impact its transcript stability and translation levels, thereby affecting downstream CIRBP regulatory functions.

CIRBP regulation is thus multileveled and multifactorial. This versatility allows its regulatory role to be co-opted for coordinating responses to various types of stressors across a broad range of tissues and species, although a thorough landscape of CIRBP relevance

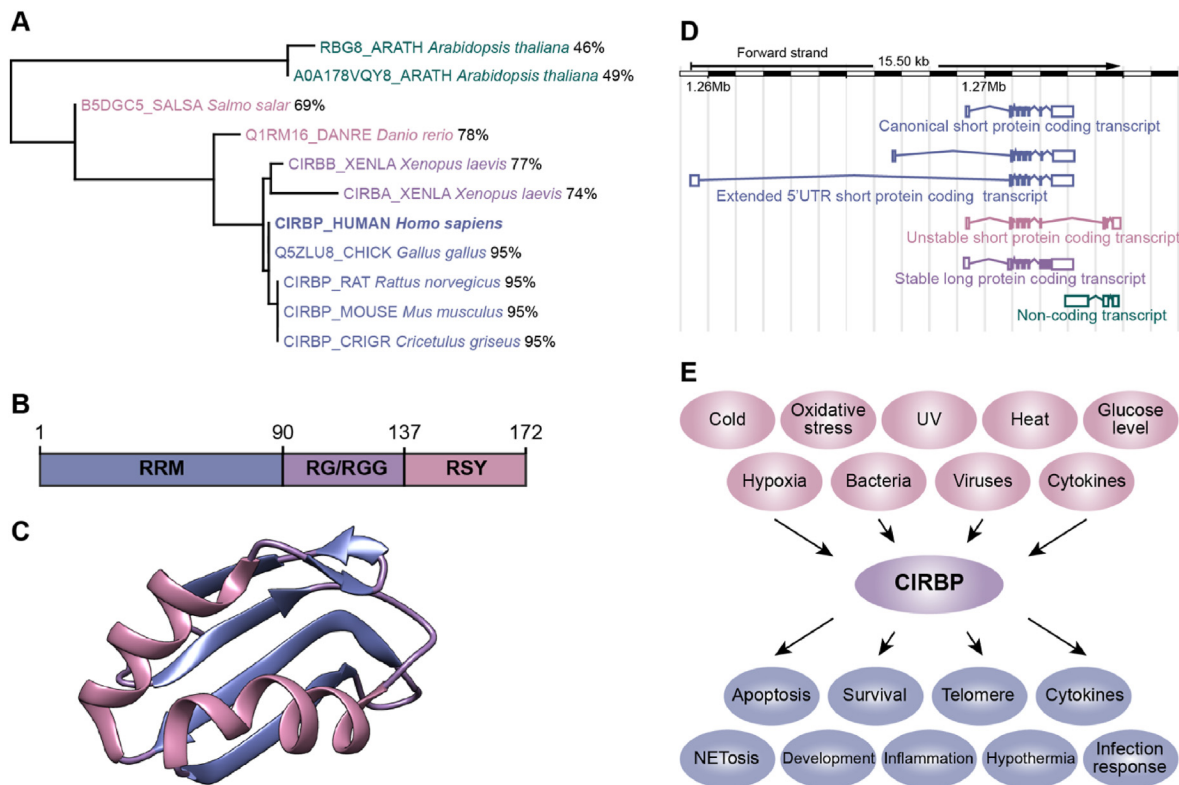


Fig. 1. Structure and conservation of CIRBP. (A) Evolution of the CIRBP sequence across model organisms. Tree branch lengths represent genetic distance and percentages represent protein sequence identities, determined by BLASTP analysis on the RefSeq protein database. (B–C) Structure of CIRBP. (B) Map of the three described CIRBP domains in humans. The RRM spans the 90 first residues, the RG/RGG domain goes from the 90th to the 137th residues and then the RSY domain extends until the end of the protein sequence. (C) Crystal structure of the RRM domain of human CIRBP [7]. (D) Four main classes of human CIRBP transcripts isoforms, collapsed as the most representative transcript(s) for each group. Blue, stable transcripts encoding the canonical 18-kDa protein; pink, unstable, NMD-sensitive transcripts also encoding the canonical protein; purple, transcripts encoding a long form of the protein; and green, processed non-coding transcripts. (E) Non-exhaustive representation of CIRBP-stimulating conditions (pink bubbles) and subsequent CIRBP-dependent responses (blue bubbles).

in vital cellular functions is still missing. In this review, we aim at summarizing CIRBP known regulation mechanisms, from transcription to protein relocalization, in the context of intracellular and extracellular stresses or physiological variations.

2. CIRBP is a conserved RNA-binding stress response regulator

2.1. CIRBP sequence conservation and functional domains

The CIRBP locus is located on chromosome 19 in humans and on chromosome 10 in mice, and encodes a 18.5 kDa protein (for the main isoform in these species). The protein amino-acid sequence is very conserved across species; human CIRBP shares 95% identity with murine, rat and chicken CIRBP, 74–78% with *Xenopus* xCIRBP or with its homolog in zebrafish, and under 50% with members of the GRP family in *Arabidopsis thaliana* (GRP7 and GRP8) [12], arguing of an early origin of this family of regulators in Eukaryotes (Fig. 1A). The CIRBP protein comprises three main domains (Fig. 1B). The RNA-binding domain (RBD), also called RNA-recognition motif (RRM), is located in the N-terminal region of the protein and carries two consensus and highly conserved ribonucleoprotein sequences (RNP1 and RNP2) [1]. It adopts the classical fold of this domain consisting of four antiparallel beta-sheets stacked between two alpha helices (Fig. 1C), which creates an interaction platform with its targets. It has been shown to bind specific mRNA targets, preferentially in their 3'-UTRs [13]. A putative 51-nucleotide consensus binding motif containing 6 invariant nucleotides in positions 5, 13, 14, 19, 29 and 51 has been proposed, based on the comparative analysis of the sequence of CIRBP mRNA targets identified by an immunotube-based strategy [10]. However, to date, the high number of putative CIRBP targets identified in RNA immunoprecipitation or cross-linking and immunoprecipitation assays followed by sequencing argues for a rather low specificity in their recognition [10,14–16]. In the C-terminal region, the unstructured arginine-glycine (RG)-rich domain is characterized by its decoration with several RG/RGG motifs. This type of domain, common to CIRBP and other stress-induced proteins, is generally involved in mRNA processing and transport [13]. As a target of various post-translational modifications, the RGG domain also serves as protein regulation platform [17]. Some authors consider that this domain is subdivided into a N-terminal RGG-rich portion containing three RGG repeats [18] and a C-terminal arginine, serine, tyrosine (RSY)-rich domain [19], both serving adjacent roles for protein cellular relocalization.

If the structure of the main form of the protein is rather simple, the transcription of the CIRBP loci and further maturation of its pre-mRNA can result in multiple mRNA transcripts. So far, 46 transcript variants have been identified in humans, among which 22 stable isoforms and 17 unstable isoforms (targeted for degradation by the nonsense-mediated decay —NMD—, see below) are coding, all in all resulting in at least 17 distinct CIRBP-encoded polypeptides differing in their amino-acid sequence. AS of CIRBP RNA isoforms thus represents both a quantitative regulatory layer and a potential reservoir of diversification for CIRBP protein sequence, structure and function around a common core.

2.2. CIRBP expression landscape across tissues

CIRBP displays a broad range of constitutive expression patterns across tissues as assessed in mice [3], with stronger levels in the brain, testis, lungs and heart and milder expression in the liver, thymus, spleen, stomach, intestine, colon kidney and uterus. Upon mild hypothermia, for instance during hibernation or circadian variations of body temperatures, CIRBP expression is amplified via

the regulation of AS of its pre-mRNAs towards the shortest protein-coding isoform in the brain of mice [3,20], in the heart of Syrian hamsters [21] and in *Xenopus* oocytes [22]. CIRBP expression is also largely impacted in cancer development, where it can act as an oncogene or as a tumor suppressor [6], depending on the tissue.

CIRBP localization is predominantly nuclear except in *Xenopus* oocytes [18], but the protein can be translocated to the cytoplasm and even released into the extracellular space upon specific stimulations, such as mild hypothermia, inflammation or exposure to ultraviolet (UV) light [2]. The spatiotemporal regulation of CIRBP functions is thus dictated by its shuttling across cell membranes. Although ubiquitously expressed, CIRBP protein-coding isoforms, localization and functions can thus differ depending on the tissue, or in specific pathophysiological contexts.

2.3. Functions of CIRBP in stress responses and inflammation

Despite its name, CIRBP responds to a plethora of stresses beyond hypothermia. It is also positively regulated by UV exposure [1] and mild hypoxia [23], and negatively regulated by inflammatory cytokines [24], heat shock [25], bacterial infection [16], low circulating glucose [26] and oxidative stress [27] (Fig. 1D). In response to these stressors, CIRBP acts itself as a gene expression regulator.

In rodents, mild hypothermia induces a change in CIRBP transcript isoform proportions by AS, which in turn favors CIRBP protein production [3,20,21,28]. CIRBP binding, preferentially on a 51-base pair motif located in the 3'-UTRs of mRNAs, has been shown to stabilize its targets, inhibit their deadenylation and increase their translation by interacting with eIF4G1 [10]. Conversely, the recruitment of CIRBP to membraneless organelles named stress granules (SGs) upon certain stresses has been shown to repress translation [11].

CIRBP targets are mostly involved in stress responses, but also in development, translation and circadian clock. CIRBP activation thus affects a large panel of cellular pathways, such as cell survival, cell death, proliferation, differentiation, tumorigenesis, telomere maintenance, etc. [2] (Fig. 1D). Recent evidence also points CIRBP as a player in responses to viral and bacterial infections, with a rather pro-infectious role [16,29].

Independently of its RNA-binding characteristics, extracellular CIRBP can also act as damage-associated molecular pattern (DAMP) upon its release, and then as a sensor of sepsis or hemorrhagic shock, thereby playing an important role as a mediator of inflammatory responses in macrophages, neutrophils, lymphocytes and dendritic cells [30].

The large panel of stressors to which CIRBP responds and the multiple pathways it impacts require a fine-tuning of its expression and function depending on conditions (Fig. 2).

3. Quantitative and qualitative regulations of CIRBP transcripts

A number of signaling pathways impact CIRBP expression. It is inhibited by TGF- β and TNF signaling in human and murine neurons [24], while the GSK3- β kinase not only phosphorylates the CIRBP protein, but also increases CIRBP mRNA levels during the development of Alzheimer's disease [31]. CIRBP expression is also inhibited by intracellular calcium influx in U-2 OS human cells [32]. In contrast, upon hypothermia, CIRBP expression is induced via the transient receptor potential vanilloid 4 TRPV4 receptor, although in a mechanism independent of this receptor ion channel activity [32]. Similar results were recapitulated with receptors TRPV3 and 8 of the same family [33]. CIRBP mRNA levels were also found up-regulated in response to porcine reproductive and respiratory

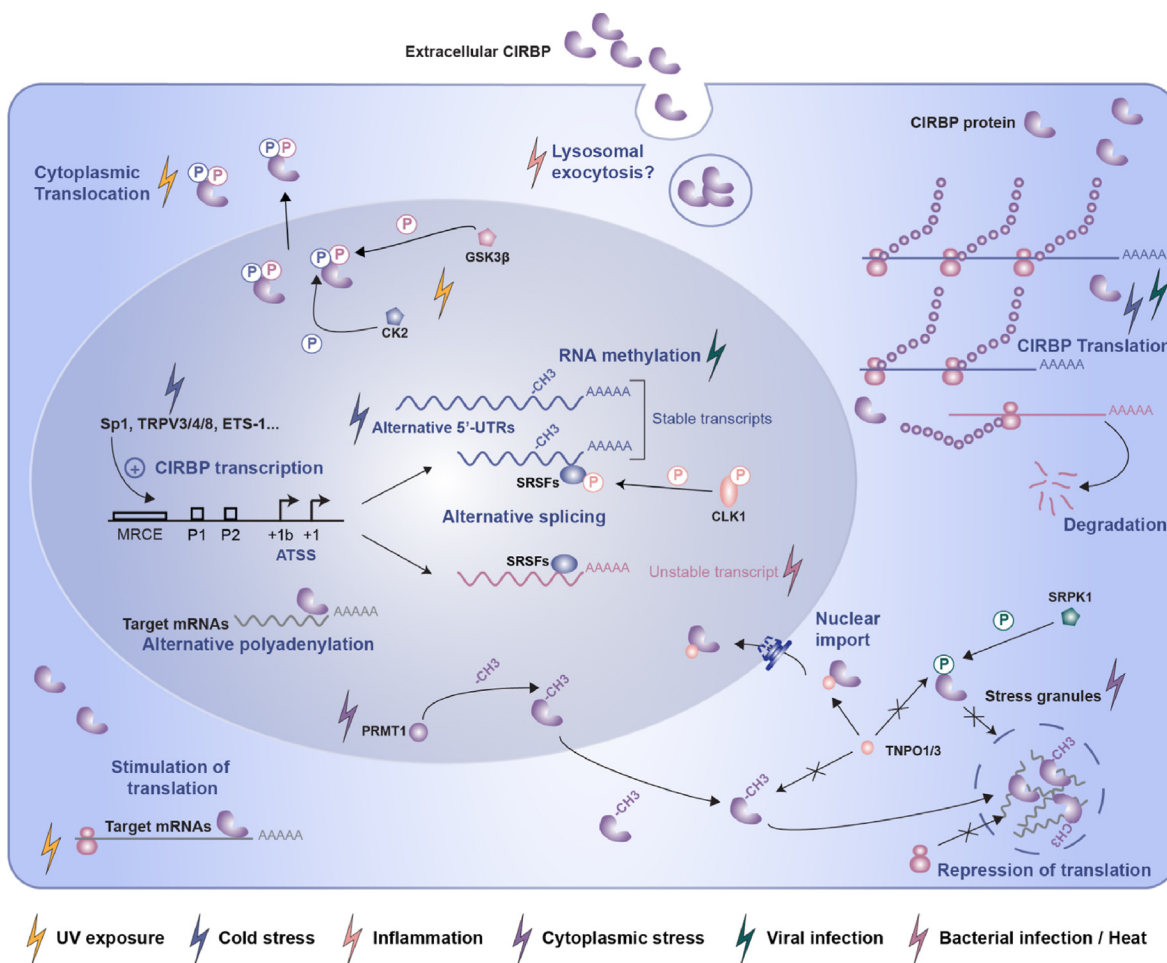


Fig. 2. CIRBP regulation levels. Schematic representation of CIRBP regulation events and their associated stresses. CIRBP is regulated at the transcriptional, splicing, translational and post-translational levels. Regulation is stress-type-dependent and affects CIRBP cellular localization and molecular function in cells.

syndrome virus (PRRSV) [34], and by avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog-1 ETS-1 in Thp1 cells [35] as driver of inflammation.

3.1. Regulation by CIRBP transcription

The first evidence of CIRBP regulation at the transcription level were brought by the observation that CIRBP could be transcribed from two alternative transcription start sites (TSS) upon cold shock in murine neuronal cells [36]. The isoform with the longest 5'-UTR also harbored an internal ribosome entry site (IRES), possibly promoting CIRBP cap-independent translation in a context where overall cellular translation is diminished. Further studies showed that these isoforms were under the control of two promoters, bound by a different set of transcription factors in response to cold [37]. Another study detected the presence of a temperature sensitive element within the first intron of the canonical isoform, which allowed response to circadian temperature oscillations [28]. This study also showed that neither CIRBP pre-mRNA levels, nor RNA polymerase II occupancy on the CIRBP locus were affected by cold. This suggests a splicing-dependent regulation of CIRBP levels upon temperature variations. In HEK293T cells, another temperature-responsive element was identified in the 5' region upstream of the promoter, called mild-cold responsive element (MCRE) [38]. This GC-rich octa-nucleotide, found within 1,000 bp of the transcription start site, acts as a transcriptional enhancer responsive to Sp1 binding. While the interaction in normothermia and mild

hypothermia conditions is low, it is enhanced upon cold stress, when Sp1 accumulates in the nucleus, thereby increasing CIRBP transcription.

Altogether, these results suggest diverse mechanisms of regulation of CIRBP transcription, through alternative promoters, transcription start sites, enhancers or other regulatory motifs (Fig. 2). Yet, since most studies were performed in the context of hypothermia, transcriptional regulation of CIRBP in the context of stressors that repress CIRBP expression, like heat shock, would deserve further investigation.

3.2. Alternative splicing in favor of the canonical CIRBP transcript increases its stability and protein production

Beyond usage of alternative TSSs as described above, alternative splicing events have also been shown to finely tune the representation of CIRBP mRNA isoforms and subsequent protein production (Fig. 2). Two CIRBP mRNA isoforms with different expression pattern were initially described in the context of circadian cycles [3] and hibernation [39]. In the hearts of hibernating animals, long isoforms of CIRBP that harbor a retained intron and a premature stop codon are predominantly expressed in euthermia, but are spliced in favor of a shorter, protein-coding isoform in hibernation condition. This splicing results in a rapid increase in CIRBP protein expression as part of the response to cold. Splicing is also involved in CIRBP expression regulation upon daily temperature oscillations, as addition of the splicing inhibiting drug spliceostatin A abolished

CIRBP accumulation upon mild hypothermia [28].

Broadened use of high-depth RNA-sequencing resulted in more detailed insight into CIRBP splicing patterns in different conditions. In the context of viral infection of human Huh7 cells, m⁶A-RNA-immunoprecipitation followed by sequencing has revealed another splicing-dependent regulation of CIRBP [29], where an isoform encoding a 32-kDa version of CIRBP was spliced in favor of the shorter, canonical protein coding transcript. A methylation mark, placed in the coding sequence near the last exon-exon junction of the canonical isoform, was lost upon infection, resulting in reduced intron retention. This resulted in sustained expression of the short, canonical form of CIRBP despite general translation inhibition upon infection. A similar loss in methylation and effect on CIRBP AS was also observed upon Thapsigargin-induced endoplasmic reticulum (ER) stress [29].

3.3. Alternative splicing towards non-canonical CIRBP transcripts decreases their stability and protein expression

In the context of heat shock, where CIRBP overall expression is decreased [28], an opposite mechanism of regulation by AS has been recently described. High-resolution RNA-sequencing data has revealed that, upon hyperthermia (38°C and over), reduced CIRBP expression was most likely due to a preferential splicing of its pre-mRNAs into an unstable mRNA isoform instead of the canonical one [25]. The two isoforms encode almost identical proteins, but they diverge in their 3'-UTRs, in which the unstable isoform harbors an exon-exon junction, rendering it sensitive to degradation by NMD [25,40]. The reduced stability of this transcript results in decreased overall CIRBP mRNA and protein levels. This regulation of AS has been linked to the stress responsive kinase CLK1. Upon heat shock, inhibition of the activity of CLK1 leads to the dephosphorylation of serine-arginine-rich splicing factors (SRSFs). In turn, modulation of the activity of SRSFs leads to a switch in the splicing of many genes, including CIRBP.

A very similar regulation of CIRBP has recently been identified in the context of bacterial infection of human epithelial cells [16]. The invasive bacterium *Listeria monocytogenes* secretes a pore-forming toxin, listeriolysin O (LLO), the cytolytic activity of which inhibits CLK1 and SRSF phosphorylation, then leading to CIRBP isoform switch towards the above-mentioned NMD-sensitive transcript and to a subsequent decrease in overall CIRBP expression. The switch impacts the cell response to bacterial infection, as expression of the canonical isoform favors infection, while the unstable one appears to be anti-bacterial, although the limited difference in the sequence of the two protein products (4 C-terminal amino-acids are missing in the product of translation from the unstable isoform) does not in principle give much latitude for extensive functional divergence between the two protein isoforms. Coincidentally, a shift in CIRBP-bound targets from housekeeping genes to stress-response targets was observed upon *Listeria* infection, in line with CIRBP contributing to cellular responses to infection-induced stress.

In cervical and uterine cancer cells, AS of CIRBP affecting its polyadenylation site in favor of less stable isoforms with shorter 3'-UTRs, and subsequent decrease in protein expression, negatively impact the prognosis of patients [41].

Alternative splicing of CIRBP thus allows a fine tuning of its expression, mostly centered around the intertwining of the production of the canonical isoform with that of other isoforms of different stability and/or coding potential (Fig. 2). In response to opposite types of stresses (cold versus heat, or high versus low circulating glucose levels [26]), fine-tuned modulation of CIRBP splicing and expression can craft an appropriate response for each condition.

4. Subcellular localization of CIRBP governs its functions

4.1. Intracellular CIRBP is decorated by post-translational modifications

The canonical CIRBP protein has been shown to be the target of several post-translational modifications, mostly affecting its cellular localization and subsequent function (Fig. 2). The homolog of CIRBP in *Xenopus*, xCIRBP, can interact *in vitro* with the arginine methyltransferase xPRMT1 [18]. Further experiments have shown that, in HeLa cells overexpressing xPRMT1 and transfected with xCIRBP, the latter was methylated in its RGG domain by xPRMT1, which induced its translocation from the nucleus to the cytoplasm. The methylation-dependent shuttling of CIRBP towards the cytoplasm has since been observed in other cells lines (Simian COS, human HeLa and murine NIH3T3) upon heat shock, oxidative, osmotic or ER stress [11], and is enhanced upon PRMT1 overexpression [18]. In these stress conditions, following relocalization of methylated CIRBP to the cytoplasm, it is targeted to SGs, which act as mRNA-sequestering platform upon certain stresses. This relocalization requires an intact RRM, suggesting that it is dependent on CIRBP RNA-binding properties [11]. When recruited to SGs, CIRBP acts as a translational repressor *via* the interaction of its unstructured RGG region, but not its RRM, with sequestered mRNAs. As mentioned above, this repressive function inside SGs contrasts with the previously-described role of CIRBP as facilitating the translation of its target mRNAs in the cytoplasm [9], emphasizing the strong impact of CIRBP localization on its function.

Detailed investigation of CIRBP nucleo-cytoplasmic shuttling has revealed that its nuclear localization is dictated by the interaction between its RGG and RSY domains with the transportins TNPO1 and TNPO3 respectively [19]. Through the disruption of CIRBP liquid-liquid phase separation (LLPS) in presence of RNA, the transportins outcompete the recruitment of CIRBP to SGs. When CIRBP is methylated in its RGG domain, in contrast, the transportins, and especially TNPO1, dissociate, which opposes nuclear import, LLPS and recruitment to SGs. A following study showed that ATP binding to CIRBP was also able to disrupt LLPS and recruitment to SGs, probably by competing with RNA binding to the RGG [42]. Recently, the SRPK1 kinase was shown to phosphorylate CIRBP on the RGG domain, thereby impeding CIRBP LLPS *in vitro* and its recruitment to SGs in HeLa cells, maybe by competing with PRMT1 for CIRBP availability [43]. Moreover, CIRBP phosphorylation by SRPK1 also impedes its recruitment by TNPO1.

The control of CIRBP localization by phosphorylation is substantiated by other studies. Indeed, in human RKO cells exposed to UV light, CIRBP is phosphorylated in its RGG, first by the CK2 kinase and then, on multiple sites by the GSK3 β kinase [10]. These modifications induce its translocation from the nucleus to the cytoplasm, where it interacts with many target mRNAs, including that of the genotoxic stress associated kinase ATR, and increases its expression. Phosphorylation of CIRBP by GSK3 β upon UV exposure additionally impacts its binding activity to targets such as thioredoxin (TRX) [9]. Interestingly, although SGs are formed upon UV exposure, CIRBP is not recruited to these compartments in this context [13]. Neither is it translocated to the cytoplasm in response to mild hypothermia [11], emphasizing yet again the versatility of CIRBP regulation mechanisms as a means to adapt its function to various stresses. Various redundant or complementary mechanisms are thus deployed, in an intricate network of regulations, to adjust the sub-cellular localization of CIRBP and thereby tightly control its function within the cells (Fig. 2).

4.2. Extracellular CIRBP

In addition to its intracellular role, CIRBP has been characterized

as a DAMP that is translocated to the extracellular space in patients and murine models undergoing hemorrhagic shock or sepsis, and in macrophages under hypoxic stress [44] (Fig. 2). How exactly CIRBP is translocated from the cytoplasm to the extracellular space remains unclear, but as CIRBP lacks a signal peptide, its translocation through the canonical ER-Golgi route has been ruled out. Cell fractionation experiments detected CIRBP enriched in the lysosomal fraction, indicating that CIRBP could be released through lysosomal exocytosis. Another hypothesis suggests that cell necrosis releases CIRBP in the circulation where it can bind as a DAMP to the TLR4 receptors of neighbor cell and induce the release of inflammatory cytokines through activation of the NF- κ B pathway, of the inflammasome through NLRP3, or through NETosis [30]. After its release, extracellular CIRBP is mostly involved in organizing inflammatory responses.

5. Conclusions and future challenges

CIRBP regulation is multileveled, tissue-, cell type- and species-dependent, with sometimes opposed roles liable to a specific context. Although large parts of its regulatory pathways have been deciphered in various stress conditions, the precise molecular mechanism that govern CIRBP regulation at the transcript, protein or cellular localization level in a given context are still incomplete. The rise in the use of long-read sequencing technologies should help to clarify the diverse AS events affecting CIRBP expression and to pinpoint their consequences on transcript stability and protein expression. They could also shed light on apparent contradictory functions of CIRBP in distinct contexts, in case they depend on the expression of alternative isoforms.

Another argument in favor of systematically reviewing CIRBP expression patterns in any given condition also lies in its therapeutic potential. Indeed, it is already thoroughly described as a key factor in the development of many cancers [2], inflammatory diseases [6], degenerative pathologies [31], in responding to viral [29] and bacterial [16] infections, and more. Its role in the development of cancers is dual; while CIRBP is mostly described as a strong oncogene relevant in aggressive prognosis for melanoma, breast, colon and prostate cancers as well as in the induction of metastasis [2], it can also act as a tumor suppressor in other pathological conditions, such as gynecological and nasopharyngeal cancers [45,46]. Enhancing CIRBP expression through so-called therapeutic hypothermia has launched promising anti-apoptotic effects resulting in protection against organ injury in animal models of ischemia and cardiac failure [47,48]. Some strategies, like CIRBP neutralizing antibodies [49], the use of the small CIRBP-derived peptide C23 [50], or using CIRBP as a vaccination platform [51] already yield promising results in treating hepatic ischemia, sepsis or tumoral targeting. Given the utmost significance of this factor in disease outcome, research on its regulation represents a tempting track of development relevant to public health.

Funding

MC received a doctoral fellowship from the MESRI (Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation) and from LabEx MemoLife (ANR-10-LABX-54) under the program "Investissements d'Avenir" managed by the French national research agency.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to the members of the group Bacterial infection, response & dynamics for their team spirit and careful proofreading of the manuscript, as well as to Alexandra Louis for helping with phylogeny.

References

- [1] M.S. Sheikh, F. Carrier, M.A. Papatheanasiou, M.C. Hollander, Q. Zhan, K. Yu, A.J. Fornace, Identification of several human homologs of hamster DNA damage-inducible transcripts: cloning and characterization of a novel UV-inducible cDNA that codes for a putative RNA-binding protein, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 26720–26726, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26720>.
- [2] P. Zhong, H. Huang, Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein, *Future Sci. OA* 3 (2017), <https://doi.org/10.4155/foa-2017-0077>.
- [3] H. Nishiyama, J.H. Xue, T. Sato, H. Fukuyama, N. Mizuno, T. Houtani, T. Sugimoto, J. Fujita, Diurnal change of the cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) expression in mouse brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 534–538, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8482>.
- [4] A.J. Fornace, I. Alamo, M.C. Hollander, DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 8800–8804.
- [5] H. Nishiyama, K. Itoh, Y. Kaneko, M. Kishishita, O. Yoshida, J. Fujita, A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 899–908, <https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.899>.
- [6] D.A. Lujan, J.L. Ochoa, R.S. Hartley, Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 9 (2018), <https://doi.org/10.1002/wrna.1462>.
- [7] K. Coburn, Z. Melville, E. Aligholizadeh, B.M. Roth, K.M. Varney, F. Carrier, E. Pozharski, D.J. Weber, Crystal structure of the human heterogeneous ribonucleoprotein A18 RNA-recognition motif, *Acta Crystallogr. F* 73 (2017) 209–214, <https://doi.org/10.1107/S2053230X17003454>.
- [8] Y. Liu, W. Hu, Y. Murakawa, J. Yin, G. Wang, M. Landthaler, J. Yan, Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation, *Sci. Rep.* 3 (2013), <https://doi.org/10.1038/srep02054>.
- [9] R. Yang, D.J. Weber, F. Carrier, Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogeneous ribonucleoprotein A18, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 1224–1236, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj519>.
- [10] R. Yang, M. Zhan, N.R. Nalabothula, Q. Yang, F.E. Indig, F. Carrier, Functional significance for a heterogeneous ribonucleoprotein A18 signature RNA motif in the 3'-untranslated region of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related (ATR) transcript, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8887–8893, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013128>.
- [11] F. De Leeuw, T. Zhang, C. Wauquier, G. Huez, V. Krusys, C. Gueydan, The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 4130–4144, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.09.017>.
- [12] S. van Nocker, R.D. Vierstra, Two cDNAs from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains, *Plant Mol. Biol.* 21 (1993) 695–699, <https://doi.org/10.1007/BF00014552>.
- [13] C. Yang, F. Carrier, The UV-inducible RNA-binding protein A18 (A18 hnRNP) plays a protective role in the genotoxic stress response, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47277–47284, <https://doi.org/10.1074/jbc.M105396200>.
- [14] A. Indacochea, S. Guerrero, M. Ureña, F. Araujo, O. Coll, M.E. Lleonart, F. Gebauer, Cold-inducible RNA binding protein promotes breast cancer cell malignancy by regulating Cystatin C levels, *RNA* 27 (2021) 190–201, <https://doi.org/10.1261/rna.076422.120>.
- [15] J. Morf, G. Rey, K. Schneider, M. Stratmann, J. Fujita, F. Naef, U. Schibler, Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression post-transcriptionally, *Science* 338 (2012) 379–383, <https://doi.org/10.1126/science.1217726>.
- [16] M. Corre, V. Boehm, V. Besic, A. Kurowska, A. Viry, A. Mohammad, C. Sénamaud-Beaufort, M. Thomas-Chollier, A. Lebreton, Alternative splicing of the stress-sensitive regulator CIRBP sharpens the cellular response to bacterial infection, 2023.01.18.524578, <https://doi.org/10.1101/2023.01.18.524578>, 2023.
- [17] P.A. Chong, R.M. Vernon, J.D. Forman-Kay, RGG/RG motif regions in RNA binding and phase separation, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 4650–4665, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.014>.
- [18] K. Aoki, Y. Ishii, K. Matsumoto, M. Tsujimoto, Methylation of *Xenopus* CIRP2 regulates its arginine- and glycine-rich region-mediated nucleocytoplasmic distribution, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 5182–5192, <https://doi.org/10.1093/nar/gkf638>.
- [19] B. Bourgeois, S. Hutten, B. Gottschalk, M. Hofweber, G. Richter, J. Sternat, C. Abou-Ajram, C. Göbl, G. Leitinger, W.F. Graier, D. Dormann, T. Madl, Nonclassical nuclear localization signals mediate nuclear import of CIRBP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2020), <https://doi.org/10.1073/pnas.1918944117>.
- [20] Y. Horii, T. Shiina, S. Uehara, K. Nomura, H. Shimaoka, K. Horii, Y. Shimizu,

- Hypothermia induces changes in the alternative splicing pattern of cold-inducible RNA-binding protein transcripts in a non-hibernator, the mouse, *Biomed. Res.* 40 (2019) 153–161, <https://doi.org/10.2220/biomedres.40.153>.
- [21] Y. Horii, H. Shimaoka, K. Horii, T. Shiina, Y. Shimizu, Mild hypothermia causes a shift in the alternative splicing of cold-inducible RNA-binding protein transcripts in Syrian hamsters, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 317 (2019) R240–R247, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00012.2019>.
- [22] K. Matsumoto, K. Aoki, N. Dohmae, K. Takio, M. Tsujimoto, CIRP2, a major cytoplasmic RNA-binding protein in *Xenopus* oocytes, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 4689–4697, <https://doi.org/10.1093/nar/28.23.4689>.
- [23] S. Wellmann, C. Bühner, E. Moderegger, A. Zelmer, R. Kirschner, P. Koehne, J. Fujita, K. Seeger, Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1785–1794, <https://doi.org/10.1242/jcs.01026>.
- [24] M. Lopez, D. Meier, A. Müller, P. Franken, J. Fujita, A. Fontana, Tumor necrosis factor and transforming growth factor β regulate clock genes by controlling the expression of the cold inducible RNA-binding protein (CIRBP), *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 2736–2744, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508200>.
- [25] T. Haltenhof, A. Kotte, F. De Bortoli, S. Schiefer, S. Meinke, A.-K. Emmerichs, K.K. Petermann, B. Timmermann, P. Imhof, A. Franz, B. Loll, M.C. Wahl, M. Preußner, F. Heyd, A conserved kinase-based body-temperature sensor globally controls alternative splicing and gene expression, *Mol. Cell* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.028>.
- [26] H. Zhao, H. Kong, B. Wang, S. Wu, T. Chen, Y. Cui, RNA-binding proteins and alternative splicing genes are coregulated in human retinal endothelial cells treated with high glucose, *J. Diabetes Res.* 2022 (2022), 7680513, <https://doi.org/10.1155/2022/7680513>.
- [27] J.H. Xue, K. Nonoguchi, M. Fukumoto, T. Sato, H. Nishiyama, H. Higashitsuji, K. Itoh, J. Fujita, Effects of ischemia and H2O2 on the cold stress protein CIRP expression in rat neuronal cells, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1238–1244, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00158-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00158-6).
- [28] I. Gotic, S. Omidif, F. Fleury-Olela, N. Molina, F. Naef, U. Schibler, Temperature regulates splicing efficiency of the cold-inducible RNA-binding protein gene *Cirbp*, *Genes Dev.* 30 (2016) 2005–2017, <https://doi.org/10.1101/gad.287094.116>.
- [29] N.S. Gokhale, A.B.R. McIntyre, M.D. Mattocks, C.L. Holley, H.M. Lazear, C.E. Mason, S.M. Horner, Altered m⁶A modification of specific cellular transcripts affects flaviviridae infection, *Mol. Cell* 77 (2020) 542–555, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.007>, e8.
- [30] M. Aziz, M. Brenner, P. Wang, Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 106 (2019) 133–146, <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1118-443R>.
- [31] G.-P. Liu, Y. Zhang, X.-Q. Yao, C.-E. Zhang, J. Fang, Q. Wang, J.-Z. Wang, Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits protein phosphatase-2A and the underlying mechanisms, *Neurobiol. Aging* 29 (2008) 1348–1358, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.012>.
- [32] T. Fujita, H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, Y. Liu, K. Itoh, T. Sakurai, T. Kojima, S. Kandori, H. Nishiyama, M. Fukumoto, M. Fukumoto, K. Shibasaki, J. Fujita, TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2295, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02473-x>.
- [33] T. Fujita, Y. Liu, H. Higashitsuji, K. Itoh, K. Shibasaki, J. Fujita, H. Nishiyama, Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495 (2018) 935–940, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.136>.
- [34] X. Xiao, W. Zhang, D. Hua, L. Zhang, W. Meng, J. Huang, L. Zhang, Cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP) promotes porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced inflammatory response, *Int. Immunopharm.* 86 (2020), 106728, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106728>.
- [35] Q. He, H. Gao, Y.-L. Chang, X. Wu, R. Lin, G. Li, J. Lin, H. Lu, H. Chen, Z. Li, Y. Cong, J. Yao, Z. Liu, ETS-1 facilitates Th1 cell-mediated mucosal inflammation in inflammatory bowel diseases through upregulating CIRBP, *J. Autoimmun.* 132 (2022), 102872, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102872>.
- [36] M.B. Al-Fageeh, C.M. Smales, Cold-inducible RNA binding protein (CIRP) expression is modulated by alternative mRNAs, *RNA* 15 (2009) 1164–1176, <https://doi.org/10.1261/rna.1179109>.
- [37] M.B. Al-Fageeh, C.M. Smales, Alternative promoters regulate cold inducible RNA-binding (CIRP) gene expression and enhance transgene expression in mammalian cells, *Mol. Biotechnol.* 54 (2013) 238–249, <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9649-5>.
- [38] Y. Sumitomo, H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, Y. Liu, T. Fujita, T. Sakurai, M.M. Candeias, K. Itoh, T. Chiba, J. Fujita, Identification of a novel enhancer that binds Sp1 and contributes to induction of cold-inducible RNA-binding protein (*cirp*) expression in mammalian cells, *BMC Biotechnol.* 12 (2012) 72, <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-72>.
- [39] Y. Sano, T. Shiina, K. Naitou, H. Nakamori, Y. Shimizu, Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 462 (2015) 322–325, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.135>.
- [40] A. Neumann, S. Meinke, G. Goldammer, M. Strauch, D. Schubert, B. Timmermann, F. Heyd, M. Preußner, Alternative splicing coupled mRNA decay shapes the temperature-dependent transcriptome, *EMBO Rep.* 21 (2020), e51369, <https://doi.org/10.15252/embr.202051369>.
- [41] C. Shang, Y. Li, Z. Wu, Q. Han, Y. Zhu, T. He, H. Guo, The prognostic value of DNA methylation, post-translational modifications and correlated with immune infiltrates in gynecologic cancers, *Pharmacogenomics Pers. Med.* 14 (2021) 39–53, <https://doi.org/10.2147/PGPM.S293399>.
- [42] Q. Zhou, S. Usluer, F. Zhang, A.J. Lenard, B.M.R. Bourgeois, T. Madl, ATP regulates RNA-driven cold inducible RNA binding protein phase separation, *Protein Sci.* 30 (2021) 1438–1453, <https://doi.org/10.1002/pro.4123>.
- [43] A.J. Lenard, S. Hutten, Q. Zhou, S. Usluer, F. Zhang, B.M.R. Bourgeois, D. Dormann, T. Madl, Phosphorylation regulates CIRBP arginine methylation, transportin-1 binding and liquid-liquid phase separation, *Front. Mol. Biosci.* 8 (2021), 689687, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.689687>.
- [44] X. Qiang, W.-L. Yang, R. Wu, M. Zhou, A. Jacob, W. Dong, M. Kuncewitch, Y. Ji, H. Yang, H. Wang, J. Fujita, J. Nicastro, G.F. Coppa, K.J. Tracey, P. Wang, Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis, *Nat. Med.* 19 (2013) 1489–1495, <https://doi.org/10.1038/nm.3368>.
- [45] A.A. Hamid, M. Mandai, J. Fujita, K. Nanbu, M. Kariya, T. Kusakari, K. Fukuhara, S. Fujii, Expression of cold-inducible RNA-binding protein in the normal endometrium, endometrial hyperplasia, and endometrial carcinoma, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 22 (2003) 240–247, <https://doi.org/10.1097/01.PGP.0000070851.25718.EC>.
- [46] T.-Y. Lin, Y. Chen, J.-S. Jia, C. Zhou, M. Lian, Y.-T. Wen, X.-Y. Li, H.-W. Chen, X.-L. Lin, X.-L. Zhang, S.-J. Xiao, Y. Sun, D. Xiao, Loss of *Cirbp* expression is correlated with the malignant progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma, *Cancer Manag. Res.* 11 (2019) 6959–6969, <https://doi.org/10.2147/CMAR.S211389>.
- [47] Y.-J. Sun, S. Ma, B. Fan, Y. Wang, S.-R. Wang, G.-Y. Li, Therapeutic hypothermia protects photoreceptors through activating *Cirbp* pathway, *Neurochem. Int.* 126 (2019) 86–95, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.006>.
- [48] L. Wu, H.-L. Sun, Y. Gao, K.-L. Hui, M.-M. Xu, H. Zhong, M.-L. Duan, Therapeutic hypothermia enhances cold-inducible RNA-binding protein expression and inhibits mitochondrial apoptosis in a rat model of cardiac arrest, *Mol. Neurobiol.* 54 (2017) 2697–2705, <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9813-6>.
- [49] A. Godwin, W.-L. Yang, A. Sharma, A. Khader, Z. Wang, F. Zhang, J. Nicastro, G.F. Coppa, P. Wang, Blocking cold-inducible RNA-binding protein protects liver from ischemia-reperfusion injury, *Shock* 43 (2015) 24–30, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000251>.
- [50] N.-L. Denning, W.-L. Yang, L. Hansen, J. Prince, P. Wang, C23, an oligopeptide derived from cold-inducible RNA-binding protein, suppresses inflammation and reduces lung injury in neonatal sepsis, *J. Pediatr. Surg.* 54 (2019) 2053–2060, <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.12.020>.
- [51] L. Silva, J. Egea, L. Villanueva, M. Ruiz, D. Llopiz, D. Repáraz, B. Aparicio, A. Lasarte-Cia, J.J. Lasarte, M. Ruiz de Galarreta, A. Lujambio, B. Sangro, P. Sarobe, Cold-inducible RNA binding protein as a vaccination platform to enhance immunotherapeutic responses against hepatocellular carcinoma, *Cancers* 12 (2020), <https://doi.org/10.3390/cancers12113397>.

3.3.2.2 Régulations additionnelles

Outre les mécanismes de régulation de CIRBP présentés dans la revue [322] vient s'ajouter un nouveau niveau de régulation [326]. Effectivement, des études rapportent que l'expression de CIRBP est aussi contrôlée par la méthylation de son locus dans le génome. En cas d'hypoxie chronique, la baisse d'activité de la protéine TET induit une hyper-méthylation de 5 motifs riches en GC le long du gène (figure 3.34 A), en particulier un situé dans le promoteur de CIRBP. En conséquence, en cas d'hypothermie, le facteur de transcription SP1, mentionné comme régulateur dans l'article [327], ne peut plus se lier à l'élément de réponse au froid dans le promoteur. En conséquence, l'expression de CIRBP n'est pas induite en réponse à l'hypothermie [326]. La méthylation de l'ADN de CIRBP a aussi été caractérisée comme marqueur pronostique de l'évolution des cancers gynécologique [328], dans une étude qui montre que, bien que l'expression de CIRBP soit diminuée par rapport à des cellules saines, une hyper-méthylation du locus de CIRBP est associée à une baisse de survie des patients. Ces études indiquent que la méthylation (i) du promoteur de CIRBP (ii) de la séquence du gène codant CIRBP participent à sa régulation et mérite d'être étudiée, que ce soit dans une optique de compréhension de la régulation de CIRBP ou de développement thérapeutique.

Dans la revue consacrée à la régulation de CIRBP [322], nous décrivons la phosphorylation de CIRBP par la kinase GSK3 β dans le contexte du stress UV [329] dans des cellules épithéliales de colon, ce qui lui permet de sortir du noyau vers le cytoplasme. Il a été montré que CIRBP est phosphorylé par cette même kinase en cas d'hypothermie dans des cellules épithéliales de bronches, *via* la voie TRPM8 [Ca²⁺] PKC α GSK3 β [330]. En cas d'hypothermie ou de cancer du sein, CIRBP serait aussi adressé aux granules de stress. Il est même décrit comme essentiel à leur formation dans des cellules pulmonaires et de cancer du sein [331,332], mais de manière toujours dépendante de la méthylation de son domaine RGG [331], comme décrit pour des fibroblastes murins exposés à un stress oxydatif [289].

Dans des cellules épithéliales dérivées d'ostéosarcome, CIRBP peut être recruté de manière transitoire aux niveaux des cassures double-brin par la poly-(ADP-ribosylation) induite par la protéine PARP-1 [333]. L'exclusion de CIRBP des cassures double-brin nécessite la phosphorylation de la thréonine 43, dans le RRM et de la sérine 146 dans le RGG, par les kinases PIKK [333], ajoutant deux nouvelles modifications post-traductionnelles à la longue liste déjà décrite (figure 3.34 B).

Enfin, dans un effort d'étudier l'interaction de CIRBP avec le métabolome de la cellule, une étude a montré que CIRBP interagissait avec l'ATP et ses dérivés (ADP, AMP) ainsi qu'avec les agents réducteurs NAD⁺, NADH et NADP⁺ [334]. En particulier, l'interaction de CIRBP avec l'ATP *in vitro* inhibe sa capacité à promouvoir de la séparation de phase liquide-liquide en présence d'ARN (LLPS). Toutefois, ces résultats restent à être validés dans un modèle plus physiologique pour pouvoir conclure quant à leur pertinence biologique.

Ces résultats additionnels ajoutent donc de nouvelles couches de complexité à la régulation de CIRBP, renforçant ainsi l'idée que le contrôle fin de son expression permet d'organiser la réponse de la cellule à une variété de contextes changeants.

3.3.3 Fonctions de CIRBP

En miroir de la diversité des mécanismes de régulation de CIRBP, ce facteur est lui-même impliqué dans la régulation de nombreuses voies cellulaires, que ce soit en réponse à un stress ou dans une optique de maintien de l'intégrité des fonctions cellulaires. Si ses fonctions ont été évoquées dans la revue [correctionColdinducibleRNAbinding2023a], elles seront plus détaillées dans les paragraphes suivants, afin de mieux rendre compte de la place centrale de CIRBP dans le fonctionnement cellulaire.

Dans sa fonction principale, CIRBP est une protéine de liaison à l'ARN qui se lie préférentiellement dans la région 3'-UTR de ses ARN cibles et affecte leur stabilité et leur traduction. Par ailleurs, CIRBP peut aussi être considéré comme une molécule de signalisation (Damage-associated molecular pattern, DAMP) dans des contextes particuliers comme l'inflammation ou la septicémie.

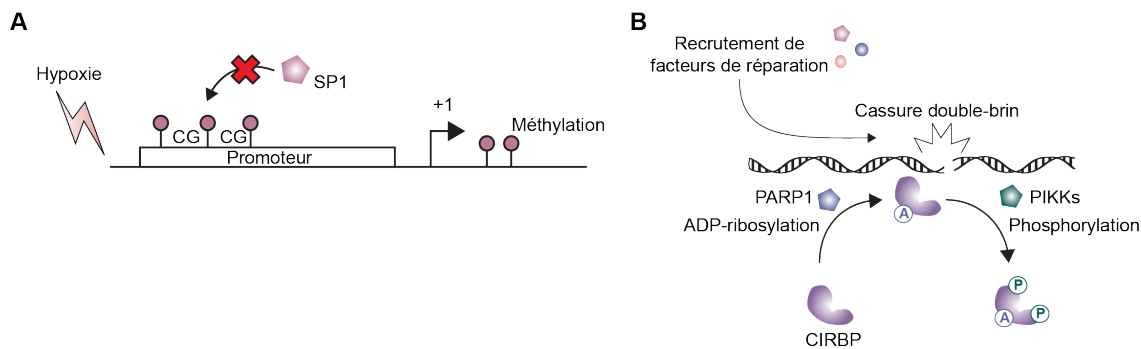


Figure 3.34: Régulations additionnelles de CIRBP. (A) l'hyperméthylation du promoteur de CIRBP en cas d'hypoxie inhibe la liaison du facteur de transcription SP1 et l'expression de CIRBP. (B) L'ADP-ribosylation de CIRBP conduit la protéine aux cassures double-brin de l'ADN, où elle recrute des facteurs de réparation, avant d'être dissociée par phosphorylation par les PIKK.

3.3.3.1 CIRBP comme coordinateur de la réponse au stress

3.3.3.1.1 Stress environnemental et cellulaire

Bien qu'initialement étudié dans la réponse à l'hypothermie, CIRBP répond à tout type de stress biotique comme abiotique. Ici, je décris de manière non-exhaustive les principaux stress régulés par CIRBP et les mécanismes sous-jacents.

Hypothermie: CIRBP a initialement été identifié dans le contexte de l'hypothermie modérée [335] dans des fibroblastes murins, où son expression se retrouve augmentée. Cette augmentation a pour conséquence une baisse de la prolifération cellulaire par allongement de la phase G1 du cycle cellulaire [335], où CIRBP se lie au 5'-UTR de p27^{(Kip)1}, un inhibiteur des complexes cycline E/CDK2 et cycline D/CDK4 qui bloque la cellule en G1 [336]. Cet effet semble toutefois dépendant du type cellulaire, puisque ce n'est pas le cas dans la lignée CHO de cellules ovariennes de hamster chinois [337]. L'augmentation de CIRBP en réponse au froid a été par la suite démontrée dans des macrophages [338] et certains tissus nerveux comme le cortex cérébral, l'hippocampe [339,340], mais absente dans d'autres tissus cérébraux comme l'hypothalamus [339], des neurones primaires [341], la lignée microgliale BV-2 en monoculture [340]. Dans des cellules souches neuronales, l'induction de CIRBP en cas d'hypothermie préserve les cellules par inhibition de l'apoptose [342], par l'activation de la voie ERK1/2 par phosphorylation. ERK1/2 est un couple de kinase appartenant à la famille des MAPK (Mitogen activated protein kinases) et a généralement une action anti-apoptotique [343] et pro-inflammatoire [344]. De fait, il a été démontré que CIRBP protégeait la lignée de fibroblastes murins BALB/3T3 de l'apoptose induite par TNF- α par l'activation de la voie ERK1/2 [345] et l'inhibition de la caspase 8 [345]. Le lien fonctionnel entre CIRBP et ERK1/2 dans la protection des cellules contre l'hypothermie a été reconfirmé dans des études postérieures, où l'augmentation de l'expression de CIRBP dans des cellules hépatiques [346] et d'hypothalamus [347] en condition d'hypothermie s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 et d'une protection contre l'apoptose.

Dans des cellules pulmonaires exposées à l'air froid, l'expression de MUC5AC, impliqué dans la production de mucus pulmonaire, est augmentée, de concert avec une augmentation de l'expression des récepteurs TLR4 et de la phosphorylation de p65 (RelA), une sous-unité de la voie canonique de NF- κ B [348] et de l'activation de la voie ERK 1/2 [349]. Ces changements d'expression semblent dépendants de l'augmentation de l'expression de CIRBP induite par le froid et suggèrent ici aussi un rôle protecteur de CIRBP des cellules pulmonaires saines par le contrôle de la production de mucus [348]. Toutefois, dans le cas de maladies comme la maladie d'obstruction pulmonaire chronique (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD), la surexpression constante de CIRBP induit une surproduction de mucus [331], et la surexpression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8, etc.) et de HIF-1 α , indiquant un état d'hypoxie CIRBP-dépendant délétère à la cellule. Cette étude montre aussi une interaction directe de CIRBP avec le 3'-UTR des cytokines pro-inflammatoires listées et la stabilisation de ces transcrits, ce qui renforce le caractère central de CIRBP dans la réponse inflammatoire et l'importance de sa régulation.

Dans les muscles squelettiques, l'expression de CIRBP en cas d'hypothermie va induire la voie AKT, impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire [350], qui à son tour, va favoriser le métabolisme du glucose pour maintenir les niveaux d'énergie dans les muscles et ralentir l'apoptose [351].

Enfin, il a été montré que CIRBP avait un rôle central dans le maintien de l'activité télomérase en cas d'hypothermie, où elle se trouve naturellement inhibée. CIRBP se lierait directement à l'ARN TERC, nécessaire à l'assemblage de la télomérase, et le localiserait aux corps de Cajal, où l'enzyme s'assemble [352]. De même, CIRBP régulerait positivement l'expression de TERT, en se liant à son ARN par son domaine RGG. Les fonctions de CIRBP en condition d'hypothermie sont résumées dans la figure 3.35.

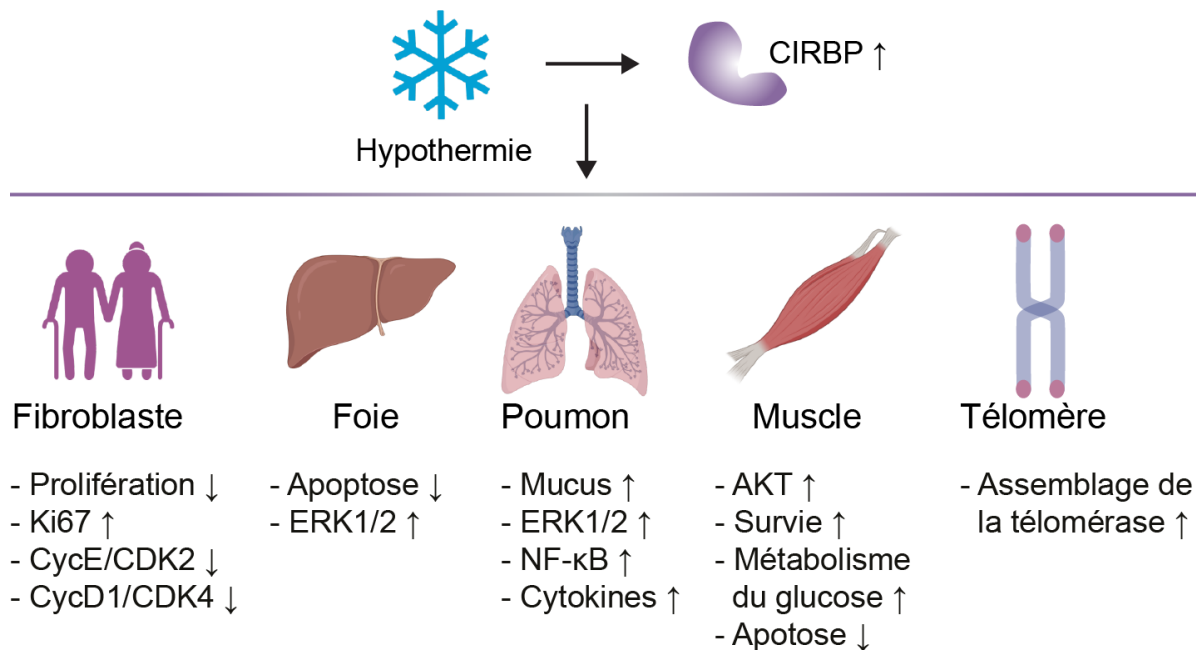


Figure 3.35: Effets de la hausse d'expression de CIRBP en condition d'hypothermie.

Bien qu'initialement étudié dans le contexte du stress froid, CIRBP a par la suite été impliqué dans beaucoup d'autres conditions de stress, décrites ci-dessous et illustrées dans la figure 3.36.

Hyperthermie: A l'inverse de ce qui a été décrit pour le stress froid et en plus des régulations décrites dans la revue [322], l'expression de CIRBP dans le cas d'un stress chaud diminue dans le tissu testiculaire de souris [353], mais aussi de poulet [354] et dans le foie des saumons [355]. Dans le tissu testiculaire, et malgré la baisse de son expression en cas de stress chaud, il semblerait que CIRBP protège encore la spermatogenèse en favorisant l'expression de la cycline B1, pour éviter l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules [356,357]. Étonnamment, il a été décrit que CIRBP régulerait aussi la survie des spermatozoïdes à l'hyperthermie en promouvant l'expression et la phosphorylation de ERK1/2 [358]. La protection des cellules contre l'apoptose *via* l'activation de la voie ERK1/2 est également observable en cas d'hypothermie, ce qui est assez contradictoire puisque dans un cas, CIRBP est induit et dans l'autre, il est réprimé. Les signaux cellulaires additionnels permettant à CIRBP d'induire la même protection contre l'apoptose dans les deux cas ne sont pas complètement définis, tout en n'excluant d'autres rôles spécifiques de CIRBP en fonction des conditions.

UV: En parallèle de sa caractérisation initiale en réponse à l'hypothermie, CIRBP a aussi été originalement découvert dans le contexte du stress induit par une exposition aux UV [359], qui peut provoquer des dommages à l'ADN. Comme mentionné précédemment, dans ce contexte, CIRBP est recruté aux granules de stress où il inhibe la traduction de ses ARN cibles [289]. Le rôle de CIRBP dans la réponse aux UV semble effectivement central puisque son inhibition dans les kératinocytes les rend hypersensibles aux UV et induit une perte de la phosphorylation de STAT3, d'expression de la cycline D1 et de la protéine anti-apoptotique BAG-1, indiquant que CIRBP promeut la survie cellulaire à l'exposition aux UV, par la voie STAT3/BAG-1. [360]. Plus précisément, l'exposition aux UVB

induit l'expression de CIRBP, qui régule positivement la phosphorylation et donc l'activité de la kinase JAK et du facteur de transcription NF- κ B, eux-même impliqués dans la phosphorylation de STAT3 [361]. Toujours en réponse aux UV et dans une optique de réparation de l'ADN, CIRBP induit aussi l'expression de la thioredoxine et de la protéine RPA, toutes deux impliquées dans la réponses aux dommages à l'ADN, en favorisant l'interaction des transcrits avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G [313,362].

Domage à l'ADN: Au-delà des dommages provoqués par les UV, CIRBP est aussi impliqué dans la réparation de l'ADN en général notamment en favorisant l'expression de la kinase ATR, recrutée en cas de cassures simple-brin de l'ADN [329]. CIRBP serait aussi recruté au niveau des cassures double-brin par poly(ADP-ribosylation) par la protéine PARP-1, de manière transitoire. En réponse, CIRBP induit l'interaction entre la kinase ATM et MRN, nécessaire à la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN, soit la recombinaison homologue ou le NHEJ [333].

3.3.3.1.2 Rôle de CIRBP dans les infections virales et bactériennes

Bien que les infections, par des bactéries, des virus ou des parasites, soient une source majeure de stress cellulaire, CIRBP n'a que très peu été étudié dans ce contexte, malgré son rôle de régulateur de stress et de l'inflammation. Pourtant, dans des cellules infectées par des *flaviridae* (virus de la dengue, du zika, du West Nile et de l'hépatite C), la cellule subit des changements de méthylation des ARN, qui amènent à la baisse d'expression d'un isoforme non-fonctionnel et non-codant de CIRBP [318]. Il est suggéré que baisser l'expression des isoformes non-codants permettrait de favoriser la traduction des isoformes codants et donc de maintenir un niveau de protéine CIRBP basal même en cas de baisse générale de la traduction. Cette même étude montre un rôle pro-viral de CIRBP mais le mécanisme sous-jacent à sa stabilisation et son rôle dans les infections virales n'a pas été établi. Dans le cas des infections chez le porc avec le PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), il a été montré que CIRBP migrait du noyau vers le cytoplasme et était recocalisé aux granules de stress, comme lors de l'exposition aux UV, et induit une réponse inflammatoire *via* la régulation de NF- κ B et un stress oxydatif par la production de ROS. Cependant, l'impact de CIRBP sur la progression de l'infection n'a pas été étudié [363]. Concernant les infections bactériennes, CIRBP a été décrit comme surexprimé chez *Hexagrammos otakii*, un poisson du pacifique très consommé en Asie, dans le cas de l'infection par *Vibrio harveyi*. Très récemment, il a été montré que eCIRBP ralentissait l'élimination de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par la phagocytose par les macrophages [364], notamment par la baisse de l'expression de ARP2, RAC1, β PIX et de la phosphorylation de la cofiline, toutes impliquées dans la motilité cellulaire et la modulation de la dynamique de l'actine. L'inhibition de l'activité de ces protéines se ferait par l'activation de la voie STAT3 par CIRBP, notamment en réduisant le taux de β PIX par la formation du complexe STAT3/ β PIX [364] (figure 3.36). La rareté des études de CIRBP dans le cadre de l'infection et le manque de profondeur quant à son rôle dans la régulation de cette dernière justifie donc l'intérêt que je lui ai porté au cours de ma thèse.

3.3.3.1.3 CIRBP et cancer, un oncogène et un suppresseur de tumeur

Par son rôle important dans le contrôle de l'inflammation, de l'apoptose et de la prolifération cellulaire, l'expression de CIRBP commence à être déterminée dans plusieurs types de cancers. Par exemple dans les carcinomes rénaux, CIRBP est surexprimé et agit comme un oncogène car associé à la prolifération tumorale [365]. Comme dans le cas de l'hypothermie, le rôle de CIRBP dans l'oncogenèse est dual, parfois même au sein d'un même tissu. Le rôle de CIRBP dans différents cancers est illustré par la figure 3.37.

CIRBP dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) : L'EMT est un marqueur d'évolution du cancer, où les cellules passent d'une forme "adhésive" où elles ont besoin de support vers une forme un mode de vie en suspension, où elles sont alors plus invasive en permettant la dissémination métastatique, ce qui traduit donc une aggravation de la situation pour le patient [366]. Dans des lignées de cellules cancéreuses A549 (poumons) et Huh7 (foie), il est décrit que TGF- β 1 favorisait l'expression de CIRBP. En conséquence, une baisse des marqueurs épithélias et une hausse des marqueurs mésenchymateux sont observées. Ce phénomène est au moins partiellement lié à la capacité de CIRBP à surexprimer SNAIL, un facteur clé de l'EMT, *via* l'activation de ERK1/2 et de p38 [367]. Le rôle de CIRBP dans l'induction de l'EMT le rend donc pertinent dans le contexte de l'étude de nouveaux oncogènes.

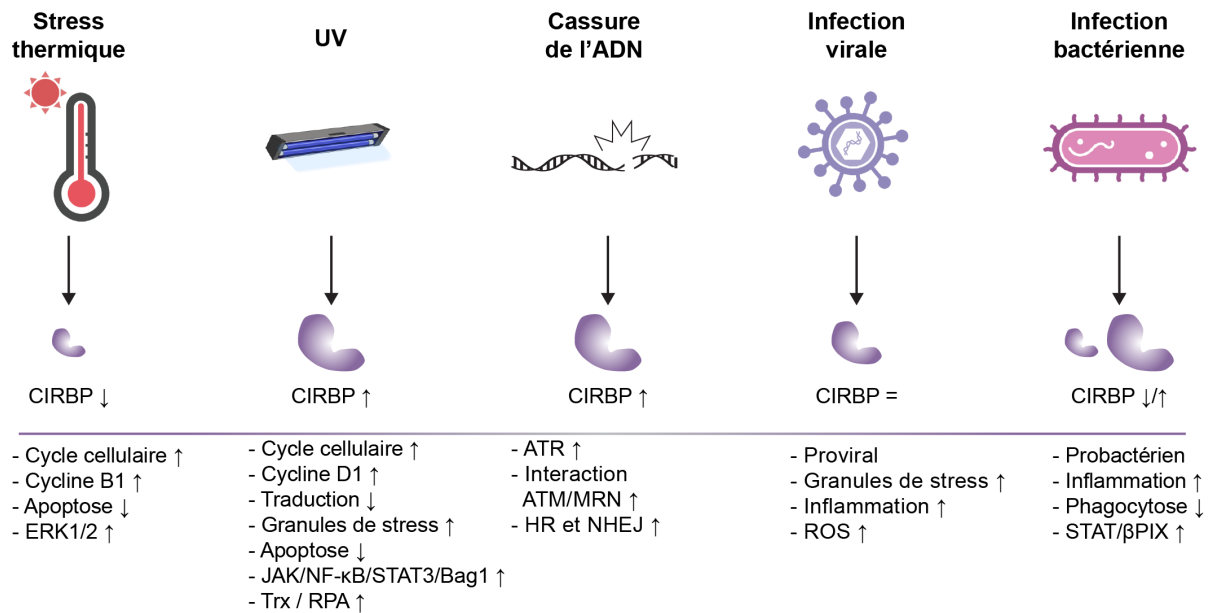


Figure 3.36: Régulation et rôle de CIRBP en réponse à de multiples stress.

Cancer du cerveau : Concernant les tissus cérébraux, dans le cas de l'adénome hypophysaire, l'expression de CIRBP y est supérieure que dans les tissus sains [368,369] et est associée avec une augmentation de la prolifération cellulaire par la régulation positive de la cycline D1 et l'inhibition de p27, un inhibiteur du cycle cellulaire, par l'activation de la voie ERK1/2 [369]. L'expression de CIRBP dans ces tumeurs est corrélée avec un mauvais pronostic de survie et aussi avec le risque de récurrence de la tumeur, le classant ainsi parmi les oncogènes. Dans un autre type de tumeur cérébrale, les glioblastomes, il a été décrit que, dans un contexte d'échec thérapeutique du bevacizumab (un inhibiteur de VEGF), cette molécule inhibe l'expression de CIRBP et entraîne l'expression du facteur CXCL12, qui promeut la migration cellulaire, et est initialement inhibé par CIRBP. Ceci entraîne donc une aggravation de l'évolution du cancer. Dans ce cas de figure, il semblerait que CIRBP ait plutôt un rôle antitumoral en régulant négativement la migration des cellules [370]. Enfin, CIRBP est surexprimé dans les métastases de cerveau hautement invasives et est associé avec un mauvais pronostic et une capacité d'invasion métastatique accrue [371,372].

Cancer du sein : Dans les cancers du sein, CIRBP se comporte aussi généralement comme un oncogène, en régulant de nombreuses voies cellulaires impliquées dans la transformation tumorale. Dans des cellules MCF-7, issues d'une patiente atteinte d'un carcinome canalaire invasif, CIRBP va former un complexe avec la protéine HuR et agir comme un agoniste de l'expression de la cycline E1, favorisant donc la prolifération cellulaire [332]. De même, dans ces cellules, CIRBP a été décrit pour réprimer l'expression du suppresseur de tumeur Cystatine C et promeut la malignité des tumeurs [373]. A partir de bases de données d'expression des gènes dans de nombreux cancers du sein, une étude [374] a identifié le rôle de CIRBP dans l'épissage de FAM110B en faveur d'un isoforme qui perturberait le métabolisme des acides gras et favoriserait l'apparition de métastases au niveau des os. En contradiction avec ces observations, la quantification de CIRBP dans le sérum de patientes atteintes de carcinome canalaire montre une baisse significative par rapport à des patientes saines, cependant cette baisse de CIRBP circulant est aussi associée à la transition du carcinome canalaire vers une forme invasive du cancer du sein [375].

Cancers gastro-intestinaux : Une autre grande classe de cancer touche le tube digestif. Si dans le cancer du colon, la surexpression de CIRBP serait plutôt associée à un meilleur pronostic [376], c'est l'inverse dans le carcinome oral squameux, où la surexpression de CIRBP et de TLR4 est associée avec avec une très courte survie [377]. Étonnamment, dans les cancers associés aux colites, aussi localisés au niveau du côlon et induits par une inflammation chronique de la région, une autre étude montre que CIRBP y est surexprimé et associé avec un mauvais pronostic [378]. Dans ce contexte, CIRBP promeut l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-23, IL-27), de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xl) et de marqueurs de cellules souches (SOX2, BMI1 ou LGR5). Ces observations suggèrent que le rôle de CIRBP dans le développement des cancers du côlon serait

contexte-dépendant.

Cancers du foie et du pancréas: Les cancers du foie et du pancréas font partie des cancers avec le plus mauvais pronostic. Dans le développement des hépatocarcinomes (HCC), CIRBP est surexprimé dans les hépatocytes et induit l'accumulation de ROS, la surexpression de CD133, un facteur de migration et d'invasion tumorale et une réponse inflammatoire par la régulation de IL-1 β et IL-6. De plus, la surexpression de CIRBP dans les HCC est liée à un risque accru de récurrence [379] et, ce qui place clairement CIRBP comme un oncogène dans ce cas. En revanche, la surexpression de CIRBP dans les cellules immunitaires NK (natural killers) infiltrées dans le foie a un effet protecteur sur la survie de ces cellules et joue donc un rôle antitumoral dans la réponse immunitaire contre la tumeur [380]. Aussi dans le cas de l'adénocarcinome canalaire pancréatique, CIRBP est surexprimé et associé à un mauvais pronostic, en favorisant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales et en conférant aux cellules une résistance à la gemcitabine, utilisée en chimiothérapie. L'effet de CIRBP dans ce contexte serait médié par la surexpression de DYRK1B et l'augmentation de la phosphorylation de p38 et donc de son activité, étonnamment au détriment de l'activité de ERK, pourtant un partenaire central de CIRBP [381]. Dans une autre lignée cellulaire dérivée d'adénocarcinome pancréatique (BxPc3), CIRBP est sous-régulé et cette baisse d'expression est corrélée à un mauvais pronostic. Dans cette lignée, CIRBP est essentiellement nucléaire et peut se lier directement à p53 et GP4X et inhiber leurs fonctions. L'axe p53/GPX4 étant décrit pour inhiber un procédé de mort cellulaire, la ferroptose [382], il est suggéré dans une étude [383] que la déficience en CIRBP réduise aussi la ferroptose et promeuve ainsi la prolifération des cellules cancéreuses. Dans cette lignée, CIRBP aurait donc un rôle antitumoral.

Cancer des voies aériennes : Les cancers des voies aériennes touchent de nombreux tissus, des cellules nasales aux cellules pulmonaires. Dans des cellules A549, dérivées d'alvéoles pulmonaires, le composé dihydroartémisinine (DHA) a montré des effets prometteurs en baissant le taux de mitophagie (utilisation des composants mitochondriaux à des fins de production d'énergie qui peut conférer une résistance des tumeurs aux traitements cancéreux) et de résistance aux radiations des cellules. Cet effet serait lié à l'inhibition de CIRBP et donc de la régulation positive qu'il exerce sur la voie PINK1/parkin, qui favorise la mitophagie [384]. Un autre exemple de rôle controversé de CIRBP dans le développement des tumeurs est dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules (Non-small cell lung cancer, NSCLC). Si dans les stades précoces du développement du cancer, la surexpression de CIRBP a un effet protecteur et est positivement corrélée à la survie du patient [385], celle-ci aura un autre impact si la maladie évolue. En effet, dans des lignées cellulaires dérivées de NSCLC plus établis, la surexpression de CIRBP est associée avec un mauvais pronostic et promeut la prolifération, migration et invasion des cellules cancéreuses, notamment en favorisant le passage de la phase G1 à S [386]. Plus précisément, cette étude décrit que CIRBP se lie aux 5'- et 3'-UTR de CTNNB1, qui code la β -caténine, et stabilise le transcrite pour favoriser sa traduction. La β -caténine est le cofacteur de Wnt. A eux deux, ils favorisent l'expression de gènes de prolifération comme c-myc ou VEGFA. Enfin, dans le cancer du nasopharynx, l'expression de CIRBP est réduite proportionnellement à l'avancée du cancer et la perte de CIRBP est associée avec un mauvais pronostic [387].

Cancers et hypoxie : Le développement de cancers dans des contextes d'hypoxie a déjà été largement décrit [388]. CIRBP étant impliqué dans la réponse à l'hypoxie, il était pertinent de regarder son évolution dans des cellules cancéreuses en condition d'hypoxie. Dans des cellules de mélanomes [389] et de cancer de la vessie [390], la croissance de la tumeur semble positivement corrélée à l'expression de CIRBP. En effet, CIRBP y promeut l'expression de HIF-1 α et permet l'adaptation des cellules à l'environnement hypoxique, ce qui favorise leur prolifération, invasion et migration. Dans le cas des mélanomes, la régulation positive de HIF-1 α promeut l'expression de facteurs pro-angiogénique, permettant à la tumeur de s'approvisionner en oxygène [389], et la surexpression de CIRBP suffit aussi à conférer aux cellules une résistance aux radiations ionisantes [391]. Dans les cellules de vessie, la surexpression de HIF-1 α inhiberait l'expression de PTGIS, un suppresseur de prolifération.

Cancers gynécologiques et génitaux: C'est dans les cancers de l'endomètre et des ovaires que CIRBP se comporte comme un suppresseur de tumeur. Par exemple, dans il a été décrit que, dans une cohorte de femmes atteintes de cancers de l'endomètre, CIRBP était fortement sous-exprimé par rapport à des femmes saines. Le fait que son expression soit inversement proportionnelle à celle du facteur de prolifération Ki-67 au cours du cycle menstruel suggère que CIRBP pourrait participer à contrôler le cycle cellulaire et que la perte de son expression participe au développement de tumeurs [392]. La sous-expression de CIRBP dans les cellules tumorales de l'endomètre est également associée à un mauvais pronostic [393,394]. Chez les hommes, CIRBP n'a été décrit que dans le cas du cancer de la prostate, où l'inhibition de CIRBP atténue la survie cellulaire, indiquant un rôle pro-tumoral. Cette

d'Alzheimer. Cependant, ces résultats sont en contradiction partielle avec ceux d'une autre étude, qui démontre un effet protecteur de CIRBP contre la toxicité des plaques β -amyloïdes, en maintenant les flux potassiques et le potentiel de membrane des neurones, et par son action anti-apoptotique et antioxydante dans le cerveau [398]. On peut imaginer une action différentielle de CIRBP sur TAU et le peptide β -amyloïde, ou un effet dépendant de l'évolution de la maladie, mais son rôle bénéfique/délétère dans le développement de la maladie d'Alzheimer reste pour l'instant flou.

Le rôle de CIRBP a aussi été déterminé pour d'autres maladies dégénératives et inflammatoires, comme le diabète, où CIRBP a été trouvé surexprimé dans deux cas de figures : dans des cellules placentaires atteintes de diabète gestationnel [399] et dans des cellules rétinienne de souris diabétiques [400]. Ces résultats suggèrent que CIRBP pourrait participer au développement de la maladie, notamment par ses fonctions de réponse à l'hypothermie (baisse de la température dans les rétines de souris diabétiques) ou pro-inflammatoires [400]. De manière intéressante, CIRBP est contrôlé par un microARN dans les ovaires (miR-383-5). La perte d'expression de ce microARN dans le cas du syndrome des ovaires polykystiques induit une surexpression de CIRBP et une activation de la voie PIK3/AKT, favorisant l'apparition des kystes [401]. Enfin, l'expression de CIRBP est négativement corrélée à l'apparition des lésions dans les cas de psoriasis [402] mais positivement corrélée au développement de la maladie de Still chez les adultes [403].

Concernant les maladies circulatoires, CIRBP a été décrit dans le contexte de l'hypertension pulmonaire artérielle [404], où la baisse de son expression inhibe aussi l'expression de la Cavéoline1 et de la Cavéine1, déjà décrites pour être essentielles à l'intégrité des cellules pulmonaires [405]. En conséquence, les cellules deviennent plus sensibles à l'apoptose et on observe un développement de blessures liées à l'hypertension pulmonaire. Plus particulièrement, CIRBP serait un acteur central de la protection des cellules cardiaques en cas de stress. Effectivement, en cas d'arrêt cardiaque induit par un stress oxydatif, l'expression de CIRBP se retrouve réduite et est associée à une baisse de la survie des cardiomyocytes et au développement de pathologies cardiaques [406]. Ce résultat a été validé plus tard dans le contexte général de la réponse au stress des cellules cardiaque, où CIRBP a un effet protecteur sur le maintien de la plasticité du nodule sino-artériel (sino-arterian node), en contrôlant l'expression des phosphodiesterases et la concentration en cAMP. CIRBP protégerait aussi de l'arythmie cardiaque en liant le 3'-UTR des KCDN4.2, KCDN4.3 et KCDN1.5 et modulant ainsi l'expression des canaux de transports d'ions [407,408]. Si l'importance de l'expression de CIRBP lors des pontages coronariens pour son rôle de protection contre l'hypoxie a été soulignée, une autre étude définit le rôle de CIRBP dans la protection de la barrière hémato-encéphalique, où CIRBP en circulation maintient l'intégrité de la barrière en inhibant cette fois l'expression de cytokines pro-inflammatoires et la dégradation des jonctions cellulaires [409]. Toutefois, comme souvent pour CIRBP, il existe aussi des situations dans lesquelles son expression n'est pas en faveur à la protection cardiaque. La restauration de la circulation du sang après un arrêt cardiaque induit une réaction inflammatoire systémique en raison de la haute teneur en cytokines générées lors de l'arrêt. Dans ce contexte, une augmentation de l'abondance de CIRBP dans le plasma (eCIRBP) peut être associée à une aggravation de la réaction inflammatoire au détriment du patient [410]. Ce même phénomène est observable en cas d'anévrisme de l'aorte abdominale, où CIRBP induit la surexpression de cytokines pro-inflammatoires [411].

Comme mentionné précédemment, CIRBP est aussi impliqué dans la régulation des maladies infectieuses et dans la mise place de réponses à de nombreuses conditions non-physiologiques, et se place donc comme un régulateur phare de l'inflammation. Son rôle dans ce mécanisme est par ailleurs très bien étudié et une mauvaise régulation de CIRBP peut d'ailleurs donné lieu au développement de maladies et syndrome inflammatoires, dont les septicémies.

3.3.3.2 CIRBP comme acteur de la réponse inflammatoire

L'inflammation est une réponse à vocation immunitaire qui intervient en cas de stress ou de trauma, comme des infections bactériennes, virales ou un choc hémorragique ou ischémique. A la suite de la détection du stress, souvent par des récepteurs de type TLR, des cellules immunitaires ou à capacité immunitaire vont induire des cascades de signalisation, comme les voies NF- κ B ou STAT3, qui vont aboutir à l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, etc.) [412] pour étendre à d'autres cellules la réponse inflammatoire. Si cette réaction inflammatoire est excessive ou chronique, elle peut engendrer des dommages aux tissus et des maladies inflammatoires chroniques [412]. Comme suggéré ci-dessus dans la description des différents rôles et

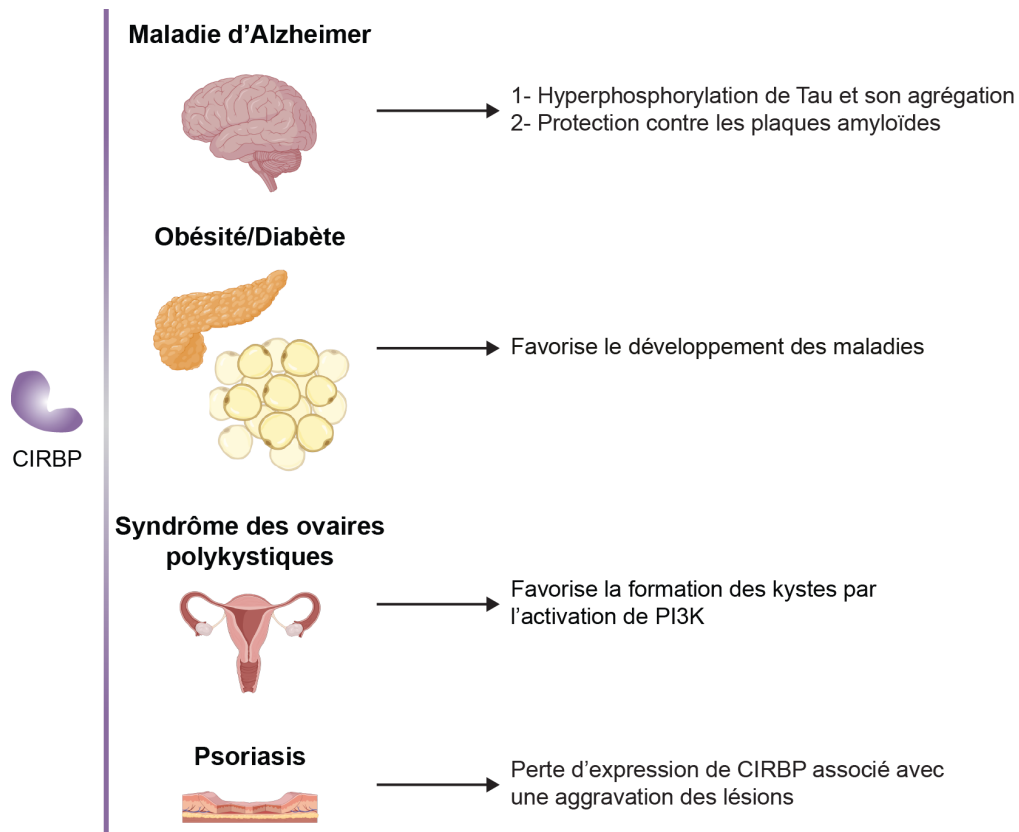


Figure 3.38: Implication de CIRBP dans le développement de pathologies. Sauf si précisé, CIRBP est surexprimé dans le développement des pathologies mentionnées.

partenaires de CIRBP, celui-ci à la fois régule et est régulé par l'inflammation en réponse à de nombreux stress.

3.3.3.2.1 CIRBP extracellulaire

La découverte de la sortie de CIRBP des cellules lors d'un choc hémorragique ou d'une septicémie a ouvert la voie à la découverte de nouvelles fonctions de CIRBP. Dans les macrophages et d'autres cellules immunitaires, CIRBP est surexprimé et transporté du noyau vers le cytoplasme puis vers le milieu extracellulaire (figure 3.39 A), vraisemblablement par transport lysosomal [413]. CIRBP va interagir avec TLR4 et induire une réponse inflammatoire en régulant de nombreux acteurs pro-inflammatoires [414] dont $\text{TNF-}\alpha$ [414], STING et la réponse interféron de type I [415], ainsi que $\text{NF-}\kappa\text{B}$, en initiant la dégradation de son inhibiteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ [416]. En conséquence, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, dont $\text{IL-1}\beta$, est observée (figure 3.39 B). Le rôle de eCIRBP est extensivement décrit dans la revue d'Aziz *et al.* [413], dont s'inspire le paragraphe suivant.

Dans les neutrophiles, eCIRBP va promouvoir la migration trans-endothéliale inverse et donc leur retour dans la circulation sanguine, provoquant donc un épanchement de la réponse inflammatoire au-delà du site concerné, ce qui peut engendrer des dommages [417]. De plus eCIRBP va induire un type de mort cellulaire programmée, la NETose (Neutrophil extracellular trap), définie par la libération dans l'espace extracellulaire de longues fibres de chromatine décorées d'histones et de protéines antibactériennes [418] (figure 3.40 A). L'association de eCIRBP avec TLR4 à la surface des neutrophiles va aussi induire l'expression de la protéine de surface CD112 qui, en interagissant avec des lymphocytes T, va induire leur différenciation en cellules Th1 et promouvoir la réponse interféron de type II [419] (figure 3.40 B). Dans des cellules endothéliales, eCIRBP stimule la production de ROS en activant la NAD(P)H oxydase, et peuvent aussi agir comme un signal de pré-activation de l'inflammasome en favorisant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, ce qui a pour conséquence une augmentation de la production de $\text{IL-1}\beta$ et du clivage de

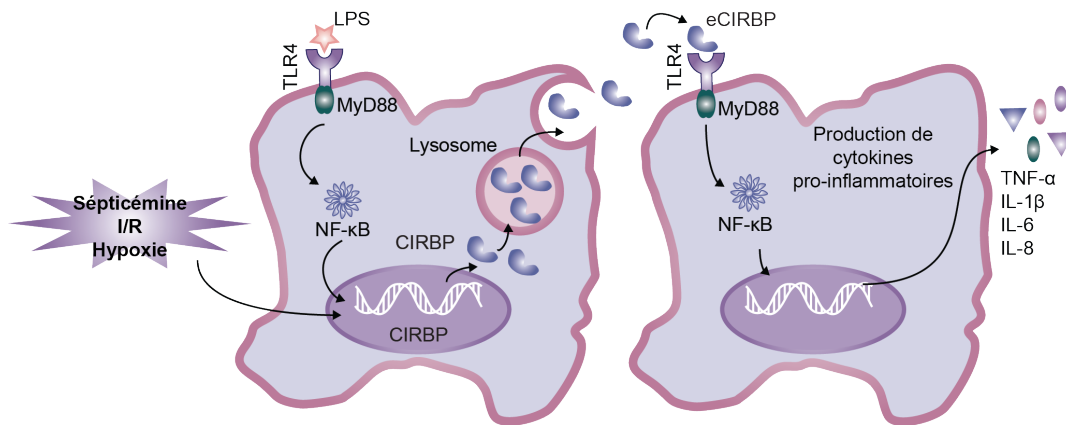


Figure 3.39: CIRBP extracellulaire, mécanisme général. Figure adaptée de Aziz et Wang [413]. (A) En réponse à certains stress, CIRBP va être libéré hors de la cellule, probablement par la voie lysosomale. (B) La liaison de eCIRBP à TLR4 induit une réponse inflammatoire et la production de cytokines.

la caspase 1 (figure 3.40 C). L'inflammasome NLRP3 étant impliqué dans la mort cellulaire par pyroptose en aval de cette signalisation, il peut donc engendrer des dommages aux organes [420].

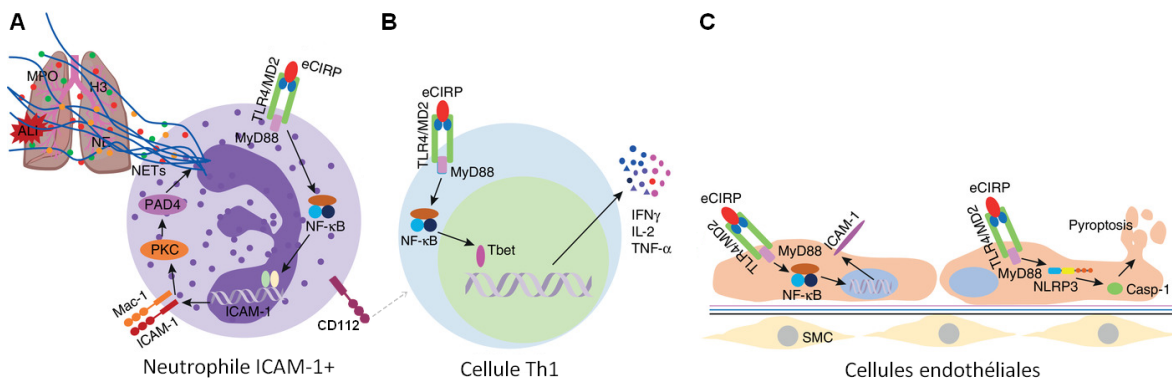


Figure 3.40: Effets de liaison de eCIRBP sur TLR4 dans différents types de cellules immunitaires. Figure adaptée de Aziz et Wang [413]. (A) Neutrophiles et induction de la NETose. (B) Différenciation des cellules Th1 et réponses interférons. (C) Activation de l'inflammasome dans les cellules endothéliales.

Dans les macrophages, l'association eCIRBP-TLR4-Myd88 (un adaptateur de TLR4) induit une augmentation des dommages mitochondriaux par l'activation de la NADPH oxydase et l'accumulation de ROS (figure 3.41). Les dommages à la mitochondrie vont induire la nécroptose des cellules et l'activation de l'autophagie [421]. Plus récemment, eCIRBP a été montré comme empêchant l'élimination des bactéries par phagocytose, en inhibant à travers la phosphorylation de STAT3, la polymérisation de l'actine et donc la motilité cellulaire [364]. eCIRBP aurait donc un rôle pro-bactérien. Similairement à la formation de NETs, eCIRBP peut aussi induire la formation de MET (macrophage extracellular traps) en activant l'inflammasome et en conséquence la gasdermine D, une cytolysine [422].

Etant un facteur de l'induction de l'inflammation, eCIRBP est aussi impliqué dans de multiples pathologies inflammatoires. Les dommages aigus aux poumons causés par une septicémie sont par exemple aggravés par eCIRBP et l'induction des marqueurs de l'inflammation (mort cellulaire, production de cytokines pro-inflammatoires, infiltration de cellules immunitaires, etc.) [423]. La présence de eCIRBP est aussi un facteur aggravant dans le cas de recto-coliques hémorragiques, où eCIRBP va perturber la muqueuse intestinale [424]. Dans le cas du syndrome du côlon irritable, eCIRBP va favoriser l'inflammation de la muqueuse [425] et peut même favoriser l'apparition de

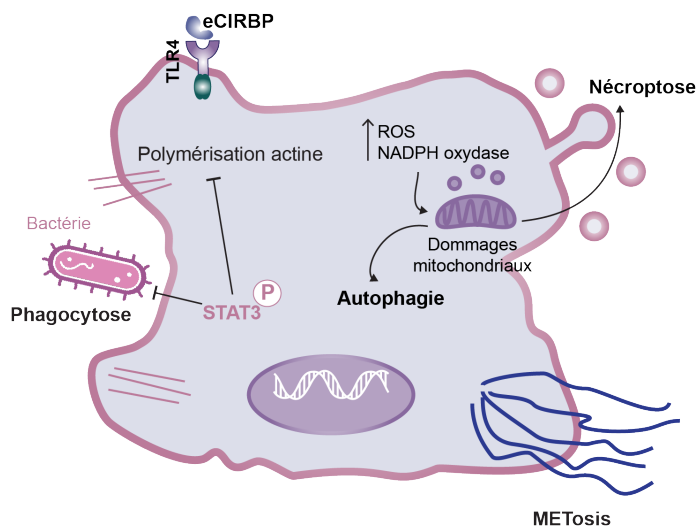


Figure 3.41: Effets de liaison de eCIRBP sur TLR4 dans les macrophages. Figure inspirée de Aziz et Wang [413].

cancer du côlon [378]. Dans le cas des pancréatites sévères, eCIRBP va perturber la motilité intestinale [426] et dans le cas des rhinosinusites chroniques, eCIRBP va favoriser le développement de polypes nasaux [427]. Enfin, une déficience en CIRBP promeut la cicatrisation des plaies cutanées, en favorisant la migration des cellules [428] et en accélérant la transition de la phase inflammatoire vers la phase de reformation des tissus [429].

La découverte de eCIRBP a permis de mieux comprendre les comportements, parfois contradictoires, de CIRBP dans des contextes similaires. Effectivement, si CIRBP intracellulaire joue un rôle essentiel de coordination de la réponse au stress, eCIRBP a une action pro-inflammatoire qui peut elle-même générer du stress perturber l'homéostasie cellulaire.

3.3.3.2 CIRBP et ischémie/reperfusion : ami ou ennemi ?

L'ischémie-reperfusion (IR) est une situation pathologique où un organe se retrouve privé d'apport sanguin pendant un certain temps, suivi d'une reperfusion de celui-ci. La privation en sang et donc en oxygène induit une condition hypoxique et la reperfusion, de manière contre-intuitive, aggrave souvent les dommages ischémiques notamment par la mise en place d'une réponse inflammatoire excessive [430] et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species, ROS). L'accumulation de stress et de dommages dans les cellules vont les mener vers des voies de mort cellulaire programmée et causer ainsi des blessures ischémiques aux organes.

Le principal facteur de réponse à la déprivation d'oxygène est HIF-1 α [431]. Dans des neurones, dans le cas d'une hypoxie modérée induite par une ischémie, une augmentation de l'expression de CIRBP a été observée et a pour conséquence la répression de l'expression de HIF-1 α et l'apoptose induite par HIF-1 α [432,433], indiquant que CIRBP serait impliqué dans la prévention des dommages ischémiques, potentiellement en étant régulé par un micro ARN, miR-23a [432] (figure 3.42 A). Ces deux études montrent aussi que, après une exposition prolongée à l'hypoxie, l'expression de CIRBP était fortement diminuée, et celle de HIF-1 α était donc augmentée, provoquant la mort des neurones et réduisant donc l'effet bénéfique de CIRBP aux stades précoces de l'ischémie (figure 3.42 B). Il est en effet décrit que la sous-expression de CIRBP en cas d'hypoxie sévère impacte le fonctionnement mitochondrial. En conséquence, la baisse de la production d'ATP et l'augmentation de la production de ROS ont des effets pro-apoptotiques qui, dans le cas des blessures ischémiques cérébrales, peuvent entre autre avoir un impact négatif sur la mémoire [434]. Pour revenir aux temps précoces de l'hypoxie, CIRBP protégerait aussi le cerveau des blessures hypoxiques par la promotion de l'expression de PSD95, un facteur important de l'intégrité morphologique des neurones et de la mémoire. L'effet protecteur de CIRBP contre les blessures ischémiques neuronales est confirmé par d'autres études [435,436], notamment par la capacité de CIRBP à réguler positivement la cycline D1 et donc le cycle cellulaire [435]. Dans le cœur, CIRBP aurait aussi un rôle protecteur contre les blessures hypoxiques en inhibant la voie NF- κ B, en promouvant la prolifération cellulaire et en réduisant le niveau de ROS [437]. Étonnamment,

l'effet de CIRBP sur l'expression de HIF-1 α semble être tissu- et contexte-dépendante. En effet, il a été rapporté un effet positif de CIRBP sur HIF-1 α dans les poumons [331] et dans des cellules cancéreuses de vessie [390].

Le rôle protecteur de CIRBP contre les blessures ischémiques est pourtant controversé. L'inflammation pouvant activer la sortie de CIRBP des cellules, cette action pourrait être délétère à la protection des neurones puisque eCIRBP (CIRBP extracellulaire) peut aggraver cette réaction inflammatoire par l'activation de NF- κ B [438,439] et provoquer des blessures ischémiques (figure 3.42 B). Dans les intestins, lors de la reperfusion, eCIRBP va, en tant que DAMP, activer la voie STING et la stimulation de la production d'interférons, ce qui active une réponse inflammatoire délétère à la cellule [440]. Une telle réponse est aussi décrite dans les reins [441], les poumons [442] et le foie [443,444]. Toujours dans les intestins, il a été décrit que CIRBP interagissait avec ELAVL1 (HuR) pour induire la ferroptose des cellules, un type de mort cellulaire programmée lié à l'oxydation des lipides [445]. Dans un modèle d'ischémie du membre, une déficience en CIRBP permet une meilleure régénération musculaire par stimulation de l'angiogenèse et une baisse de l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires [446]. Enfin, l'angiogenèse participe à la restauration de la vascularisation des organes après l'ischémie et CIRBP, en favorisant l'expression des micro ARN anti-angiogénique miR-329-3P et miR-495-3p, est donc un régulateur négatif de l'angiogenèse [447].

De manière générale, il semblerait que CIRBP ait un effet plutôt protecteur dans les temps précoces de l'ischémie en prévenant le développement de blessures ischémiques par inhibition de l'apoptose, mais si la condition dure, alors la réponse inflammatoire et la translocation de CIRBP vers le milieu extracellulaire notamment peuvent aggraver la situation.

Stress oxydatif: Comme décrit ci-dessus, l'hypoxie et l'ischémie prolongées amènent à la production de ROS, ce qui peut engendrer des dommages aux tissus.. Il a été montré que la présence de ROS seuls pouvait inhiber l'expression de CIRBP [448]. C'est donc peut-être l'accumulation de ROS qui induit la baisse d'expression de CIRBP au cours de l'hypoxie sévère. En réponse au stress oxydatif, il est décrit que CIRBP induit l'expression de NRF2, un facteur antioxydant. La perte de CIRBP va donc inhiber l'expression de NRF2 et conditionner les cellules vers l'apoptose induite par les ROS [449]. L'activation de NRF2 par CIRBP a aussi été documentée chez l'ours hibernant [450], où elle pourrait être à l'origine de la conservation de la masse musculaire au cours de l'hibernation par la réduction du stress oxydatif. La protection des cellules contre l'apoptose par CIRBP est appuyée par un autre article [451], où les auteurs rappellent aussi que la thioredoxine, une enzyme antioxydante, est une cible positivement régulée par CIRBP [313], indiquant donc sur son rôle crucial dans la réponse aux ROS. Une autre étude suggère que CIRBP contrôlerait la survie cellulaire aux ROS en activant la voie PI(3)K/AKT, impliquées dans l'adaptation de l'autophagie aux variations du taux de ROS [452].

3.3.3.3 Rôle de CIRBP dans le développement et le fonctionnement cellulaire

Au-delà de son implication dans le développement de nombreuses pathologies, CIRBP fonctionne en premier lieu comme un coordinateur important du développement et de plusieurs grandes fonctions cellulaires, allant de l'organogenèse à l'orchestration de plusieurs types de morts cellulaire programmées.

3.3.3.3.1 Développement

Organogenèse: L'implication des fonctions de CIRBP dans le développement des organismes a été particulièrement étudié chez le xénope et a été faite peu de temps après la découverte du gène lui-même (figure 3.43 A). Chez les xénopes, une expression transitoire de CIRBP a été observée dans les reins et le cerveau au cours du développement [453]. Son rôle dans le développement a été validé par la suite, en démontrant qu'il était une cible de XTcf-3, un facteur de transcription central au développement, et que l'inhibition de CIRBP induisait un défaut de développement du système nerveux [454]. Une autre étude plus approfondie a démontré que CIRBP était essentiel à la bonne migration des blastomères C3 [455], impliqués dans la formation des reins, mais favorisait aussi la traduction et l'expression de facteurs d'adhésion et de croissance [456]. Chez les mammifères, CIRBP a été particulièrement étudié dans le développement des gonades. Il a été identifié comme un protecteur du tissu testiculaire en cas de stress thermique, par sa fonction inhibitrice de p53 [457], par le maintien des barrières physiologiques [458] et par la régulation positive de facteurs de traduction, d'antioxydants et de facteurs de reproduction notamment impliqués dans la fertilité [459]. Enfin, en favorisant la progression du cycle cellulaire, CIRBP stimule la prolifération des

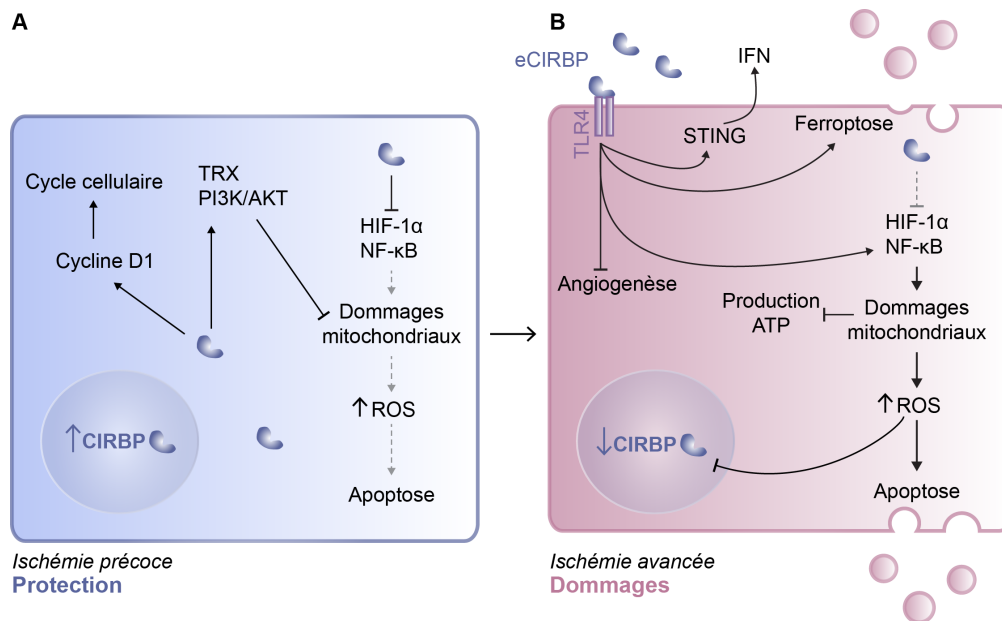


Figure 3.42: Rôle et régulation de CIRBP au cours de l'ischémie. (A) Effets protecteurs de CIRBP au cours de l'ischémie précoce. (B) Rôle pro-inflammatoire de CIRBP au cours de l'ischémie avancée.

spermatogonies non différenciées, la première étape vers la spermatogenèse [460]. Bien qu'un rôle de CIRBP dans la spermatogenèse soit fortement suspecté, des études complémentaires seraient nécessaires à sa validation. Chez les femelles, bien que moins étudié, CIRBP a été lié au développement des glandes mammaires chez les souris [461], et à la protection du tissu endométrial au cours du cycle menstruel chez les bovins, en protégeant certains tissus de l'apoptose [462] et à l'établissement des corps de Balbiani chez le poisson-zèbre lors de l'ovogenèse [463]. Ici aussi, de futures études seraient bienvenues pour cerner le rôle de CIRBP dans le développement des gonades.

CIRBP dans les reptiles: Comme décrit dans la revue [322], la protéine CIRBP est très conservée et chez les reptiles et les urodèles, où elle présente plus de 70% de similarité avec son homologue humain [464]. Son étude dans ces organismes a permis de lui attribuer des fonctions dans des processus absents chez de les mammifères, comme la régénération des membres ou la détermination du sexe en fonction de la température (temperature-dependent sex determination, TSD). Chez les axolotls et les tritons, CIRBP favorise la régénération des membres [465] et jouerait un rôle cyto-protecteur au cours de ce processus [466]. La TSD est un phénomène où la température à laquelle se développe les œufs influe sur le sexe de l'individu. Chez les tortues marines, une température chaude va favoriser la naissance de femelles. Il a été décrit que CIRBP était surexprimé dans les ovaires comparé aux testicules [467], suggérant un potentiel rôle de CIRBP dans la TSD. La corrélation entre expression de CIRBP, température haute et différenciation femelle a été validée par la suite. Deux allèles différant à une position (single nucleotide polymorphism, SNP), ont été identifiés, l'un avec une cytosine (C) en position 63 et l'autre avec une adénosine (A). L'allèle A étant particulièrement enrichie chez les femelles, ce SNP pourrait avoir un effet sur la TSD [468]. Le rôle de CIRBP dans la TSD reste flou et a récemment été remis en question, car dans une espèce de tortues différentes des autres études, CIRBP est surexprimé quand les œufs sont couvés dans du sable chaud mais ne présente pas de différence d'expression entre mâle et femelle [469]. Malgré ce doute, une étude plus poussée chez les lézards montre que si les œufs sont couvés à des températures hautes, CIRBP serait aussi surexprimé et participerait à l'inhibition du facteur KDM6B, impliqué dans le développement testiculaire, *via* l'induction de l'expression de STAT3, ce qui renforce l'hypothèse que CIRBP est un facteur important de la TSD [470] et dans le développement des gonades (figure 3.43 A).

3.3.3.3.2 Vieillesse et cycle cellulaire

Le vieillissement d'un organisme induit une réorganisation de l'expression des gènes et des dysfonctionnements au niveau du cycle cellulaire. CIRBP a été décrit pour participer à ce phénomène (figure 3.43 B). En effet, il a été

montré dans l'hippocampe de souris âgées que les cibles de CIRBP identifiées dans des études précédentes [471,472] étaient particulièrement affectées par des remaniements d'épissage au cours du temps [473], renforçant l'hypothèse que CIRBP est un régulateur direct d'épissage. De même, CIRBP aurait un impact direct sur le cycle cellulaire en contournant la sénescence répliquative dans les fibroblastes embryonnaires murins, par l'activation de ERK1/2 et la stimulation de la synthèse protéique, et en empêchant l'accumulation d'inhibiteurs du cycle cellulaire. En parallèle, l'activation par phosphorylation de la voie ERK1/2 stimule l'activité du complexe cycline-D1/CDK4 et permet le passage de G1 à S [474]. Toutefois, l'activité de CIRBP serait aussi sensible au temps, car cette fonction est perdue dans des cellules NIH3T3 [474] et son expression a été décrite comme diminuée dans des muscles squelettiques de souris âgées. Dans des fibroblastes embryonnaires murins, CIRBP favoriserait la transition de la phase G0 vers G1 puis G1 vers S en se liant à la kinase DYRK1b, empêchant ainsi la liaison entre DYRK1b et ses cibles. La déphosphorylation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 qui en résulte le déstabilise et la déphosphorylation de la cycline D1 permet sa stabilisation et donc la progression du cycle cellulaire [460].

3.3.3.3 Rythme circadien

Le rythme circadien est un cycle naturel qui régule les périodes d'éveil et de sommeil. Les gènes impliqués dans ce phénomène subissent des oscillations d'expression au cours de la journée (figure 3.43 B). Initialement, CIRBP avait été défini comme un oscillateur régulé par le cycle jour/nuit [475], mais cela a été précisé plus tard, dans une étude montrant que les variations d'expression de CIRBP étaient liées au cycle de température associé au cycle jour/nuit [471]. Cette étude ayant été réalisée chez des animaux nocturnes (souris), c'est pendant la phase diurne (sommeil et donc température plus basse), que CIRBP est le plus exprimé. CIRBP lui-même régule l'expression du gène CLOCK, un facteur de transcription associé à l'expression d'autres gènes du cycle circadien, les gènes "clock" [471] et assure une grande amplitude dans leur variation. Ce résultat a été validé aussi dans un modèle d'étude de restauration du sommeil profond après une période d'insomnie, où CIRBP restaure l'expression oscillatoire des gènes "clock" corticaux, ce qui renforce son caractère essentiel dans l'ajustement de cette horloge biologique [476]. Les gènes "clock" positivement régulés par CIRBP pendant le sommeil seraient principalement impliqués dans la prolifération et les processus de biosynthèse [477]. Plus particulièrement, CIRBP stabiliserait les gènes "clock" en liant leur 3'-UTR près du site de polyadénylation et favorisant l'allongement de la queue poly(A) [472]. S'il est décrit dans le paragraphe précédent que l'expression de CIRBP dans les muscles avait tendance à diminuer avec l'âge, dans les cellules de peau, l'expression de CIRBP a plutôt tendance à augmenter et stabilise donc des protéines du rythme circadien. L'augmentation de l'expression de CIRBP pourrait donc se révéler protectrice contre le vieillissement [478], de manière tissu-dépendante.

3.3.3.4 Métabolisme

L'homéostasie cellulaire passe aussi par un maintien du métabolisme et du niveau d'énergie des cellules, même en cas de stress (figure 3.43 B). L'étude de la surexpression de CIRBP en cas d'hypothermie a mis à jour son rôle dans la protection des hépatocytes, en partie par l'inhibition de l'apoptose *via* l'activation de la voie AKT et la surexpression de Bcl-2, mais aussi par la régulation du métabolisme du glucose, observation étayée par une baisse de la production de pyruvate et de fructose 1-6-bisphosphate. CIRBP permet donc de freiner la mort des hépatocytes tout en maintenant leur niveau d'énergie [479]. CIRBP impacte aussi le métabolisme des lipides. L'obésité induit un stress du réticulum endoplasmique dans le foie, qui, *via* l'activation de la kinase ATF4, va positivement réguler CIRBP. Dans ce cas, cette surexpression n'est pas favorable à la cellule car CIRBP va se lier au 3'-UTR de l'angiopoïétine 3 et induire sa surexpression qui, à son tour, inhibe la formation de tissu adipeux brun et favorise la circulation des acides gras libres, responsables en partie du développement des stéatoses hépatiques [480]. Dans les macrophages, le catabolisme des gouttelettes lipidiques induit par l'autophagie fait partie des mécanismes de prévention contre l'arthrosclérose. CIRBP a été identifié comme enrichi dans les gouttelettes lipidiques et a cette fois un effet protecteur contre l'arthrosclérose en participant au maintien des influx de cholestérol [481].

3.3.3.5 Apoptose et autres morts cellulaires

De par ses fonctions de protections des tissus contre la mort cellulaire, CIRBP est un facteur anti-apoptotique, mais est aussi impliqué dans d'autres types de morts cellulaires. Ce paragraphe va récapituler les rôles de CIRBP dans les mises en place des programmes de morts cellulaires.

CIRBP a un effet inducteur sur l'expression de Bcl-2 et Bcl-xl, des inhibiteurs de l'apoptose [378] et régule négativement p53, notamment en cas de dommage à l'ADN et empêche son action pro-apoptotique de [482]. En particulier, CIRBP semble cibler la voie mitochondriale d'apoptose, notamment dans les neurones où la surexpression de CIRBP induit une baisse d'expression de gènes impliqués dans ce processus [483–485]. Au contraire, eCIRBP va avoir un effet pro-apoptotique, comme décrit dans la figure 3.42 dans le cas du stress oxydatif décrit plus haut. En plus de l'apoptose, CIRBP est impliqué dans d'autres types de morts cellulaires. Comme mentionné précédemment, dans des cellules de cancer du pancréas, CIRBP lie et inhibe p53 et régule positivement la ferroptose [383], une mort cellulaire programmée induite par l'accumulation de peroxydes de lipide dépendante du fer [486], et réduit ainsi la prolifération des cellules. L'activation de la ferroptose par CIRBP a aussi été décrite dans le contexte de l'ischémie-reperfusion des cellules rénales, où CIRBP régule positivement l'expression de ELAVL1 (HuR), un facteur clé de la ferroptose [445] et dans le cas de la septicémie, où eCIRBP inhibe l'expression de la protéine GPX4 (Glutathione peroxidase 4), qui empêche l'oxydation des lipides. La perte d'activité de GPX4 induit l'augmentation de la production de peroxydes de lipide, délétères pour la cellule, qui met alors en place la ferroptose [487]. Après un trauma, il a été décrit que CIRBP intervenait dans la fragmentation mitochondriale avec pour conséquence l'activation de la nécroptose, une forme programmée de la nécrose souvent liée à l'inflammation [421]. Toujours dans le contexte de l'inflammation et de la septicémie, eCIRBP a été lié à l'activation de la NETose, une mort cellulaire programmée à vocation antimicrobienne [488], en favorisant l'expression de PAD4, qui promeut la décondensation de la chromatine, essentielle à la NETose. Enfin, CIRBP serait aussi impliqué dans l'activation de la pyroptose, une mort cellulaire programmée impliqué dans la réponse antimicrobienne elle aussi, en favorisant l'assemblage de NLRP3 et l'activation de l'inflammasome dans des cellules épithéliales [420]. En résumé, si CIRBP à des fonctions plutôt anti-apoptotique en inhibant p53 et en activant Bcl-2 et Bcl-xl, il favoriserait d'autres types de mort cellulaire programmées notamment dans le contexte inflammatoire (figure 3.43 B).

3.3.4 CIRBP comme cible thérapeutique

Au vu de son implication dans de nombreuses pathologies et processus cellulaires clés, CIRBP est évidemment une cible thérapeutique prometteuse. Si sa surexpression peut être recherchée dans certains cas, comme pour la protection des tissus en cas d'ischémie, certaines conditions pathologiques nécessiteraient au contraire une inhibition de son expression, notamment en raison de son action pro-inflammatoire en circulation. En plus d'être une cible thérapeutique, CIRBP, intra ou extracellulaire, peut servir de marqueur pronostic dans de multiples conditions, comme les cancers, les maladies auto-immunes ou inflammatoire.

3.3.4.1 CIRBP comme marqueur pronostic

Un marqueur pronostic est un indicateur biologique qui permet de prédire l'évolution d'une maladie ou efficacité d'un traitement, et est donc précieux pour adapter les soins proposés aux patients.

CIRBP, plus particulièrement eCIRBP, est un marqueur positivement associé avec la sévérité de nombreuses pathologies auto-immunes comme l'alopecie [489], la fibrose pulmonaire [490], le vitiligo [491], la sclérose systémique diffuse [492], la polyangéite microscopique et la granulomatose avec polyangéite [493] et l'ostéoartrite, où le niveau de CIRBP est associé à l'infiltration des mastocytes dans les articulations [494]. Enfin, dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, si le niveau de eCIRBP dans la circulation décroît, il augmente dans le sang périphérique et le liquide synovial [495] et est associé à l'évolution de la maladie.

Comme suggéré ci-dessus, eCIRBP est aussi un marqueur positivement associé aux dommages ischémiques ou lié à une réponse inflammatoire excessive (comme en cas de septicémie), notamment lors des pontages coronariens [409] où son niveau prédit les dommages pulmonaires. Une observation similaire a été faite lors de l'étude des conséquences de la restauration de la circulation spontanée après une ischémie [410], où un fort taux de eCIRBP prédit aussi les dommages neuronaux. Dans le cas d'une pancréatite, une augmentation de eCIRBP prédit l'aggravation de la pathologie [496] et dans la septicémie, un niveau élevé de eCIRBP est associé avec des dommages rénaux [497]. Enfin, dans un certain type d'infarctus (ST Segment Elevation Myocardial Infarctio, STEMI), eCIRBP prédit l'apparition d'effets secondaires délétères [498].

Un haut niveau de eCIRBP dans le cas de la pneumonie a aussi été corrélé avec une aggravation de l'infection [499], suggérant un rôle pro-bactérien de CIRBP.

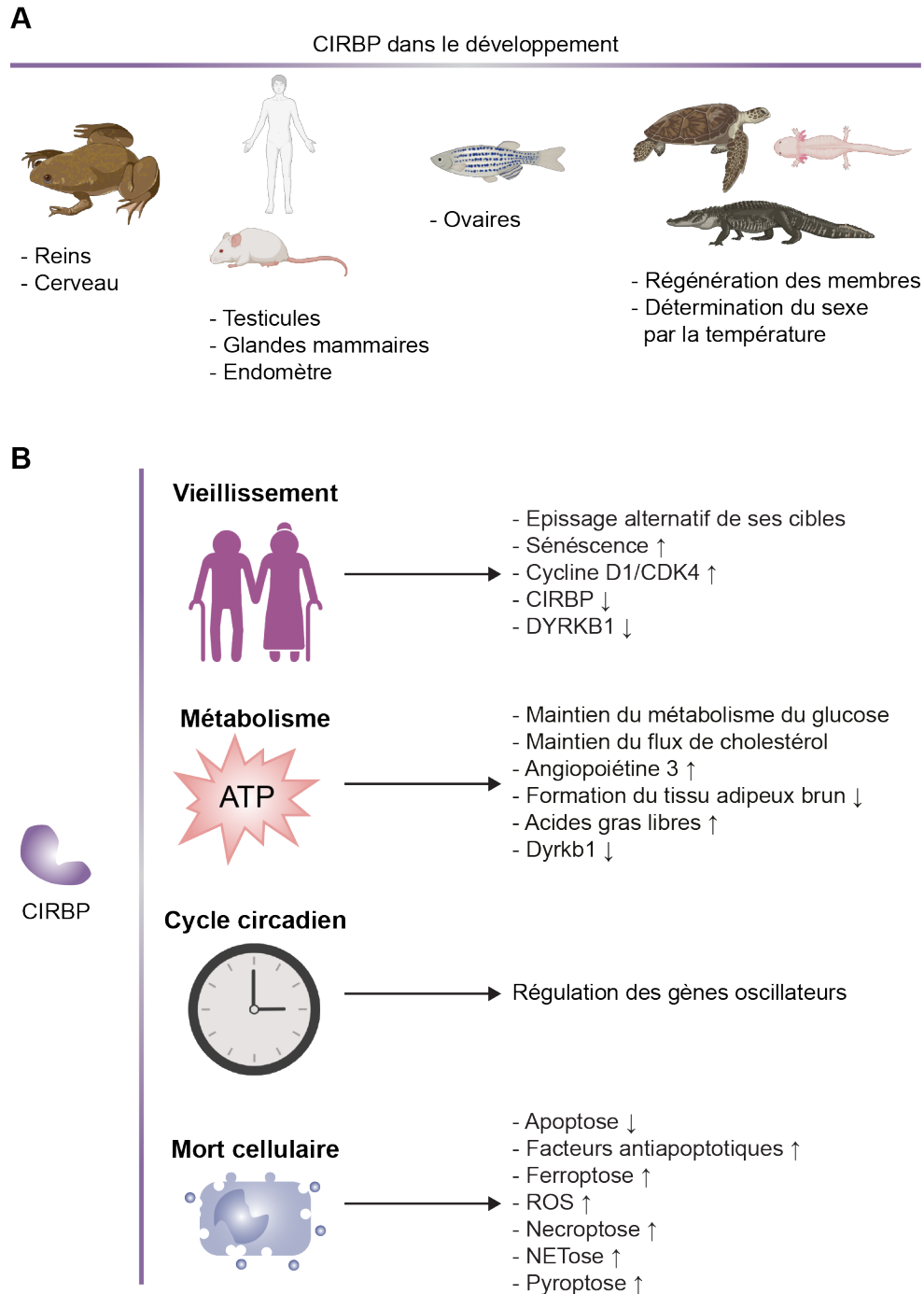


Figure 3.43: Rôle de CIRBP au cours du développement et de la vie cellulaire. (A) Rôle de CIRBP dans l'organogenèse de plusieurs espèces. (B) Intervention de CIRBP dans la régulation de fonctions cellulaires vitales.

Le rôle de CIRBP comme marqueur pronostic a surtout été regardé dans les cancers gynécologiques, où c'est la baisse d'expression de CIRBP qui est associée avec une mauvaise survie des patientes [328,393,394]. L'expression de CIRBP est aussi positivement corrélée à la survie dans le cancer du côlon [376] et le cancer canalaire du sein [374]. Dans le cancer du cerveau métastatique en revanche, CIRBP est surexprimé dans les cellules hautement invasives et donc négativement corrélé à la survie des patients [372].

3.3.4.2 Plateforme de vaccination

Une autre application thérapeutique de CIRBP est son utilisation en tant que plateforme de vaccination contre le cancer. Par exemple, contre les hépatocarcinomes, un traitement est basé sur les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire. L'addition de CIRBP en tant que vaccin a permis d'améliorer grandement l'efficacité de ce traitement [500]. Plus précisément, CIRBP est couplé à un antigène et va renforcer la réponse immunitaire dirigée contre les tumeurs en augmentant la présentation de CIRBP à la surface, comme un antigène, ce qui va stimuler les récepteurs TLR4 à la surface des lymphocytes T [501].

3.3.4.3 Modulation thérapeutiques de l'expression de CIRBP

3.3.4.3.1 Augmenter l'expression de CIRBP par hypothermie thérapeutique

L'hypothermie thérapeutique (HT) consiste à faire baisser la température d'un patient pour ralentir son métabolisme en cas d'opération notamment. Ainsi, comme l'expression de CIRBP est augmentée au cours de l'hypothermie [335], son rôle dans l'HT a été observé. De manière générale, CIRBP a un effet protecteur sur les tissus, notamment en inhibant l'apoptose (figure 3.44).

Le caractère protecteur de CIRBP contre l'apoptose, et donc contre les dommages aux organes, en condition d'HT a été caractérisé dans de multiples conditions : en cas d'arrêt cardiaque, l'HT protège le cerveau, notamment l'hippocampe, des dommages associés, en induisant l'expression de CIRBP qui va inhiber l'apoptose mitochondriale [484]. L'augmentation de l'expression de CIRBP dans des cellules hépatiques [346] fait baisser la production de ROS et dans des cellules d'hypothalamus [347], l'augmentation de l'expression de CIRBP induit une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 et par conséquent son action anti-apoptotique. CIRBP aurait aussi des effets protecteurs sur la rétine, puisque sa surexpression en cas d'HT protège les photorécepteurs de l'apoptose en cas d'hypoglycémie [502] ou d'asphyxie périnatale [503]. Enfin, la protection des tissus par HT et CIRBP permettrait aussi une meilleure protection des greffons [504], comme décrit dans le cas des allogreffes de nerfs périphériques.

Une autre fonction intéressante de CIRBP dans la protection contre les dommages aux organes en condition d'HT est sa capacité à promouvoir l'expression de l'ubiquinone (CoQ10), une enzyme de la chaîne de transport électrons, dans le cœur. En effet, il a été décrit que, dans un contexte d'opération de pontage coronarien, l'expression de CIRBP était inhibée par l'hyperméthylation de son promoteur [326]. La baisse d'expression de CoQ10 qui en découle met en danger le cœur en permettant l'accumulation de ROS aux dépens de la production d'ATP.

Dans le cerveau, le rôle de CIRBP en condition d'hypothermie n'est pas toujours bénéfique. En effet, une étude menée dans des cellules gliales BV-2 a démontré un rôle délétère de CIRBP dans la protection des cellules, notamment par son action pro-inflammatoire et l'activation de la voie NF- κ B / BRD2 [505]. Dans ces mêmes cellules mais en monoculture, CIRBP n'avait pas montré de hausse de régulation en hypothermie [340]. Dans des cellules du cortex temporal en cas d'hémorragie sub-arachnoïdienne, l'hypothermie thérapeutique va induire la baisse d'expression de CIRBP et une meilleure survie des cellules [506]. Il semblerait ainsi que, dans le cerveau, le rôle de CIRBP serait tissu-dépendant et mérite d'être étudié plus en détail.

Malgré ces études prometteuses, il existe des cas de figures où l'HT a un bénéfice local mais peut aussi entraîner des lésions à un autre endroit du corps. C'est le cas de l'arrêt de la circulation en hypothermie profonde (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA), utilisée pour préserver le tissu neuronal en cas d'opérations cardiaques complexes [507]. Dans un modèle de rat mis sous DHCA, il a été montré que l'augmentation de l'expression de CIRBP n'était pas suffisante pour empêcher des dommages sévères aux reins, notamment en raison de l'augmentation de l'apoptose des cellules [508]. Toutefois, dans cette étude, l'apport de CIRBP exogène par transduction lentivirale a permis de diminuer le taux de dommages aux reins provoqués par une hypothermie trop forte et au contraire, l'inhibition de son expression aggrave encore les dommages rénaux, indiquant que l'augmentation de l'expression de CIRBP, bien qu'insuffisante, atténue quand même les effets délétères de la DHCA. Cette hypothèse est d'ailleurs validée dans une autre étude [509], où, en cas de DHCA, l'augmentation induite de l'expression de CIRBP va permettre le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale en favorisant l'expression de jonctions inter-cellulaires et diminue fortement les dommages aux intestins par rapport à des rats n'exprimant pas CIRBP.

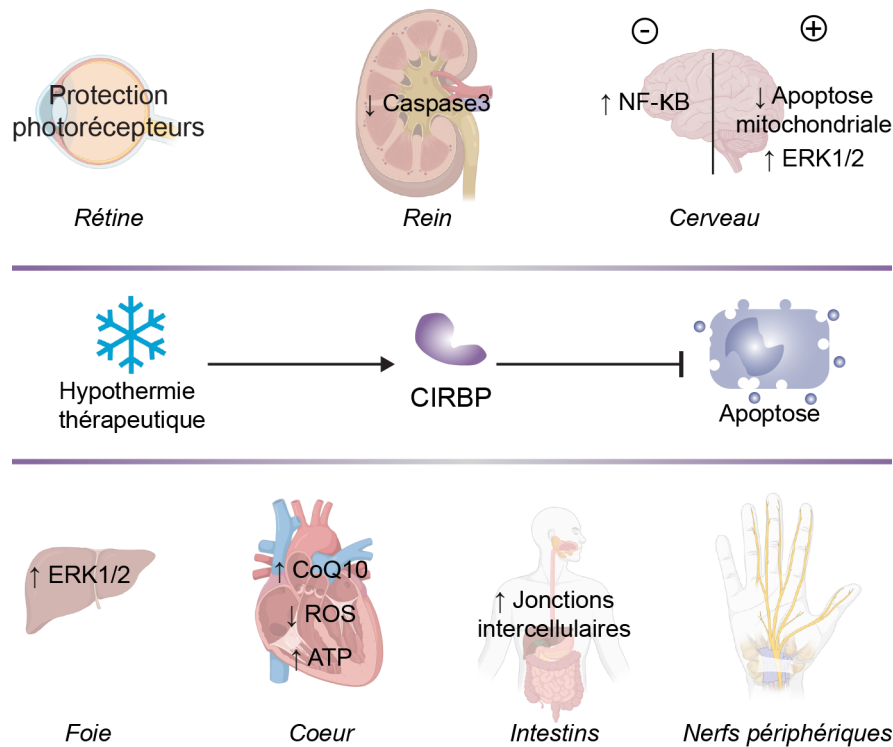


Figure 3.44: Rôle de CIRBP au cours de l'hypothermie thérapeutique. Effets protecteurs de l'expression de CIRBP par hypothermie thérapeutique sur différents organes. Pour le cerveau sont précisés les effets protecteurs (+) et délétères (-).

3.3.4.3.2 Molécules stimulatrices de l'expression de CIRBP

Comme décrit dans les paragraphes précédents, CIRBP pouvant avoir une action protectrice contre une mortalité cellulaire excessive, augmenter son expression peut avoir un effet bénéfique. Par exemple, les dommages cardiaques associés à la chimiothérapie se sont retrouvés diminués par l'apport de CIRBP exogène [510], notamment en inhibant OGFR, un inhibiteur de la croissance cellulaire. L'ISRIB (ISR inhibitor) est une molécule étudiée dans le cadre des dommages neurologiques. En induisant l'expression de CIRBP par l'inhibition de l'axe PERK/ATF4, l'ISRIB a un effet protecteur décrit sur les cellules souches neurales [436]. Pour délivrer la protéine CIRBP à l'intérieur des cellules, une équipe de Xi'an, menée par Lize Xiong, a fusionné CIRBP avec le domaine de transduction protéique du VIH (Tat-CIRBP). Deux études ont rapporté que Tat-CIRBP induisaient la dégradation de la protéine MD2, une protéine accessoire de TLR4, réduisant ainsi les réponses immunitaires et inflammatoires induites par TLR4. Cette molécule a démontré des effets protecteurs contre les dommages cérébraux provoqués par l'anesthésie [511], un choc hémorragique ou ischémique [512].

3.3.4.3.3 Inhibiteurs de CIRBP

Le plus souvent, c'est en revanche faire diminuer l'expression de CIRBP qui est bénéfique, notamment dans le cadre de maladies inflammatoires et de cancers. Ainsi de nombreuses stratégies d'inhibition de CIRBP ont été développées dans les dernières années : plusieurs modulateurs d'inflammation ont été identifiés comme diminuant l'expression de CIRBP dans plusieurs tissus (Tableau 3.4).

Une stratégie d'inhibition consiste à utiliser des molécules qui vont affecter l'activité de CIRBP. Dans le foie, en cas d'I/R, la dermcidine (un peptide antimicrobien) va inhiber la phosphorylation de EGFR et de AKT, ce qui fait diminuer la proportion de eCIRBP et sa capacité en tant que DAMP à stimuler la production de NO. Le NO étant pro-inflammatoire, la dermcidine participe donc à faire baisser la réponse inflammatoire dans le contexte de l'I/R en ciblant l'activité pro-inflammatoire de eCIRBP [513]. L'émodyne (un principe actif d'origine végétale à propriétés laxatives) a montré des effets bénéfiques sur les lésions pulmonaires aiguës et la pancréatite aiguë sévère,

en abaissant le taux d'infiltration de neutrophiles et l'activation de l'inflammasome [514]. Si le mécanisme d'action exact de l'émodine sur CIRBP reste inconnu, il semblerait que cette molécule (i) soit déstabilise l'interaction entre TLR4 et eCIRBP, soit (ii) inhibe la signalisation en aval de l'interaction eCIRBP/TLR4. L'émodine diminuerait aussi la hausse d'expression de CIRBP dans les îlots pancréatique observée en cas d'inflammation aiguë du pancréas. L'équipe de Ping Wang (Feinstein institute NY), qui a d'ailleurs identifié et caractérisé eCIRBP, a aussi développé un petit peptide dérivé de CIRBP, C23, qui va lier les récepteurs de CIRBP (TLR4) avec beaucoup d'affinité et inhiber les réactions en aval élicitées par CIRBP [515], similairement à l'émodine [514]. En termes d'application, ce peptide a déjà démontré son effet bénéfique sur la protection des tissus lors de l'hémorragie [515], sur les lésions aiguës de poumons et de reins [516] et sur les intestins [517], en inhibant l'activation des voies inflammatoires comme NF- κ B ou l'infiltration de neutrophiles. En résumé, ces molécules participent à la protection de l'intégrité des tissus en abaissant l'expression de CIRBP. Enfin, la molécule H151 affecte la voie STING et participe à faire baisser les réponses interférons activées par CIRBP dans le contexte de l'ischémie/reperfusion [440].

Des recherches ont aussi choisi de perturber directement l'interaction de CIRBP avec ses cibles, à l'aide de petites molécules ciblant spécifiquement le RRM de CIRBP. Dans des cellules cancéreuses, cette stratégie a montré des effets prometteurs en perturbant les points de contrôle tumoraux et la prolifération des cellules cancéreuses [518]. Dans le foie, l'utilisation d'anticorps anti-CIRBP induit une baisse de l'inflammation et une protection des tissus [443].

Il existe aussi des stratégies d'inhibition qui ciblent plus spécifiquement l'expression de CIRBP. Par exemple, une étude a montré que le maintien sous perfusion de greffons de foie à température ambiante plutôt que froide pouvait faire baisser le taux de stress oxydatif et de dommages mitochondriaux dans le greffon et améliorer sa préservation [444]. Ce résultat est assez contradictoire, notamment en raison du rôle bénéfique de CIRBP dans l'hypothermie thérapeutique, mais pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies de conservation des organes à transplanter. La lutéoline (un composé flavonoïde à propriétés antioxydantes) inhibe l'expression de CIRBP dans les macrophages après une septicémie et ainsi l'expression de HIF-1 α [519], ce qui fait baisser le taux d'inflammation et de dommages aux tissus.

Cependant, l'efficacité *in cellulo* et dans des modèles animaux de C23 et des autres molécules devra maintenant être testée au cours d'essais cliniques afin de s'assurer de leurs effets bénéfiques sur les humains avant d'être utilisées dans des traitements. De même, dans la mesure où eCIRBP semble être la forme la plus problématique de CIRBP, il serait nécessaire de comprendre au mieux son mécanisme de sortie de la cellule. Ce faisant, il serait alors envisageable de cibler cette voie de sortie et d'inhiber les effets néfastes de eCIRBP, tout en conservant les effets bénéfiques de CIRBP intracellulaire.

Molécule	Effet sur CIRBP	Action	Organe
ISRIB	Activateur	Survie	Cerveau
Dermcidine	Inhibiteur	Baisse de l'inflammation et NOS	Foie
Emodine	Inhibiteur	Baisse de l'inflammation	Poumons Pancréas
Lutéoline	Inhibiteur	Baisse de HIF-1 α	Macrophages
H151	Inhibiteur	Inhibition de STING et de la réponse interféron	Intestins
Petits inhibiteurs	Inhibiteur	Perturbation des points de contrôle tumoraux et prolifération	Mélanocytes
Anticorps anti-CIRBP	Inhibiteur	Baisse de l'inflammation et protection des tissus	Foie
C23	Inhibiteur	Baisse de l'interaction avec TLR4 et de inflammation	Poumons Reins
Température ambiante	Inhibiteur	Baisse du stress oxydatif et dommages mitochondriaux	Greffon de foie
Tat-CIRBP	\	Inhibition de l'activité de TLR4	Cerveau
CIRBP exogène	\	Inhibition d'OGFR	Cœur

Table 3.4: Tableau récapitulatif des stratégies thérapeutiques de modulation de l'expression de CIRBP.

4 Résultats

Table des matières

4.1	L'épissage alternatif du facteur de réponse au stress CIRBP renforce la réponse cellulaire aux infections bactériennes	93
4.1.1	Résumé de l'article en français	93
4.2	Analyse des transcrits affectés par des évènements d'épissage alternatifs au cours de l'infection	126
4.3	Identification d'un facteur de régulation de CIRBP d'origine bactérienne	128
4.3.1	Etude de la régulation de CIRBP dans le contexte de l'infection par différentes bactéries	128
4.3.2	Validation du rôle de la LLO dans le changement d'isoforme de CIRBP	131
4.4	Surexpression des protéines et des 3'-UTR de CIRBP-201 et CIRBP-210	132
4.4.1	Quantification de la surexpression de CIRBP	132
4.4.2	Impact de la surexpression de CIRBP sur l'invasion des cellules par <i>Lm</i>	133
4.5	Etude de l'impact de l'ISR et du NMD sur la variation d'abondance des isoformes de CIRBP dans le contexte de l'infection par <i>Lm</i>	134
4.5.1	Régulation de CIRBP par perturbation chimique de l'ISR	135
4.5.2	Etude de l'impact des deux voies de dégradation du NMD sur la stabilité différentielle des isoformes de CIRBP	136
4.6	Quantification des différentes isoformes de CLK1 par RT-qPCR	139
4.7	Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires	140
4.7.1	Régulation de l'épissage de CIRBP dans d'autres lignées de cellules adhérentes non-immunitaires	140
4.7.2	Régulation de l'épissage de CIRBP en réponse à la LLO dans une lignée de macrophages	141
4.8	Localisation de CIRBP dans des cellules non-infectées, infectées ou incubées avec de la LLO	141
4.8.1	Analyse de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées et infectées	142
4.8.2	Localisation des ARN CIRBP-201 et CIRBP-210 par sm-FISH	143
4.8.3	Localisation cellulaire des protéines CIRBP-201 et CIRBP-210 dans des cellules infectées	144
4.8.4	Localisation cellulaire de la protéine CIRBP dans des cellules incubées avec de la LLO	146

Dans une optique de découvrir les mécanismes d'épissage alternatif de l'hôte en réponse à l'infection par *Lm*, j'ai d'abord utilisé les données bio-informatiques de séquençage des ARNm de cellules infectées par *Lm* à différents points de temps, générées par Vinko Besic [110]. Pour analyser ces données, séquencées en lecture longues ou courtes, j'ai utilisé divers outils bio-informatique qui m'ont permis d'identifier les évènements d'épissage alternatifs, à la fois de manière quantitative grâce aux lectures courtes, et de manière qualitative grâce aux lectures longues. Parmi les gènes les plus affectés par un épissage alternatif, j'ai identifié CIRBP, une protéine de coordination de la réponse à de nombreux stress, déjà décrite comme régulé au niveau de l'épissage dans de nombreux contextes. Dans le cas de l'infection par *Lm*, l'épissage alternatif de CIRBP se fait en faveur d'un isoforme instable, au détriment de l'isoforme canonique. Pour comprendre comment ce facteur est régulé au cours de l'infection, j'ai d'abord identifié le facteur bactérien à l'origine de ce changement d'isoforme, la cytolysine LLO, un facteur de virulence majeur de *Lm*, puis le facteur humain en amont de cette régulation. Par la suite j'ai caractérisé l'impact de ce changement d'isoforme sur la progression de l'infection et sur l'interaction de CIRBP avec ses transcrits cibles, en démontrant que la stabilisation de l'isoforme instable au cours de l'infection est délétère à l'infection, et serait donc un mécanisme de défense mis en place par la cellule pour déjouer l'infection. En parallèle, pour élargir notre compréhension des mécanismes mis en jeu au cours de l'infection pour réguler CIRBP, je me suis aussi intéressée à l'impact de l'ISR et du NMD sur la stabilité des isoformes de CIRBP. Ce dernier pouvant être régulé à de nombreux niveaux, notamment au niveau de sa localisation cellulaire, j'ai aussi cherché à déterminer si la localisation des transcrits et de la protéines CIRBP était affectée au cours de l'infection par *Lm*. Enfin, j'ai pu généralisé cette

réponse de CIRBP à d'autres infections bactériennes et à d'autres types cellulaires, indiquant son importance dans le dialogue qui oppose cellule-hôte et bactérie.

Dans cette section qui résume la régulation de CIRBP par *Lm*, je valide les hypothèses posées parfois en condition d'infection, parfois en condition d'incubation avec la LLO. La validation du rôle de la LLO étant intervenue assez tard dans ma thèse (courant 2022), certaines observations restent à reproduire avec la toxine; ainsi, il sera indiqué pour chaque paragraphe quelle a été la condition induisant la régulation de CIRBP observée. De plus, sauf si précisé autrement, toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules LoVo. Les principaux résultats de ma thèse sont décrits dans l'[article](#) en révision [75] et les résultats détaillés ici sont complémentaires à ceux de l'[article](#) et explorent différentes hypothèses quant à la régulation de CIRBP au cours de l'infection par *Lm*.

4.1 L'épissage alternatif du facteur de réponse au stress CIRBP renforce la réponse cellulaire aux infections bactériennes

Ci-après, l'article "*Morgane Corre, Volker Boehm, Vinko Besic, Anna Kurowska, Anouk Viry, Ammara Mohammad, Catherine Sénamaud-Beaufort, Morgane Thomas-Chollier and Alice Lebreton, Alternative splicing of the stress-sensitive regulator CIRBP sharpens the cellular response to bacterial infection, 2023, doi:10.1101/2023.01.18.524578*" [75], en révision dans *Nucleic Acids Research*. Les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse et qui ont permis de mieux cerner le rôle de CIRBP au cours de l'infection par *Listeria monocytogenes* y sont rapportés.

4.1.1 Résumé de l'article en français

La réponse des cellules humaines aux infections bactériennes est largement dépendante de la réorganisation de l'expression de ses gènes. Si la modification de l'expression des gènes humains dans ce contexte a déjà été décrite aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, la modification de l'épissage des gènes reste à étudier. Afin d'analyser ces régulations, nous avons combiné l'analyse bio-informatique d'expériences de séquençage en lectures longues et courtes pour identifier les événements d'épissage alternatif de cellules intestinales épithéliales en réponse à l'infection par la bactérie pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes*. Parmi les changements d'isoformes les plus marqués, l'expression du facteur de réponse au stress cellulaire CIRBP (cold-inducible RNA-binding protein) et de plusieurs SRSF (serine/arginine-rich splicing factors) passent d'un transcrite canonique à celle de transcrits non-canoniques sensibles à la dégradation par le NMD, en raison de l'inclusion d'exons « poisons ». Nous avons montré que les dommages causés à la membrane de l'hôte par les différentes cytolysines bactériennes (listériolysine O, perfringolysine O, streptolysine O, aérolysine...) induisent la déphosphorylation des protéines SRSF par l'inhibition de l'activité de la kinase CLK1, avec pour conséquence l'épissage alternatif de CIRBP. Le changement d'isoformes de CIRBP a un impact sur l'infection; en effet, nous avons montré que la répression sélective de l'isoforme canonique de CIRBP réduisait la charge bactérienne intracellulaire alors que celle de l'isoforme contenant l'exon poison l'augmentait. De même, les ARN liés par CIRBP dans des cellules infectées codent des protéines davantage impliqués dans la réponse au stress que les cibles de CIRBP dans les cellules non-infectées. Nos résultats généralisent donc l'épissage de CIRBP et des SRSF à une réponse commune aux stress biotiques comme abiotiques, en démontrant sa pertinence dans un contexte d'infection bactérienne.

Alternative splicing induced by bacterial pore-forming toxins sharpens CIRBP-mediated cell response to *Listeria* infection

Morgane Corre¹, Volker Boehm^{2,3}, Vinko Besic¹, Anna Kurowska¹, Anouk Viry¹,
Ammara Mohammad⁴, Catherine Sénamaud-Beaufort⁴, Morgane Thomas-Chollier^{1,4} and
Alice Lebreton^{1,5,*}

¹Group Bacterial infection, response & dynamics, Institut de biologie de l'ENS (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 75005 Paris, France

²Institute for Genetics, University of Cologne, 50674 Cologne, Germany

³Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

⁴GenomiqueENS, Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 75005 Paris, France

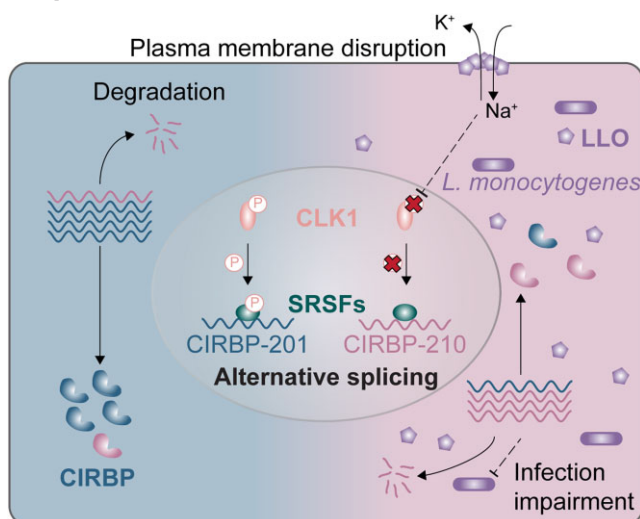
⁵INRAE, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 44 32 34 62; Email: alice.lebreton@ens.psl.eu

Abstract

Cell autonomous responses to intracellular bacteria largely depend on reorganization of gene expression. To gain isoform-level resolution of these modes of regulation, we combined long- and short-read transcriptomic analyses of the response of intestinal epithelial cells to infection by the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. Among the most striking isoform-based types of regulation, expression of the cellular stress response regulator CIRBP (cold-inducible RNA-binding protein) and of several SRSFs (serine/arginine-rich splicing factors) switched from canonical transcripts to nonsense-mediated decay-sensitive isoforms by inclusion of 'poison exons'. We showed that damage to host cell membranes caused by bacterial pore-forming toxins (listeriolysin O, perfringolysin, streptolysin or aerolysin) led to the dephosphorylation of SRSFs via the inhibition of the kinase activity of CLK1, thereby driving CIRBP alternative splicing. CIRBP isoform usage was found to have consequences on infection, since selective repression of canonical CIRBP reduced intracellular bacterial load while that of the poison exon-containing isoform exacerbated it. Consistently, CIRBP-bound mRNAs were shifted towards stress-relevant transcripts in infected cells, with increased mRNA levels or reduced translation efficiency for some targets. Our results thus generalize the alternative splicing of CIRBP and SRSFs as a common response to biotic or abiotic stresses by extending its relevance to the context of bacterial infection.

Graphical abstract



Received: March 22, 2023. Revised: October 9, 2023. Editorial Decision: October 15, 2023. Accepted: October 20, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Introduction

In a fluctuating environment or upon perturbation of tissue homeostasis, cells can undergo a broad variety of damaging conditions that may impair their integrity and function. In response to the action of damaging agents, stress-sensitive pathways coordinate multiple cellular mechanisms of response that include the control of cell cycle checkpoints, the reallocation of resources between major anabolic and catabolic pathways, the protection against macromolecular damage and scavenging of damaged components, the launching of proinflammatory responses or eventually cell death (1,2). Among key regulators involved in orchestrating cellular stress responses, CIRBP (cold-inducible RNA-binding protein) has been previously described as a central stress-response protein. Although it was initially identified for its role in adaptation to cold stress, it also responds to a variety of other non-physiological challenges such as hypoxia, DNA damage response, glucose deprivation and osmotic, oxidative or heat stresses (3–5).

Downstream of stress sensing, the expression of CIRBP has been shown to be regulated not only in abundance, but also via the production of alternative transcripts (6). Accordingly, 46 splice variants of human CIRBP are annotated in the Ensembl database version 109.38 (ENSG00000099622). The mechanisms of CIRBP isoform conversion have been previously investigated in the context of mild cold and heat shocks, revealing a fine-tuning of CIRBP pre-mRNA splicing into alternative isoforms (7–9). Even a moderate increase in temperature results in the inhibition of the activity of the kinase CLK1, leading to the dephosphorylation of serine/arginine-rich splicing factors (SRSFs; also known as SR proteins). In turn, the loss of activity of SR proteins drives the splicing of CIRBP pre-mRNA in favor of unstable isoforms that are sensitive to the nonsense-mediated decay (NMD) pathway of RNA degradation.

The CIRBP protein itself is activated and migrates to cytoplasmic stress granules, where it regulates a number of cellular pathways including the cell cycle and inflammation, via its RNA binding activity and ability to modulate the stability and translation of its targets (3,10,11). The modulatory role of CIRBP on inflammation is complex and context dependent; while it acts as a mediator of tumor-promoting inflammation, it dampens inflammation in the resolution phase of wound healing (10). It was also reported that in Huh7 cells from liver hepatoma, viral infections resulted in the loss of N⁶-methyladenosine (m⁶A) in the sixth exon of CIRBP, located in the 3' region of the CIRBP coding sequence (CDS) (12). This change in CIRBP pre-mRNA methylation led to alternative splicing (AS) of the transcript and, as a consequence, to the loss of a long, cytoplasmic protein-coding isoform. Expression of both this long form of CIRBP and the main, shorter isoform, which displayed a predominantly nuclear distribution, had a proviral effect. In addition to intracellular roles of CIRBP as an RNA-binding protein, during hemorrhagic shock or sepsis, CIRBP can be released in the circulation, where it acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that promotes inflammatory responses (13). At least part of the inflammatory effects and tissue injury caused by extracellular CIRBP (eCIRBP) during sepsis rely on its ability to induce neutrophil extracellular traps (14).

While CIRBP functions have been investigated in various stress conditions including viral infections and sepsis, its regu-

lation and cellular roles have not been documented in the context of bacterial infections. Yet, bacterial challenges have been reported to provoke several types of stresses that are sensed by host cells (15–17), including during infection by the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* (*Lm*). This facultative intracellular bacterium is responsible for listeriosis in cattle and humans, a rare but life-threatening disease in immunocompromised individuals and in the elderly, which can cause death from meningitis, encephalitis or septic shock (18). Maternofetal transmission of listeriosis can also cause miscarriage, stillbirth or debilitating neonatal meningitis. A number of studies have reported that *Lm* infection is accompanied by cellular damage that causes potent cellular stress responses such as the activation of the integrated stress response pathway (19–21). The major cause of *Lm*-triggered stress on its host cell is the permeation of cellular membranes by a cholesterol-dependent cytolysin, listeriolysin O (LLO) (22–25).

Here, using a combined approach based on short- and long-read sequencing of the transcriptome of intestinal epithelial cells upon infection by *Lm*, we show that AS events alter the expression of a number of cellular genes involved in host RNA processing and post-transcriptional regulation, including splicing factors and CIRBP. We identify that the pore-forming activity of LLO is responsible for CIRBP isoform conversion towards NMD-sensitive transcripts, via the inhibition of the activity of CLK1 kinase and of SR proteins. We observe an opposite effect of the two classes of CIRBP isoforms, and identify variations in the sets of CIRBP targets in infected versus uninfected cells as well as in their expression. Altogether, our findings generalize the mechanism of CIRBP-based stress responses to the context of a bacterial infection.

Materials and methods

Biological resources

LoVo cells, a human intestinal epithelial cell line originating from a colon adenocarcinoma (male, ATCC CCL-229), were used as the main host cell model. The Hep G2 line of hepatocellular carcinoma (ATCC HB-8065) and the THP-1 line of human monocytes (ATCC TIB-202) were used to generalize the effects of LLO on CIRBP AS. Cells were maintained in their respective formulated media, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; PANBiotech, cat#p30-3306) in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Formulated media were: for LoVo, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), low glucose, GlutaMAX supplement, pyruvate medium (Thermo Fisher Scientific, cat#21885025); for Hep G2, Eagles' minimal essential medium (MEM) (Corning, cat#10009CV); and for THP-1, RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, cat#21875034). THP-1 cells were activated with 100 µg/ml of phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) to induce their differentiation into macrophages, 48 h before each experiment.

The bacterial source strains used for this work (Supplementary Table S1) were *Listeria monocytogenes* LL195 as a main infection model and *Escherichia coli* NEB5α (New England BioLabs) for protein purification. *Listeria innocua* [*inlA*] and *L. monocytogenes* LL195 Δ *hlyA* were used for comparative purposes in infection assays. *Escherichia coli* Top10(DE3) [pET29b-LLO-6His], *E. coli* Top10 [pET29b-LLO_{C484A}-6His], *E. coli* Top10 [pET29b-LLO_{W492A}-6His], *E. coli* Top10 [pET29b-LLO_{Y206A}-6His],

E. coli DH5 α [pTrcHisA-PFO], *E. coli* DH5 α [pTrcHisA-SLO] and *E. coli* NEB5 α [pET22b-PA-6His] were used as sources for the purification of pore-forming toxins. All strains were grown at 37°C under shaking at 180 rpm in Luria-Bertani (LB) medium for *E. coli*, or in brain-heart infusion (BHI) medium for *Lm* and *L. innocua* strains. Whenever required, media were supplemented with antibiotics for plasmid selection (chloramphenicol, 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for *Lm* harboring a pAD vector and *inlA*-expressing *L. innocua*; kanamycin, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for *E. coli* Top10 harboring pET29b vectors; and ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for *E. coli* DH5 α and *E. coli* NEB5 α harboring pTrcHisA and pET22b vectors).

Culture, transfection and infection of epithelial cells

Infections were performed in LoVo cells. Cells were between passage 7 and passage 15 before seeding and were grown to 80–85% confluence for 48 h prior to infection. When needed, cells were transfected 48 h before infection with 6 pg of small interfering RNAs (siRNAs) against CIRBP-ORF (open reading frame), CIRBP-201 and CIRBP-210, UPF1 or scrambled siRNAs (Supplementary Table S2A) using RNAiMAX in 12-well format as per the manufacturer's recommendations (reverse transfection procedure). The decreased abundance of the corresponding proteins was confirmed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) and western blot.

One colony of bacteria was grown for ~16 h until they reached stationary phase [optical density at 600 nm (OD_{600 nm}) of 2–3] in 5 ml of BHI medium at 37°C. Bacteria were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and added to the cell monolayer in culture flasks [for RNA-seq or RNA immunoprecipitation (RIP)] or in 12-well plate format at the appropriate multiplicity of infection (MOI; see Supplementary Table S1A for details), by diluting bacteria to the appropriate density in serum-free DMEM. The cell culture flasks or plates were centrifuged at 200 g for 1 min and then incubated at 37°C and 5% CO₂ for 1 h. Cells were then washed with PBS containing 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin, after which fresh medium containing 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin and 10% FBS was added. Infection was allowed to proceed until specific time points [2, 5 or 10 hours post-infection (hpi) or uninfected for time 0], then culture plates were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further use (for RNA or protein extraction or for RIP). Alternatively, for infection quantification, cells were washed in PBS and trypsinized for counting using a LUNA II automated cell counter, then centrifuged at 700 g for 5 min. Cell pellets were resuspended in 500 μl of ice-cold water and lysed by passing several times through a 26G needle. Cell lysates were diluted in water and plated on BHI medium before overnight incubation at 37°C. Colony-forming units (cfu) were counted and normalized to cell counts.

Immunoblot assays

Total cell lysate was prepared by adding RIPA [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] supplemented with protease inhibitor cocktail (Bimake, cat#B14011) and, when needed, phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, cat#P5726) directly to the cell monolayer. After scraping off the monolayer, the lysate was transferred to an Eppendorf tube, incubated on ice for 10 min with intermittent vortex mixing and then cen-

trifuged for 10 min at 4°C at maximum speed. The supernatant was transferred to a fresh Eppendorf tube and the protein concentration was assessed using Bradford reagent (Abcam, cat#ab119216); it was stored at –80°C when not used immediately. An aliquot of 40 μg of proteins was diluted in Laemmli sample buffer (SB 1 \times), after which samples were heated at 95°C for 5 min and either stored at –80°C or used directly. Samples were separated by sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on a 12% acrylamide gel and transferred to Amersham Protran 0.2 μM nitrocellulose membranes using a Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad) for 1 h at 100 V at 4°C in chilled transfer buffer (Tris-Base 3 g/l, glycine 1.4 g/l, 20% ethanol). Membranes were blocked for 30 min in PBS or Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (PBS-T and TBS-T, respectively) and 5% milk or bovine serum albumin (BSA), according to the antibody manufacturer's recommendations. Primary antibodies were added to the blocking solutions at the recommended dilution before overnight incubation at 4°C. Anti-CIRBP (Proteintech, cat#10209–2-AP, 1:500 dilution); anti- β -tubulin (Biolegend, cat#903401, 1:2000 dilution); anti-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH; Cell Signaling Technologies, cat#2118, 1/1000 dilution); anti-SR proteins (Millipore, cat#MABE126, 1:2000 dilution); and anti-phosphopeptide SR proteins clone1H4 (Millipore, cat#MABE50, 1:2000 dilution) were used as primary antibodies. Membranes were washed three times in PBS-T or TBS-T and incubated with the corresponding secondary antibody [bethyl anti-mouse or anti-rabbit IgGs coupled to horseradish peroxidase (HRP), cat#A120101P and A90-116P, respectively] at a 1:50 000 dilution in the same buffer for 2 h at room temperature. Signals were revealed using Pierce ECL Plus Western Blotting Substrates (Thermo Fisher Scientific, cat#32106 and #32132, respectively) on an Las4000 imager (Amersham).

RNA extraction and RT-qPCR

From a 12-well plate format, total RNA was extracted by adding 300 μl of TriReagent (MRC, cat#TR118) directly onto the cell monolayer and the extraction procedure was followed according to the manufacturer's instructions. After ethanol precipitation, RNA was resuspended in 44 μl of RNase-free water, to which 5 μl of Turbo DNase 10 \times Buffer and 1 μl of Turbo DNase (Thermo Scientific, cat#AM2238) were added, before a 30 min incubation at 37°C to eliminate genomic DNA. RNA was again purified by extraction with acid phenol:chloroform (Invitrogen, cat#AM9722) followed by precipitation with ethanol according to the manufacturer's instructions, and then stored at –80°C or used immediately. A 500 ng aliquot of RNA was used for reverse transcription with the SuperScript IV First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen, cat#18091200) using random hexamers, according to the manufacturer's instructions. RNA was degraded with 1 μl of RNase A (Thermo Scientific, cat# R1253) for 30 min at 37°C. The final product was diluted to 1:20 and 2 μl of the dilution were used in each 10 μl RT-qPCR along with 400 nM of gene- or isoform-specific primers (Supplementary Table S2B) and 1 \times SensiFAST SYBR No-ROX Mix (Bioline, cat#BIO-98005). Quantitative PCR was performed in the CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Each reaction was performed in triplicate. Normalized relative gene expression was determined using the mean Cq of each technical triplicate, and

following the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method with *GAPDH* as a reference gene.

Purification of recombinant pore-forming toxins

Pore-forming toxin (PFT)-expressing plasmids were purified from an overnight stationary culture of the corresponding strain by using the Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega, cat#A1460) and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs, cat#C2527H). Positive clones were screened by colony PCR; 3–4 positive colonies were inoculated in 20 ml of LB medium containing the appropriate antibiotic and incubated at 37°C, 180 rpm for 6 h to reach stationary phase. This starter culture was used to inoculate 1 l of LB medium containing antibiotics. Incubation was pursued under shaking until a $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.8 was reached. Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was then added at a final concentration of 0.5 mM and the culture was incubated overnight at 16°C. Bacteria were collected by centrifugation at 3600 g for 10 min at 4°C. The pellet was washed once with ice-cold PBS and resuspended in lysis buffer (1.5× PBS, 1 mM magnesium acetate, 0.1% IGEPAL, 20 mM leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 50 μ g/ml PMSF and 1× lysozyme), sonicated for 4 min and centrifuged for 30 min at 27 000 g, 4°C. The supernatant was collected in a fresh 50 ml tube, mixed with 250 μ l of Ni-NTA agarose resin (Invitrogen, cat#R901-15), that had been pre-equilibrated in an equal volume of lysis buffer, and the slurry was incubated for 2 h on a rotating device at 4°C. The resin was pelleted by centrifugation at 500 g for 15 min, 4°C, washed twice with 5 ml of lysis buffer, then once with 500 μ l of wash buffer (1.5× PBS, 250 mM NaCl, 1 mM magnesium acetate, 0.1% IGEPAL CA-630, 50 mM imidazole, 10% glycerol) and once more with 5 ml of lysis buffer. The beads, resuspended in 1 ml of lysis buffer, were transferred to a Poly-Prep Chromatography column (Biorad, cat#731-1550) and the remaining supernatant was allowed to flow through. The slurry was incubated for 5 min on the column with 800 μ l of elution buffer (1.5× PBS, 1 mM magnesium acetate, 0.1% IGEPAL CA-3, 150 mM imidazole, 10% glycerol), then the eluate was collected, before proceeding to elution of another fraction (10 times). The concentration of each fraction was determined with Bradford Reagent (Abcam, cat#ab119216) and fractions with an absorbance >0.1 were pooled and dialyzed overnight in 1 l of dialysis buffer [1.5× PBS, 1 mM magnesium acetate, 10% glycerol and 2 mM dithiothreitol (DTT)] in 12–14 kDa Spectra/Por dialysis tubing (Repligen, cat#123697) with mild agitation at 4°C. The dialyzed protein solution was diluted in protein storage solution (20 mM MES pH 5.7, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM DTT), aliquoted at 0.1 μ M and stored at –80°C. Protein purity was assessed by running samples of every step of the purification process on SDS-PAGE and staining the gel using Quick Coomassie Stain (Neo-Biotech, cat#NB-45-00078) to reveal single bands in the eluted and dialyzed fractions.

Before use, pro-aerolysin was activated by incubation for 10 min with trypsin in a 1:20 aerolysin:trypsin molar ratio, then trypsin was inactivated by adding trypsin inhibitor (PromoCell cat#C-41120) to a final concentration of 0.02%.

Treatment of cells with pore-forming toxins or with pharmacological inhibitors

LoVo cells were seeded in 12-well plates at an appropriate density to reach 85–90% confluence 48 h later. For TG003

treatment and PFT treatment, the cells were washed once with PBS, then serum-free medium supplemented with PFTs at 4.5 nM or with TG003 at concentrations ranging from 1 to 100 μ M was added for 1 to 48 h. Because aerolysin had been activated with trypsin, a similar concentration of inactivated trypsin diluted in the same buffer was added in the control sample. Cells were washed once with cold PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further use.

Perturbation of fluxes

To test the role of calcium and potassium, isotonic calcium-free and high-potassium media were prepared as previously described (26). Potassium-free medium was prepared similarly to the standard medium but lacked KCl. High-potassium/calcium-free medium was prepared similarly to the high-potassium medium but lacked $CaCl_2$. LoVo cells were seeded 48 h prior to the experiment in a 12-well plate format to reach 85–90% confluency. Cells were washed once with PBS and incubated for 30 min in the corresponding ion-altered medium prior to the addition of 4.5 nM LLO. Cells with or without the addition of LLO were incubated for another hour, then washed once with cold PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further use.

Long-read RNA-seq sample and library preparation

The RNA samples used for long-read cDNA sequencing (long-read RNA-seq) were the same samples that had been prepared in our previous work for total cytoplasmic RNA sequencing with Illumina next-generation sequencing technology (short-read RNA-seq) of *Lm*-infected LoVo cells over a 10 h time course (22). The integrity of isolated RNA was verified using the RNA Pico kit on an Agilent 2100 Bioanalyzer. Only high-quality RNA (RIN > 8) was used in library preparation.

Library preparation was performed using SQK-LSK108 following the manufacturer's protocol [1D PCR Barcoding cDNA; Oxford Nanopore Technologies (ONT)] optimized for cDNA sequencing. Briefly, 100 ng of total RNA was reverse-transcribed for each sample with SuperScript IV (Life Technologies, cat#18090010), using custom polyT-VN and strand switching primers at 50°C for 10 min. Template switching was performed at 42°C for 10 min and enzyme inactivation at 80°C for 10 min. The reaction was purified with 0.7× Agencourt Ampure XP beads. A quarter of the purified reverse-transcribed product was taken into PCR for amplification and addition of barcodes (barcoded primers from EXP-PBC001, ONT), with a 17 min elongation every 18 cycles. Double-stranded cDNA was purified as above, quantified and checked for the size. Sample were multiplexed in equimolar quantities to obtain 1 μ g of cDNA. The pool was end-repaired and dA-tailed using the NEBNext End repair/dA-tailing Module (New England BioLabs, cat#E7546), and purified with 1× Agencourt beads. Adapter ligation was performed at 20°C for 10 min, with Adapter Mix (AMX, ONT) and Blunt/TA Ligase Master Mix (New England BioLabs, cat# M0367). After a final 1× clean-up and washing of the beads with Adapter Binding Buffer (ABB, ONT), the library was eluted in 15 μ l of Elution buffer. A 900 ng aliquot of cDNA was loaded on an R9.4.1 flowcell after priming it according to the manufacturer's protocol. Sequencing was performed with the standard 48 h sequencing protocol run on the MinION MkIB, using the MinKNOW software (versions 1.7.1, 1.7.4 and 1.10.23). A mean of 1.7 ± 0.5 million passing ONT quality filter reads

was obtained for each of the 12 samples. Base calling from read event data was performed by guppy-3.6.1.

RNA immunoprecipitation sample and sequencing library preparation (RIP-seq)

LoVo cells were cultured in 75 cm² flasks and infected as described above. RIP was performed as previously described by Kwon *et al.* until RNA resuspension (27), except only immunoprecipitation (IP) 150 buffer was used for beads washing, and the antibodies used were anti-CIRBP or control IgG from rabbit serum (Sigma, cat#I5006). Two flasks per condition were pooled during final precipitation. Purified input or RIP-seq RNA samples were resuspended in 15 µl of water, their concentration was assessed by Qubit RNA High Sensitivity kit (Invitrogen, cat#Q32852) and samples were stored at -80°C until further processing.

For library preparation and Illumina sequencing, messenger (polyA⁺) RNAs were purified from 25 ng of RIP samples and 500 ng of total RNA input using oligo(dT). Libraries were prepared using the strand-specific RNA-seq library preparation Stranded mRNA ligation kit (Illumina). Libraries were multiplexed by 12 for RIP samples and by 6 for input samples on a P2 flowcell. The 118 bp single-read sequencing was performed on a NextSeq 2000 (Illumina). A mean of 41 ± 19 million reads passing Illumina quality filter reads for RIP samples, and 88 ± 10 million reads for input samples, were obtained.

Read processing for long-read RNA-seq and RIP-seq

Fastq file quality was checked on Galaxy servers using the FastQC tool. Reads mapping to the 5S rRNA (OX177011.1) or 45S (NR_046235.3) pre-rRNA sequences with Bowtie2 (Galaxy Version 2.5.0) were filtered out. For long-read RNA-seq, filtered reads were mapped to the human genome (GRCh38.p13 from Gencode website) using minimap2 (Galaxy Version 2.24) with enabled spliced alignments. For RIP-Seq, filtered reads were mapped to GRCh38.p13 using RNA-STAR (Galaxy Version 2.7.8a) and a gene model file for the splice junction (gencode.v41.annotation.gff3). Read processing for short-read RNA-seq data was described previously (22).

Alternative splicing analysis

AS analysis was performed following the MAJIQ algorithm tutorial (28) using the IFB-core Cluster (<https://www.france-bioinformatique.fr/en/ifb-core-cluster/>). Alignment files for short-read RNA-seq were used along with Gencode annotation file gencode.v41.annotation.gff3 as inputs for the MAJIQ builder step. The deltaPSI method was used to run the MAJIQ quantifier, and results were modularized in VOILA (-changing-between-group-dpsi 0.05 -decomplexify-psi-threshold 0.01). Final results were visualized in the VOILA application as instructed. AS events were considered biologically relevant for ΔPSI between 10 hpi and non-infected (NI) cells >0.1, and a probability of changing >0.95. Functional enrichment analysis for genes significantly impacted by an AS event was conducted using over-representation analysis of Gene Ontology (GO) biological processes with the gprofiler2 R package (version 0.2.1).

Long-read data analysis

Long-read RNA-seq alignment files were directly used to discover and quantify transcript isoforms by using the Bambu package in R (29) and the Gencode annotation file gencode.v41.annotation.gff3, generating a table of normalized transcript counts. From these tables, differential usage of the transcript isoforms was quantified with the IsoformSwitchAnalyzeR (ISAR) package in R (30; version 1.18.0). Information on impacted transcript IDs and types were extracted from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org>) using BioMart (version 2.52.0). Uniquely mapped reads were counted using FeatureCounts (version 2.0.1). Library size-normalized read alignments were visualized using the Integrative Genomics Viewer (IGV) from bedGraph files generated employing samtools and bedtools.

RIP-seq data analysis

Differential target enrichment of RIP-seq data was quantified by identifying enriched genes in CIRBP IP fractions compared (i) with the corresponding input fractions, and (ii) with the corresponding control IgG IP fractions in two parallel analyses, using DESeq2 in R (version 1.36). CIRBP targets were considered as significantly enriched if they matched criteria of $P_{\text{adj}} < 0.05$ and \log_2 fold change (FC) > 0.5 in both comparisons. For volcano plots, gene enrichment repartition for both non-infected and *Lm*-infected conditions was represented using values from the IP versus control IgG DESeq2 analysis. Functional enrichment analysis for significant CIRBP targets was conducted using over-representation analysis of GO biological processes with the gprofiler2 R package version 0.2.1.

Statistical analysis

Boxplots represent median and quartiles of data, with the mean plotted as a diamond-shaped point and each individual value as a full black dot. Information on independent biological replicates and about the statistical tests used is provided in the figure legends. For immunoblots, protein band intensities were quantified using the Fiji software, and normalized to the corresponding housekeeping protein. Mean intensity values were compared using Student's *t*-test.

Results

Infection of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* alters the mRNA alternative splicing landscape

While quantitative aspects of human gene expression changes upon *Lm* infection have been analyzed in depth in a number of transcriptomic and translomic studies (22,31), we sought to explore whether gene expression was also affected at the mRNA isoform level, which could impact the function of protein products. To this end, we investigated AS events affecting human transcripts at several time points (0, 2, 5 and 10 h) after infection with the *Lm* LL195 strain in the LoVo epithelial cell line of colon adenocarcinoma. We first re-analyzed short-read RNA-seq data that we had previously generated across the 10 h infection time-course (22) using the MAJIQ algorithm, a method optimized for the identification of local splicing variations (LSVs) regardless of isoform-based alignments (28). The high depth of Illumina sequencing of cDNA fragments allowed a robust detection of statistically significant changes of splice sites usage across conditions (Supplementary

Table S3A–C), while long-read cDNA sequencing of the same set of samples obtained with MinION (ONT) proved better adapted for qualitative investigation of isoform switches in a selected subset of candidate genes at later stages of investigation, but lacked depth for bona fide statistical analysis of isoform switches (Supplementary Table S3D–F). Relative changes in AS occurrence from one condition to another were quantified as the difference in percent spliced-in (PSI), dubbed delta PSI (dPSI) (28). Whereas almost no change in AS events was detected at 2 and 5 hpi when compared with NI cells (four and five LSVs with >5% dPSI and 95% probability of changing, respectively), a defined subset of LSVs (417), spanning over 191 genes, were significantly impacted by *Lm* infection at 10 hpi, with no overall gradual pattern across time points (Figure 1A, B). GO over-representation analysis of genes affected by LSVs at 10 hpi revealed a significant enrichment in functions associated with RNA metabolism, and notably with splicing itself (Figure 1C). Alteration of splicing in transcripts from the SRSF family (Figure 1A; Supplementary Figure S1A, B) is consistent with well characterized autoregulatory feedback loops that govern the expression of genes encoding SRSFs (32–34). Together, these results suggest that AS-based regulation contributes to the fine-tuning of the expression of a subset of human genes in response to *Lm* infection, some of which can themselves have a role in downstream host gene expression regulation. We then sought to investigate in more detail the alternative isoforms of one of these candidate regulators, the upstream pathways leading to their processing and their potential downstream role in infection.

CIRBP is alternatively spliced at the junction of exon 6 with downstream exons

Among the genes affected by the most robust isoform switches, CIRBP struck us as worthy of functional investigation. Indeed, the reported roles of CIRBP isoform-based regulation in orchestrating cellular responses to different types of cellular damage prompted us to further document its status upon *Lm* infection. High dPSI and probability of changing for two mutually exclusive LSVs detected at the junction of exon 6 with either exon 7a or 7b by short-read analysis (Figure 1A, B; Supplementary Table S3C) was matched by high up- versus down-regulation of isoforms mutually differing in the alternative use of exons 7a versus 7b in long-read RNA-seq analysis (Supplementary Table S3F; Figure 2A, B). In contrast, no statistically significant LSV affecting the first five exons of CIRBP was detected, prompting us to focus thereafter on isoforms that varied in their distal part. More specifically, the junction between a splicing donor site in exon 6 located at position 1 272 051 in the genome and downstream acceptor sites was the only statistically significant LSV between infected and non-infected conditions. Among the 46 splice variants that are currently annotated for human CIRBP, we grouped those that were detected in our analysis into three main classes of isoforms differing at the junction of exon 6 (Supplementary Figure S2): (i) a dominant protein-coding class bridging exon 6 with exon 7a, the most representative of which is ENST00000320936.9, CIRBP-201, that accounted for $89.6 \pm 12.0\%$ of CIRBP isoforms in non-infected cells (Supplementary Table S3G, long-read data); (ii) a class of alternatively spliced transcripts bridging exon 6 with exon 7b, the prototype of which being the predicted NMD target ENST00000586636.5, CIRBP-210 ($9.8 \pm 1.9\%$ of tran-

scripts in non-infected cells; Supplementary Table S3G, long-read data); and (iii) a third class encoding elongated versions of the CIRBP protein due to the retaining of introns with coding potential after exon 6, best represented by CIRBP-225 (ENST00000589710.5) ($0.6 \pm 0.8\%$ of transcripts in long-read data in non-infected cells; Supplementary Table S3G). By 10 hpi, CIRBP-210 expression underwent a 2.6-fold reduction, in favor of a 9.5-fold increase for CIRBP-210-like isoforms, which then represented $71.9 \pm 19.8\%$ of CIRBP transcripts (Figure 2A, B; Supplementary Table S3G, long-read data). Due to extremely low counts, variations in CIRBP-225-like isoforms at 10 hpi were irrelevant (Supplementary Table S3G), and no change in CIRBP-225 expression was detected by RT-qPCR using primers specific for the retained intron in this isoform (Supplementary Figure S3). Subsequently, we focused on the two most represented isoform classes (i) and (ii) affected by a statistically significant LSV.

Alternative use of 3' exons affects CIRBP mRNA expression in infected cells

CIRBP-201 and -210 differ in their 3' regions, which consist of alternative exons 7a versus 7b-8 (Figure 2B). The impact of AS on the CDS is minimal, giving rise to a four amino acid shorter protein for CIRBP-210 compared with CIRBP-201, and to the loss of a putative phosphorylation site on a threonine (35) (Figure 2C). In contrast, their 3'-untranslated regions (UTRs) differ significantly (Figure 2B). Indeed, in CIRBP-210, the presence of an exon-exon junction in the 3'-UTR makes it a target for degradation by NMD (9), which is attested by its sensitivity to the depletion of key NMD factors [data from (36)]. In the LoVo cell line, we confirmed that RNA silencing of the central NMD factor UPF1 resulted in increased CIRBP-210 mRNA abundance and CIRBP protein levels compared with non-transfected cells (Figure 2D, E), indicating that NMD destabilizes CIRBP-210-like isoforms.

Upon infection, no general up-regulation of annotated human NMD-sensitive transcripts was observed in long-read RNA-seq datasets (Supplementary Figure S4), ruling out that the increased abundance of CIRBP-210 was due to the impairment of central NMD pathways. This result also implies that, although the production of CIRBP isoforms was shifted in favor of CIRBP-210 in infected cells, this class of transcripts was still sensitive to NMD, and thus less stable than its CIRBP-201 counterpart. In agreement with CIRBP-210 being less stable than CIRBP-201, the overall mRNA abundance of CIRBP was decreased 1.6-fold at 10 hpi (Supplementary Figure S1B). Its coverage in ribosome footprints was reduced 2.8-fold, corresponding to a 1.7-fold drop in translation efficiency.

Immunoblotting against CIRBP confirmed that down-regulation of its expression was part of the consequences of *Lm* infection (Figure 2F, G). However, CIRBP was previously reported to have a half-life of >8 h in four different cell lines (37). It is thus unlikely that the down-regulation of CIRBP mRNA levels is sufficient for the observed reduction in CIRBP protein abundance at 10 hpi (Figure 2F). On top of RNA-based regulation, the loss of intracellular CIRBP may thus be driven either by an acceleration of CIRBP turnover rate or by its secretion under the form of eCIRBP, as previously reported to occur in cell-damaging conditions (38). Indeed, while UPF1 silencing resulted in an increase of CIRBP-210 mRNA abundance at 10 hpi comparable with its effect in uninfected cells (Supplementary Figure S3), CIRBP protein

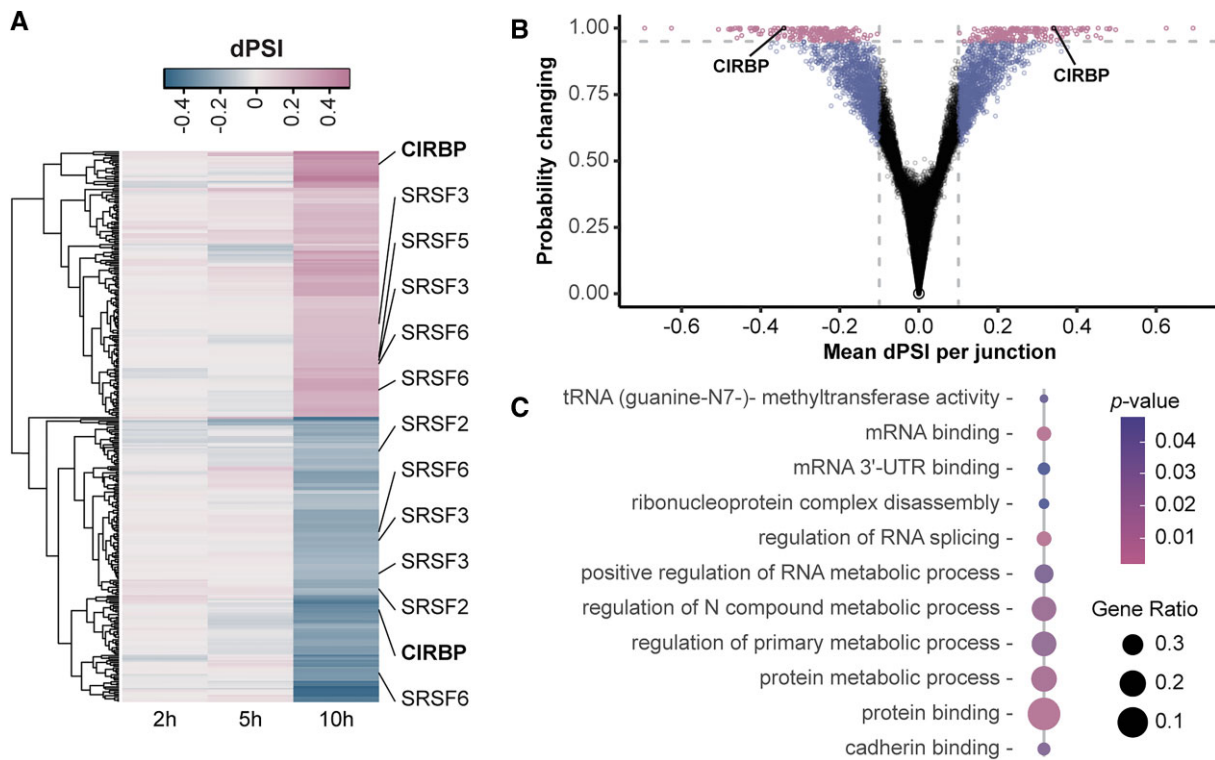


Figure 1. *Listeria monocytogenes* infection alters the representation of mRNA isoforms for a subset of human genes, including CIRBP. (A and B) Variations in RNA local splicing variants in LoVo intestinal epithelial cells infected for 2, 5 or 10 h with *Lm*. Short-read cDNA sequencing data were used for the detection of LSVs using the MAJIQ algorithm (three independent replicates at 0, 2 and 5 hpi; two at 10 hpi). (A) Heatmap of the difference at 2, 5 and 10 hpi in dPSI values of significant AS events induced by *Lm* infection, compared with non-infected cells (probability of changing > 0.95). The names of a subset of genes positively (pink) and/or negatively (blue) affected by LSVs are indicated. (B) Volcano plots highlighting the most significant AS events in *Lm*-infected cells at 10 hpi compared with non-infected cells. Vertical dashed gray lines indicate a mean dPSI of 0.1, and the horizontal dashed gray line indicates a probability of changing of 0.95. (C) Over-representation analysis of GO biological process terms for genes undergoing RNA isoform-based regulation in LoVo cells at 10 hpi compared with non-infected conditions (probability of changing > 0.95; all dPSI beyond this threshold were >0.1).

levels were only modestly increased (Figure 2E), suggesting that infection-induced CIRBP degradation or secretion dampens the up-regulation of CIRBP protein by UPF1 silencing.

Infection-induced CIRBP isoform switch requires LLO-proficient *Lm* strains

To investigate whether specific virulence properties of *Lm* were mediating the switch in CIRBP isoform usage upon infection, we compared the ability of distinct *Listeria* strains to alter the proportion of CIRBP-201 and -210 isoforms in LoVo cells. Each isoform class was quantified by RT-qPCR using primers specific to alternative terminal exons 7a or 7b-8, then the ratio of CIRBP-210 to -201 relative abundance, normalized to its value in non-infected cells, was compared across conditions (Figure 3A). For wild-type (WT) *Lm*, while no significant change was observed at 5 hpi, CIRBP-210 to -201 abundance was increased 1.6-fold at 10 hpi, confirming CIRBP isoform switch. In contrast, neither a 10 h infection with a strain of *Listeria innocua* rendered invasive by carrying the *Lm* internalin gene *inlA* (*L. innocua* [*inlA*]), nor with a strain of *Lm* that is deficient for the *hlyA* virulence gene, encoding the PFT LLO (*Lm* Δ *hlyA*), affected CIRBP-210 to -201 relative abundances. Consistently, CIRBP protein levels were reduced in cells infected for 10 h with WT *Lm*, while they were not in cells infected with *Lm* Δ *hlyA* (Supplementary Figure S5A). As *L. innocua* does not harbor the *hlyA* gene, these results strongly suggest that LLO is a key determinant

of CIRBP isoform switch, which is consistent with the activity of LLO being well known to activate cellular stress response pathways (22–25).

The pore-forming activity of LLO is sufficient to induce CIRBP isoform switch

We next sought to determine whether the pore-forming activity of LLO was mediating the switch in CIRBP isoform usage. Incubation of LoVo cells with 3–6 nM purified LLO for 15–60 min shifted CIRBP AS in favor of CIRBP-210 in a dose- and time-dependent manner (Figure 3B, C). This phenotype was not specific to the LoVo epithelial adenocarcinoma cell line, as it was reproduced in PMA-activated THP-1 macrophage-like cells as well as in Hep G2 hepatocytes (Figure 3D, E).

CIRBP protein levels were also decreased upon treatment with increasing concentrations of LLO (Supplementary Figure S5B), arguing that the CIRBP loss observed during infection is LLO dependent (Figure 2F, G; Supplementary Figure S5A). In addition, LLO treatment for 30–60 min resulted in increased amounts of eCIRBP detected in the supernatants of both LoVo and THP-1 cells (Supplementary Figure S5C). This observation suggests that secretion of CIRBP in the extracellular environment contributes to the decrease of intracellular CIRBP protein upon exposure to LLO, as was hypothesized above during infection.

We then incubated LoVo cells with 4.5 nM purified WT or mutated versions of LLO for 1 h, before assessing the relative

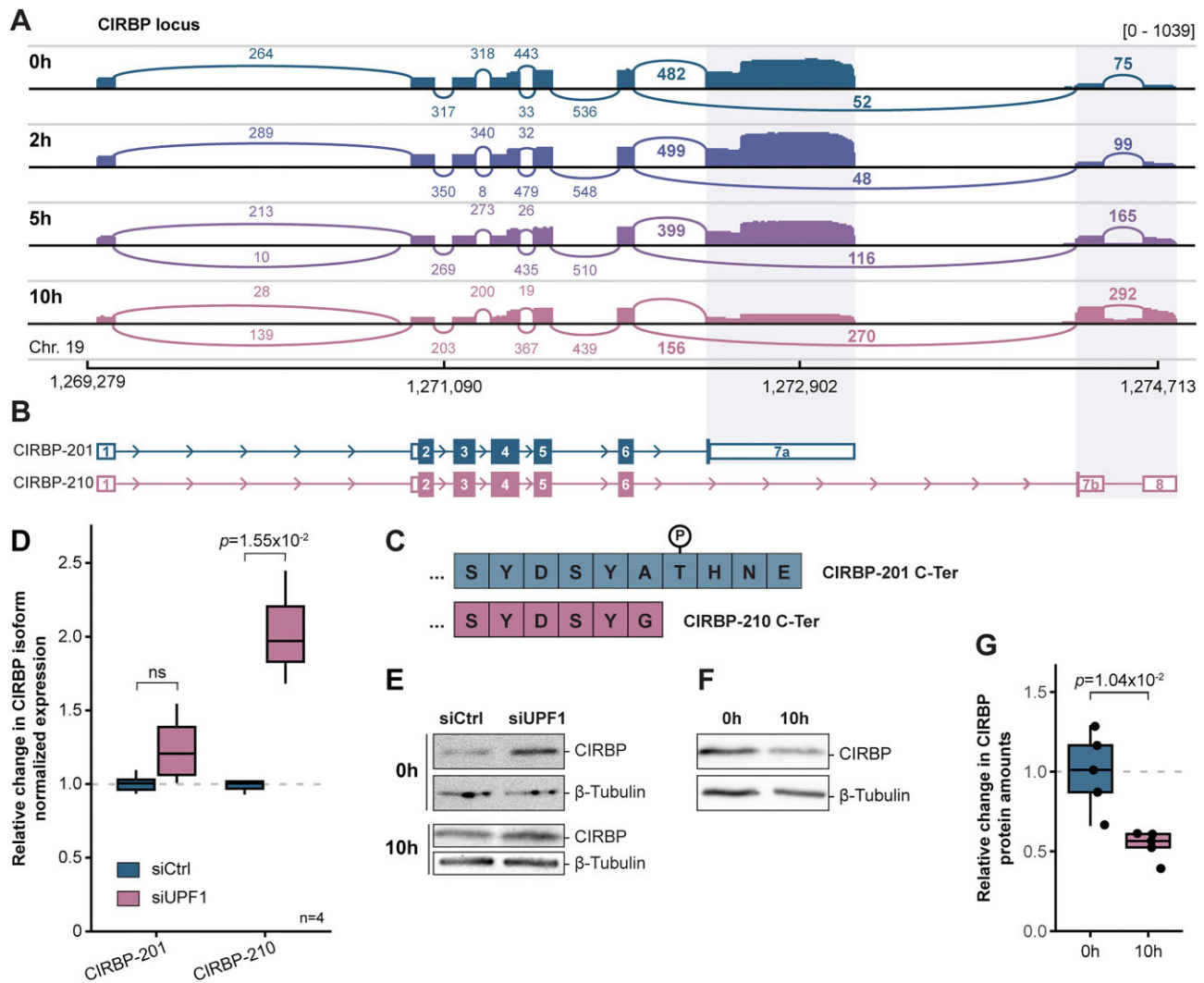


Figure 2. AS of CIRBP leads to a switch towards an NMD-sensitive isoform upon *L. monocytogenes* infection. **(A)** Sashimi plot of long-read Nanopore sequencing data aligned at the CIRBP locus. For each time point, average values of read counts per genomic position normalized for library size, and exon junction coverages for each junction, are represented (three independent replicates at 0, 2, 5 hpi; two at 10 hpi). The range for normalized read counts is indicated between brackets. **(B)** Representation of the mature forms of the two prototypical transcripts of CIRBP, CIRBP-201 and CIRBP-210, aligned with their position on the genome in (A). Exons are represented as colored boxes, the height of which is magnified in the CDS; introns are displayed as lines, with arrows indicating 5' to 3' orientation. Alternative 3' ends, corresponding to exons 7a in CIRBP-201 and 7b-8 in CIRBP-210, are shaded in gray. **(C)** Last amino acids in the sequence of the proteins encoded by CIRBP-201 (top, in blue) and CIRBP-210 (bottom, in pink). The circled P indicates the site of a putative threonine phosphorylation site. **(D)** Relative CIRBP-210 to -201 transcript ratio in LoVo cells transfected with an siRNA targeting UPF1 (siUPF1) or a scrambled siRNA (siCtrl). For each condition, the quantities of CIRBP-210 and CIRBP-201 isoforms normalized to GAPDH were quantified by RT-qPCR, and normalized to their expression levels in cells treated with a scrambled siRNA (siCtrl). Boxplots represent medians and quartiles of data from four independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey's test was used for statistical testing between conditions. **(E)** Assessment of CIRBP protein abundance by immunoblot on lysates from LoVo cells transfected with siUPF1 or siCtrl, either uninfected (0 h) or infected with *Lm* for 10 h. **(F)** Assessment of CIRBP protein abundance by immunoblot on lysates from LoVo cells infected for 10 h with *Lm*, compared with non-infected cells (0 h). **(G)** CIRBP protein quantification on five independent experiments performed as in (F). On each immunoblot, mean CIRBP intensities were normalized to mean intensities for tubulin. Student's *t*-test was used for statistical testing between conditions.

abundance of CIRBP isoforms (Figure 3F). Two of the variants of LLO used are mutated in the conserved undecapeptide of cholesterol-dependent PFTs (C484A or W492A), resulting in a respective loss of 70% and >99% of their hemolytic activity; the third mutant (Y206A) also displays a >90% loss of hemolytic activity (39). Exposure to WT LLO induced a 2.5-fold increase in the CIRBP-210 to -201 ratio, and the LLO mutant retaining 30% of its hemolytic activity also induced a 2-fold isoform switch. In contrast, catalytically inactive LLO mutants had no effect on CIRBP transcripts, thus emphasizing that LLO was sufficient to stimulate CIRBP iso-

form switch, and that its pore-forming activity was mechanistically required in this process.

The switch in CIRBP isoform can be induced by a broad array of pore-forming toxins

As mentioned above, LLO belongs to the extended family of PFTs; more specifically, it is a cholesterol-dependent cytolysin (CDC) that creates 30 nm pores in membranes, although it can also be inserted as arcs or incomplete rings (40). To clarify the properties of cell membrane permeation that were

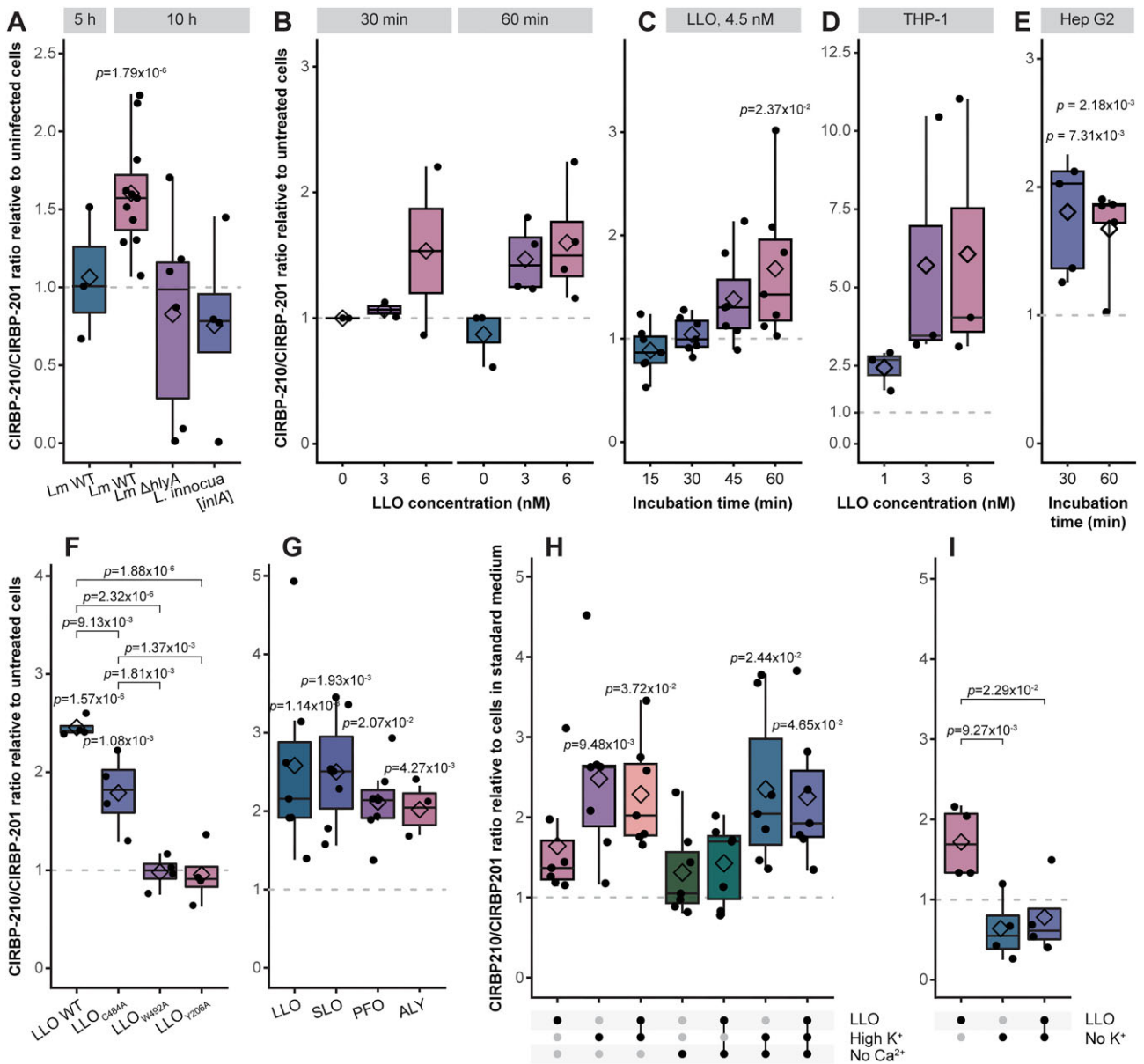


Figure 3. Bacterial PFTs induce a change in the balance between CIRBP isoforms. (A–I) Quantification of the relative abundance between CIRBP-210 and -201 transcripts in cells in response to infection or to exposure to bacterial PFTs. For each condition, the ratio of CIRBP-210 to CIRBP-201 isoforms was quantified by RT-qPCR, and normalized to the CIRBP-210/CIRBP-201 ratio in uninfected, untreated cells (dashed gray lines). Boxplots represent medians and quartiles of data, with the mean represented as diamonds. Two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test was used for statistical testing between conditions. Each dot represents an independent experiment. **(A)** Relative CIRBP transcript ratio in LoVo cells infected for 5 h with WT *Lm*, or for 10 h with WT *Lm*, or with *Lm* deleted for the *hlyA* gene ($\Delta hlyA$), or with a strain of *L. innocua* rendered invasive by the expression of the *Lm* internalin gene *inIA*, compared with uninfected LoVo cells. **(B)** Relative CIRBP transcript ratio in LoVo cells treated for 30 or 60 min with 3 or 6 nM LLO, compared with untreated cells. **(C)** Relative CIRBP transcript ratio in LoVo cells treated for 15–60 min with 4.5 nM LLO compared with untreated cells. **(D)** Relative CIRBP transcript ratio in PMA-activated THP-1 monocytes treated for 1 h with 1, 3 or 6 nM LLO, compared with untreated cells. **(E)** Relative CIRBP transcript ratio in Hep G2 hepatocytes treated for 30 or 60 min with 4.5 nM LLO compared with untreated cells. **(F)** Relative CIRBP transcript ratio in LoVo cells treated for 1 h with 4.5 nM LLO or catalytically impaired mutants of LLO, compared with untreated cells. **(G)** Relative CIRBP transcript ratio in LoVo cells treated for 1 h with 4.5 nM cholesterol-dependent cytolysins (perfringolysin O, PFO; streptolysin O, SLO; or aerolysin, ALY), compared with untreated cells. **(H and I)** Relative CIRBP transcript expression ratio in cells incubated in isotonic buffers containing varying cation concentrations for 30 min, before addition or not of 4.5 nM LLO for 1 h. **(H)** Incubation in standard medium containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, compared with high potassium medium containing 140 mM KCl, 5 mM NaCl, 1.5 mM $CaCl_2$ (High K^+) or calcium-free medium (No Ca^{2+}). **(I)** Incubation in standard medium, compared with medium lacking extracellular potassium (No K^+).

responsible for LLO-mediated switch in CIRBP isoforms, the ability of other purified PFTs to induce this switch was assessed. Similarly to LLO, streptolysin O (SLO) and perfringolysin O (PFO) are CDCs that create large pores, while aerolysin (ALY) does not bind cholesterol but rather glycosylphosphatidyl (GPI)-anchored proteins and forms pores of smaller diameter (1.5–2 nm) (23,41). Using identical incubation conditions as for LLO—except that pro-aerolysin was activated for 10 min with trypsin (42)—the three PFTs induced a 2.2- to 2.6-fold increase in isoform ratio (Figure 3G). CIRBP isoform switch can thus be driven by the perforation of membranes, independently of pore size. This suggests that a CIRBP-regulating cellular stimulus could be induced by the transit of ions or small solutes across the plasma membrane.

Perturbations of cationic gradients across the plasma membrane phenocopies LLO-induced switch in CIRBP isoform abundance

By forming pores in the plasma membrane, LLO and other PFTs lead to potassium effluxes as well as calcium and sodium influxes, thus altering the gradients of cation concentrations that are actively maintained across the plasma membrane in living cells (26,43). To test if LLO-dependent cation leakage was involved in CIRBP regulation, cells were incubated in conditions that inhibit passive ion fluxes by using a high-potassium/low-sodium medium, to prevent potassium efflux/sodium influx, a calcium-free medium, to prevent calcium influx, or a high-potassium and calcium-free medium to prevent both fluxes. Sodium concentrations were adjusted so that each medium remained isotonic, in order to avoid osmotic shock. Cells were pre-incubated for 30 min in each medium prior to LLO addition for 1 h, then the CIRBP isoform ratio was assessed by RT-qPCR (Figure 3H). While cells incubated in the calcium-depleted medium behaved like cells in standard medium, with a 2-fold increase in the CIRBP-210 to -201 ratio in the presence of LLO, a high extracellular potassium/low sodium concentration alone was sufficient to induce a stronger switch of CIRBP isoforms than LLO, whether in the presence or the absence of LLO or in calcium-depleted medium. Conversely, totally eliminating potassium from the extracellular medium led to a decrease in the CIRBP-210/CIRBP-201 ratio that was not compensated by incubation with LLO (Figure 3I), suggesting that the balance between sodium and potassium concentrations across the plasma membrane has a strong influence on CIRBP regulation. Since LLO provokes potassium effluxes through membrane pores, one possible hypothesis for the nature of the signal that triggers CIRBP isoform switch would be a sensing of extracellular potassium concentration increase (and/or sodium decrease), or a cytotoxic effect of this ionic imbalance. An alternative—although intimately related—hypothesis would be that the CIRBP isoform switch is triggered by perturbations of the plasma membrane potential as a result of cationic imbalance across the plasma membrane.

CIRBP alternative splicing is under control of CLK1 kinase activity in LoVo cells

A switch in CIRBP alternatively spliced isoforms, similar to the one we observed in response to *Lm* infection and to the activity of PFTs, has already been reported to occur as a consequence of heat stress (7,9). This regulation has been directly

linked to a loss of activity of the CLK1 kinase (7). Upon heat stress, CLK1 inhibition has been shown to shift the splicing of CIRBP in favor of CIRBP-210-like isoforms, probably through the dephosphorylation of serine/arginine-rich splicing factors, known as SR proteins, that are targets of CLK1 kinase activity (7,9). Consistently, treatment of LoVo cells with 0–5 μ M of the CLK1 pharmacological inhibitor TG003 for 48 h, or with 75 μ M TG003 for 1 h, shifted the splicing of CIRBP pre-mRNAs in favor of CIRBP-210 in a dose-dependent manner (Figure 4A), thus validating that CLK1 is a regulator of CIRBP isoform switch in LoVo cells, similar to what has been described in the HEK293 cell line (7).

The processing of CLK1 pre-mRNA is altered upon infection

The expression of CLK1 itself is highly sensitive to heat stress (44). Indeed, CLK1 transcripts are represented by two major forms: a mature protein-coding mRNA and a premature, nuclear form in which introns 3 and 4 are retained (retained introns, RIs). Upon heat stress, the dephosphorylation of CLK1 prevents its kinase activity on SRSFs (7,44). The subsequent dephosphorylation of SR proteins promotes the splicing of the RI pool into mature CLK1 mRNAs, which facilitates the rapid re-phosphorylation of SRSFs upon stress release (44). To assess the effect of LLO-induced stress on CLK1 maturation, a region spanning exons 2–12 was amplified by PCR on cDNA prepared from cells that had been exposed to 4.5 nM LLO for 15, 30, 45 or 60 min, or to 75 μ M TG003 for 1 h, or from untreated cells (Figure 4B). The pore-forming toxin stimulated the processing of CLK1 pre-mRNA from the RI form (top band) into its mature form (bottom band), with an intermediate form where the splicing between exons 3 and 4 was restored appearing after 15 min of treatment. The fully spliced transcript accumulated after 45 min, until being nearly fully spliced after 1 h of treatment, phenocopying the effect of 1 h of TG003-mediated CLK1 inhibition. Quantification by RT-qPCR of the ratio between the RI and the mature isoform confirmed the loss of the RI form after 60 min of treatment with 4.5 nM LLO compared with untreated cells (Figure 4C). LLO treatment can thus recapitulate the auto-regulatory processing of CLK1 transcripts that is a typical signature of CLK1 loss of activity and SR protein dephosphorylation, similar to what occurs upon heat stress (44).

The phosphorylation and expression of SRSFs are impaired upon infection or LLO incubation

To determine the impact of *Lm*- or LLO-mediated regulation of CLK1 on its activity, the phosphorylation status of SR proteins was detected by specific immunoblotting against their phosphoepitopes at 1 h post-treatment of cells with 4.5 nM purified LLO. LLO induced a reduction of the phosphorylation level of SR proteins, best represented here by SRSF4 and SRSF6, by ~70% (Figure 4D, E).

The effects of dephosphorylation of SR proteins on their activity is expected to affect the splicing of genes other than CIRBP, including SRSF genes that encode SR proteins themselves (32,34,45). Consistently, nine SRSFs were affected by AS events at 10 hpi compared with NI cells (Figure 1A; Supplementary Figures S1A and S6). Among these, five (SRSF2, 3, 4, 6 and 7) were affected by shifts towards transcripts that harbor a ‘poison exon’, rendering them targets for degradation by NMD, and three (SRSF1, 5 and 10) resulted in

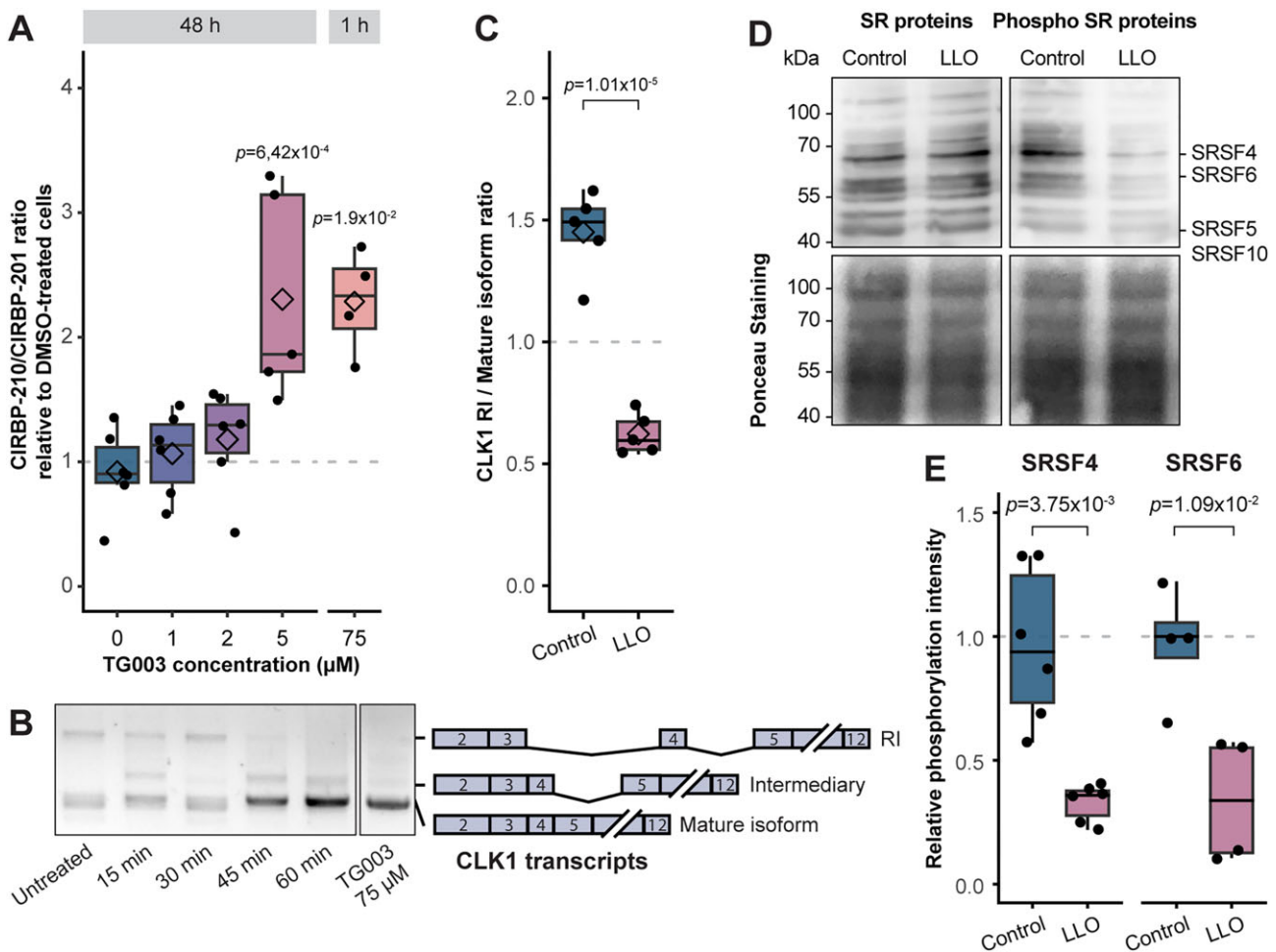


Figure 4. CLK1 activity is regulated in response to LLO-induced stress and impacts CIRBP alternative splicing in LoVo cells. **(A)** Relative CIRBP transcript ratio in cells incubated for 48 h with 0.5–5 μM TG003 ($n = 5$), or for 1 h with 75 μM TG003 ($n = 4$). RT-qPCR quantification was performed and normalized as detailed in the legend to Figure 3. **(B)** Assessment of the splicing of CLK1 retained introns 3 and 4 upon incubation with LLO. LoVo cells were treated with 4.5 nM LLO for 15 min to 1 h, or with 100 μM TG003 (a pharmaceutical inhibitor of CLK1) for 1 h, then the maturation of CLK1 transcripts was assessed by reverse transcription followed by PCR with specific primers. **(C)** Quantification by RT-qPCR of the proportion of the retained intron (RI) isoform with respects to the mature isoform in cells treated for 60 min with 4.5 nM LLO compared with untreated cells in five independent experiments. For each condition, the abundance of each isoform was quantified with two pairs of specific primers spanning relevant exon–exon or exon–intron junctions and normalized to GAPDH. The average of the two pairs was used for calculating the ratio between the RI and mature isoforms. **(D)** Assessment by immunoblotting of the phosphorylation status of SRSFs in LoVo cells incubated for 1 h with LLO compared with untreated cells (representative experiment from four replicates). **(E)** Quantification of the phosphorylation of SRSF4 and SRSF6 from, respectively, four and six independent immunoblots performed as in (C). For each condition, the mean intensity detected with the anti-phospho-SR protein antibody was normalized to the corresponding intensity for GAPDH.

non-coding alternative transcripts. Accordingly, the expression of these genes was dampened in infected cells, as attested by lower RNA levels and ribosome footprints (Supplementary Figure S1B). These results corroborate a model in which the stress generated during infection by the pore-forming activity of LLO leads to the dephosphorylation of SR proteins via CLK1 inhibition, which in turns reshapes the cellular splicing landscape, including by favoring the splicing of CIRBP pre-mRNAs towards NMD-sensitive isoforms, as well as that of SRSF pre-mRNAs towards unstable or non-coding transcripts.

CIRBP isoforms have opposite effects on cell infection

To investigate the possible consequences of CIRBP regulation as a player in the *Lm*–host crosstalk, isoform-specific knock-

down was performed using siRNAs targeting (i) the CDS of CIRBP, which targets both CIRBP-201 and -210 (siCIRBP-CDS), (ii) the 3'-UTR of CIRBP-201 specifically (siCIRBP-201) or (iii) the 3'-UTR of CIRBP-210 specifically (siCIRBP-210) (Supplementary Figure S7). After 48 h of RNA interference, cells were infected with *Lm* for 10 h before enumerating intracellular bacteria (Figure 5A). Knocking down CIRBP-210 led to a 27% increase in cfu per cell, while knocking down CIRBP-201 decreased the number of cfu per cell by 31%. Knockdown of all CDS-containing CIRBP isoforms displayed an intermediate phenotype with a non-significant 14% decrease in infection. These results hint at a role for CIRBP in the control of cell autonomous responses to infection, and emphasize the contribution of CIRBP isoform switch in opposing the colonization of cells by bacteria by dampening the expression of a probacterial protein-coding isoform in favor of a less stable transcript.

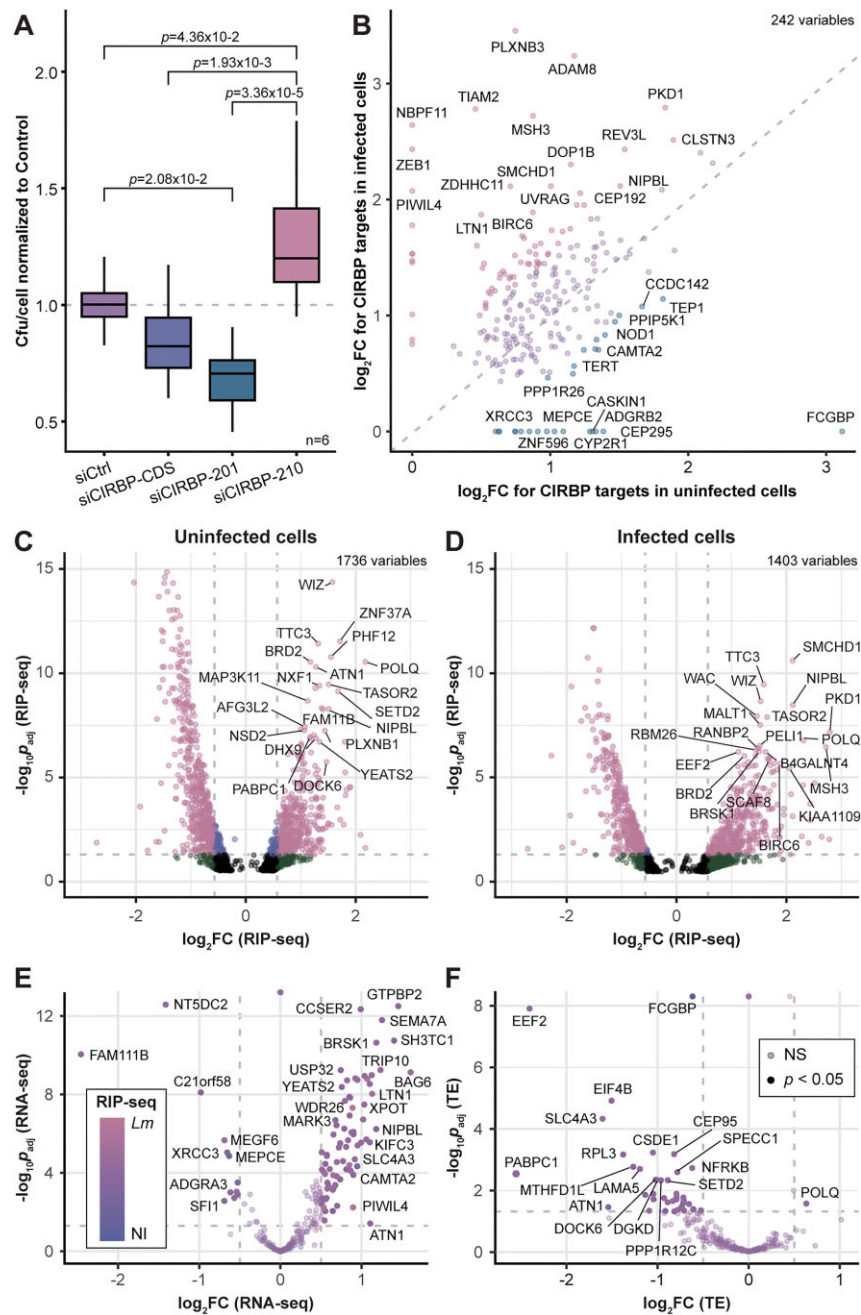


Figure 5. Function of CIRBP in the cellular response to *L. monocytogenes* infection. **(A)** Quantification of *Lm* infection in LoVo cells silenced for CIRBP, or for one of its isoforms. Bacterial colonization of LoVo cells, transfected with siRNA targeting the CIRBP CDS (siCIRBP-CDS), CIRBP-201 3'-UTR, CIRBP-210 3'-UTR or a control scrambled siRNA (siCtrl), was assessed by gentamicin protection assay followed by serial dilution plating of infected cell lysates on agar plates. The number of cfu per cell in each condition was normalized to infection levels in the control condition in six independent experiments. One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test was used for statistical testing between conditions. **(B–D)** RIP of CIRBP targets. CIRBP targets were identified by differential expression analysis between a CIRBP pull-down mRNA fraction and both total mRNAs (input) or a control IgG pull-down mRNA fraction. Values of enrichments between the CIRBP pull-down fraction and the IgG pull-down fraction were used for plotting. Pseudogenes were not plotted. Data from two independent replicates. FC, fold change; p_{adj} , adjusted *P*-value [DESeq false discovery rate (FDR)]. **(B)** Scatter plots of changes in enrichment of significant CIRBP targets in uninfected versus *Lm*-infected cells. Only transcripts enriched in the CIRBP pull-down fraction in both comparisons (against the input, and against control IgGs) were kept as targets (2542 genes). Data points colored in mauve represent transcripts that were similarly bound by CIRBP in the two datasets ($|\Delta\log_2FC_{Lm-NI}| < 0.5$), while points colored in pink ($\Delta\log_2FC > 0.5$) and blue ($\Delta\log_2FC < -0.5$) correspond, respectively, to transcripts enriched in infected and uninfected cells. **(C and D)** Volcano plots highlighting CIRBP targets being significantly enriched in (C) uninfected cells and (D) *Lm*-infected cells at 10 hpi compared with the control RIP. Data points colored in pink represent genes with $p_{adj} < 0.05$ (dashed gray horizontal line, $-\log_{10}p_{adj} = 1.3$) and an FC above 1.41 (vertical dashed gray lines, $\log_2FC = \pm 0.5$). Gray dots, non-significant; green dots, $\log_2FC > 0.5$, $p_{adj} > 0.05$; blue dots, $p_{adj} < 0.05$, $\log_2FC < 0.5$; and pink dots, $\log_2FC > 0.5$, $p_{adj} < 0.05$. The 20 genes with the highest Manhattan distance to the origin were labeled on each graph. **(E and F)** Volcano plots highlighting changes in mRNA levels (RNA-seq data; E) and translation efficiency (TE) assessed by normalizing Ribo-seq counts to RNA-seq counts (F) for the 242 CIRBP targets, in cells infected with *Lm* for 10 h compared with NI cells. The color of data points ranging from blue to pink reflects the $\Delta\log_2FC$ of RIP enrichment in infected (*Lm*) versus NI cells. Data points colored in full color represent genes with $p_{adj} < 0.05$ (dashed gray horizontal line, $-\log_{10}p_{adj} = 1.3$) and an FC > 1.41 (vertical dashed gray lines, $\log_2FC = \pm 0.5$). Genes with non-significant variation are displayed with reduced opacity.

CIRBP mRNA targets shift from housekeeping- to stress response-related functions upon infection

As CIRBP acts as a regulator of gene expression by binding its target mRNAs, we compared the sets of CIRBP targets between non-infected and infected cells by RIP of CIRBP followed by Illumina sequencing of co-precipitated mRNAs (RIP-seq) (Supplementary Table S4). From a total of 242 identified mRNA targets, a common core of 146 genes were similarly enriched in CIRBP IPs in both conditions (Figure 5B). In contrast, two distinct sets of mRNAs were preferentially bound by CIRBP depending on infection; 28 targets were preferentially enriched in non-infected cells (Figure 5B, blue dots; Figure 5C), and 68 others were preferentially enriched in infected cells (Figure 5B, pink dots; Figure 5D), probably reflecting a reallocation of CIRBP regulatory activity on cellular mRNAs in response to infection. Comparison of the sets of CIRBP-bound targets by GO over-representation analysis highlighted an overall shift in the functions of their products between the two conditions (Supplementary Figure S8). Enrichment for housekeeping functions [transcription, organization of the cytoskeleton (especially centrosomes)] or metal cation binding was reduced upon infection, in favor of functions associated with cellular response to stress, DNA damage response and repair, ubiquitination and proteolysis, and regulation of metabolic processes. The observed changes in the set of CIRBP targets suggest that infection-induced control of CIRBP activity contributes to the coordinated regulation orchestrating the cellular response to infection-induced stress.

To investigate a potential role for CIRBP in the regulation of its targets during infection, we have intersected the set of 242 CIRBP targets from RIP-seq analysis with data of differential expression between non-infected and 10 h-infected cells from RNA-seq (Figure 5E; Supplementary Table S4E), Ribo-seq (Supplementary Figure S9A; Supplementary Table S4E), translational efficiency (TE; Figure 5F; Supplementary Table S4E) or differential LSVs (Supplementary Figure S9B; Supplementary Table S4F). CIRBP targets were not enriched for a differential use of LSVs (Fisher's test $P = 0.2$), suggesting that CIRBP itself does not behave as a regulator of AS in this context (Supplementary Figure S9B). In contrast, there was a strong enrichment of CIRBP mRNA targets for differential RNA expression (Fisher's test $P = 2.7 \times 10^{-9}$) and, most strikingly, for increased mRNA abundance upon infection (Figure 5E). Conversely, there was an enrichment for transcripts with reduced TE in infected cells among CIRBP targets (Figure 5F) (Fisher's test $P = 1.4 \times 10^{-6}$). These two observations were mirrored in the ribosome footprint plot (Supplementary Figure S9A) (Fisher's test $P = 2.4 \times 10^{-6}$): genes that are translated proportionally to their increased mRNA abundance display increased footprint levels, whereas those that are translationally repressed, while not varying in mRNA abundance, display reduced footprints (Supplementary Figure S9A). These data suggest that the modulation of CIRBP abundance, sub-cellular localization and/or function during infection impacts the stability or translation of its targets in a proportion that contributes to the host gene expression response to infection.

Discussion

A broad range of damaging challenges trigger the activation of coordinated cell stress response pathways that integrate signaling cascades and gene expression regulation. Among cen-

tral players in the coordination of cell responses, CIRBP has previously been documented to regulate the expression of mRNAs involved in the modulation of the cell cycle and of inflammation, following exposure to multiple types of abiotic stressing agents (heat stress, UV or ionizing radiation, hypoxia, oxidative or osmotic stress, or nutrient deprivation) or to viral infections (3,4,12). Our findings extend the role of CIRBP to the control of cell autonomous responses to biotic stress caused by bacterial PFTs upon a bacterial infection, with downstream effects on the modulation of infection efficiency in a cell monolayer (Figure 6). In spite of the distinct nature of the initial stressors, our results highlight that the mechanisms of regulation of CIRBP by AS are shared between the previously described response to heat stress (7,9) and to PFT-dependent membrane damage. The exact nature of the imbalance that is sensed upon membrane permeation is currently unclear, as discriminating effects of intra-/extracellular cation concentrations from that of a perturbation of the plasma membrane potential constitutes a technical hurdle.

Following stress sensing, the CLK1 kinase appears to play a key role as an integrator of distinct types of damaging challenges by controlling the activity of SRSFs, although the signaling pathways bridging stress sensing with the control of CLK1 activity are still elusive. CLK1-dependent inhibition of SR proteins reorients the splicing of specific cellular transcripts, including CIRBP and CLK1 itself, towards the production of alternatively processed mRNAs (7,44). Pre-mRNA processing of CIRBP is then shifted from the use of a canonical 3'-UTR to an alternative 3'-UTR that contains a spliced intron. Upon splicing, deposition in the 3'-UTR of an exon junction complex that cannot be removed by translating ribosomes renders this type of transcript sensitive to NMD, and thus unstable (46). The stress-induced AS of CIRBP transcripts in favor of an NMD-sensitive RNA isoform thus lowers CIRBP mRNA expression, including in response to LLO-dependent stress during *Lm* infection and more generally to the stress induced by several classes of bacterial PFTs. CIRBP protein levels are also down-regulated by LLO-induced stress. The release of eCIRBP following LLO-dependent membrane damage probably contributes to this reduction, although we cannot rule out that the stability of the protein is also impacted by LLO activity. Following eCIRBP release, the reduced levels of CIRBP mRNAs in infected cells would oppose the replenishment of CIRBP protein stores.

Besides the control of CIRBP AS by the CLK1-dependent activity of SRSFs, it has been previously reported that modulation of m⁶A modification in the sixth exon of CIRBP influenced its AS, with a positive effect of methylation on the expression of the long protein-coding, CIRBP-225 isoform (12). In the present study, CIRBP-225 was expressed at a very low level in the LoVo cell line and not significantly affected by infection. However, given the involvement of the splice junction in exon 6 in both cases, it is to be wondered whether CIRBP-201 to -210 AS might also depend on a differential methylation in exon 6 for the selection of the acceptor sites in exons 7a and 7b, respectively. Deeper investigation would also be required to determine if m⁶A modification of CIRBP mRNA and SR protein activity are independent, additive mechanisms resulting in distinct forms of CIRBP AS in different contexts, or if one of them would condition the other.

In addition to quantitative effects on CIRBP mRNA stability due to NMD, the isoform switch in CIRBP that is observed upon *Lm* infection also impacts the sequence of the

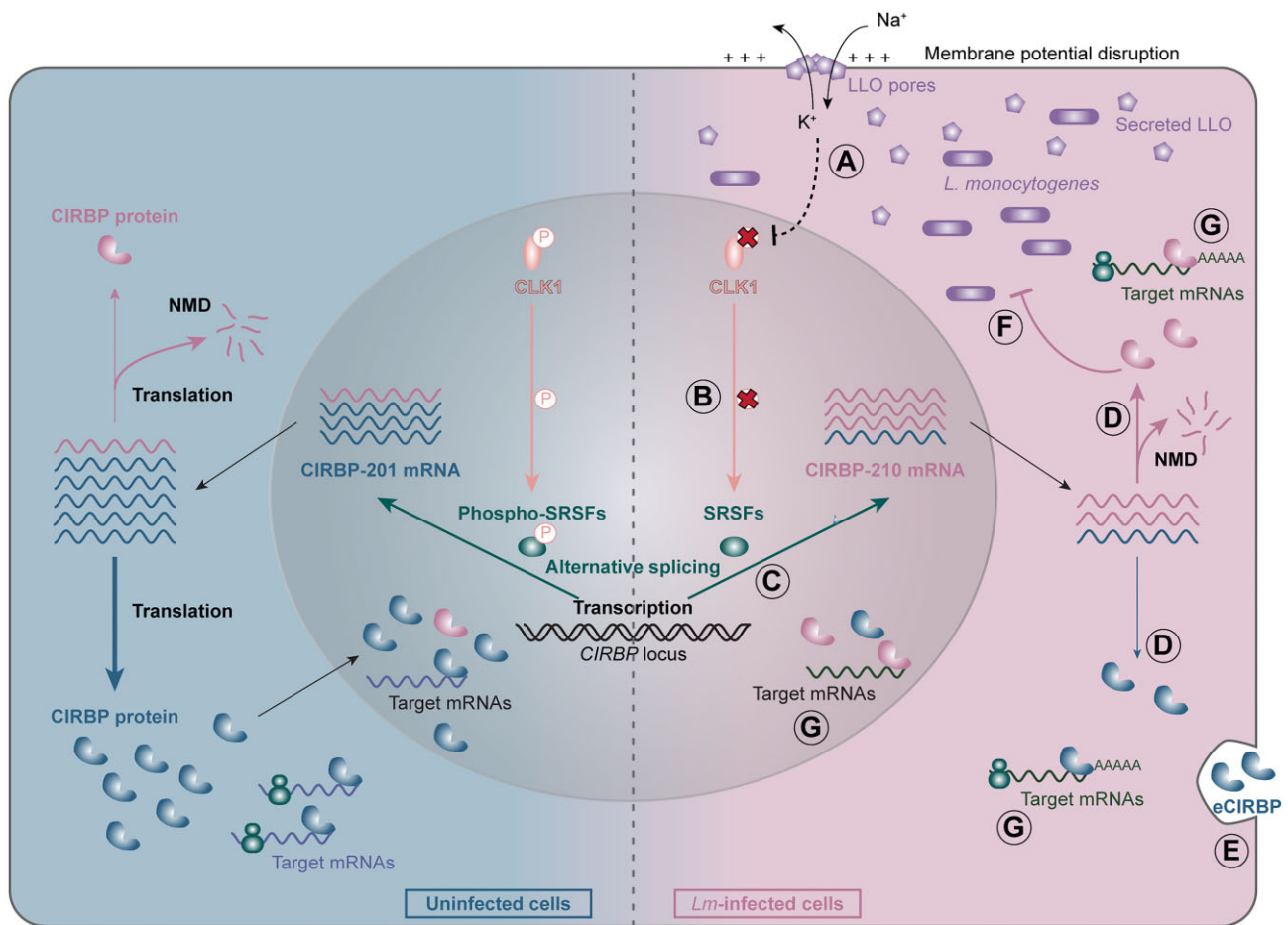


Figure 6. Model of CIRBP regulation in response to *L. monocytogenes* infection. In uninfected cells (left, blue background), the splicing of CIRBP pre-mRNA is in favor of the CIRBP-201 isoform, which is translated into the canonical 18 kDa CIRBP protein that regulates the expression of a subset of human mRNAs. In *Lm*-infected cells (right, pink background), upon LLO-induced membrane damage (A), CLK1 activity is inhibited, which results in a decreased phosphorylation of SR proteins (SRSFs) (B). This causes a shift in CIRBP splicing in favor of the CIRBP-210 isoform (C). As this isoform is a target of NMD, it is unstable, which results in reduced overall mRNA abundance and translation (D). Secretion of CIRBP (eCIRBP) in response to LLO-induced cell damage also probably contributes to reduce the pool of pre-existing CIRBP protein (E). Expression of CIRBP-210 displays anti-bacterial effects, in contrast to that of CIRBP-201 (F). The subset of CIRBP-bound mRNAs in infected cells also differs from that of uninfected cells (G).

encoded protein products. It is thus expected that CIRBP-210 product gradually replaces CIRBP-201 product after eCIRBP release. Discriminating the impact of protein sequence change from quantitative effects has not been addressed in the present study, or in the existing literature to the best of our knowledge, and is worthy of detailed investigation in the future. The divergence between CIRBP-201- and -210-encoded proteins only affects the last four residues in the sequence, but entails the loss of a putative phosphorylation site previously hypothesized to participate in the nucleocytoplasmic partitioning of CIRBP (35), which is functionally relevant since the stress-induced translocation of CIRBP to the cytoplasm impacts its ability to bind and regulate its target genes (3). Hence, a change in the localization or functionality of the CIRBP-210 product could make up a share of the differential effect of the two isoforms on the binding to and regulation of CIRBP target mRNAs and on infection, on top of a purely quantitative effect due to altered RNA stability.

Our observation that expression of CIRBP-201 is rather probacterial is consistent with a previous report where both the dominant CIRBP-201 and the low abundance CIRBP-225-like protein-coding isoforms were found to have pro-

vidual effects, independently of their respective localizations (predominantly nuclear for the former, cytoplasmic for the latter) (12). Both findings hint at a detrimental effect of expression of canonical CIRBP on the ability of epithelial cells to face infectious challenges. However, isoform-based regulation differs between the two studies. During viral infections, quantities of short CIRBP-201 (or -210, although it was not addressed in that study) products (CIRBP-S) remained stable, while levels of long CIRBP-225 products (CIRBP-L) were reduced due to the above-mentioned loss of m⁶A modification in the sixth exon. In contrast, upon *Lm* infection we observed a reduction of CIRBP-201 levels and of CIRBP-S protein levels, while expression of CIRBP-225 remained invariably low (Supplementary Table S3G). These differences in expression may reflect intrinsic differences between the two model cell lines in the set of isoforms they express, or distinct mechanisms of regulation of CIRBP upon cellular stresses on the one hand, and viral infection on the other hand. Comparatively addressing the differential contribution of CIRBP-201, -210 and -225 isoforms to the control of viral and bacterial infections, respectively, deserves closer attention in the future.

In response to *Lm* infection, CIRBP overall activity is impacted not only by the regulation of its abundance and the nature of its isoforms, but also probably by its localization (cytoplasmic, nuclear or in membraneless organelles) and post-translational modifications, as previously reported in response to other stressors (5). The two latter levels of regulation will deserve close investigation, as they can strongly condition the ability of CIRBP to bind and regulate its target genes during infection. Although a common core of CIRBP targets identified in RIP-seq was similarly bound in infected and uninfected conditions, preferential binding of CIRBP to a subset of mRNAs in infected cells probably reflects a modulation of its affinity for its binding sites or of its localization. The loss of a putative phosphorylation site in the product of CIRBP-210 could, for instance, have an impact on CIRBP binding features, or on its ability to reach its targets due to an altered subcellular distribution. Alternatively, LLO-induced stress could affect CIRBP phosphorylation or methylation independently of its protein isoform (3,35).

During infection, a consistent fraction of CIRBP targets tend to display increased mRNA levels and, as a consequence, be more translated. This could proceed from a positive impact of CIRBP on the stability of its target mRNA during infection or, on the contrary, for targets that are shared between the two conditions, from a repressive role for CIRBP in uninfected cells that would be alleviated upon infection due to reduced CIRBP abundance. Among the mRNAs that are preferentially bound by CIRBP in infected cells, BAG6, LTN1, WDR26 and ZEB1 are up-regulated. Interestingly, the proteins encoded by these genes have functions related to the control of cell death (BAG6, WDR26), ubiquitin-dependent proteolytic degradation of proteins in response to stresses (LTN1, WDR26) or regulation of immunity (ZEB1, BAG6), exemplifying a larger pool of CIRBP infection-specific targets with a function related to cellular response to stress. Given their cellular roles, up-regulation of these factors could be part of a CIRBP-mediated cellular response to better accommodate LLO-induced stress and respond to infection.

Another set of CIRBP targets—that are bound both in infected and non-infected cells—is translationally repressed during infection. This repression might reflect a relocation of CIRBP and of its mRNA targets to translationally inactive stress granules, as previously shown upon osmotic or heat shock (3). Of note, several of the translationally repressed targets of CIRBP belong to the translational regulon (EEF2, EIF4B, PABPC1, RPL3), which we had previously reported to be translationally repressed upon LLO-induced infection stress as part of a response contributing to dampen bacterial loads (22). A typical feature associated with their co-repression was the presence of a 5'-terminal oligopyrimidine motif in their 5'-UTR. Whether CIRBP binding to these targets is coincidental, or whether it is actively contributing to their localization to stress granules and translational repression would deserve to be untangled in future studies.

Beyond human cells, roles for CIRBP homologs have been previously described in the adaptation of a broad range of multicellular eukaryotes to various types of environmental changes. In reptiles, CIRBP has been reported to be involved in temperature-dependent sex determination, in line with its role during moderate cold or heat exposure in mammals (7,47). In plants, CIRBP homologs of the glycine-rich RNA-binding protein (GRP) family are involved in the control of innate immune responses to bacterial invaders as well as in cold adaptation

and resistance to high salinity or drought (48–50). These similarities of the contribution to the coordination of responses to biotic and abiotic stresses across distant kingdoms of the Eukaryota hint at an ancient, conserved function of this family of proteins as key players in the coordination of defenses against pathogens and damaging environmental challenges.

Data availability

All novel sequencing data discussed in this publication have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible under accession numbers GSE225417 for long-read sequencing and GSE225516 for RIP-seq. Previously published transcriptomic data obtained with Illumina sequencing are available from the European Nucleotide Archive under accession number PRJEB26593 (22). All other data are contained within the manuscript and/or supplementary files.

Supplementary data

Supplementary Data are available at NAR Online.

Acknowledgements

We are grateful to Hervé Le Hir, Lucia Morillo, Nadia Ruiz-Gutierrez, Isabelle Barbosa, Laurent Jourden, Sophie Lemoine, Dominique Weil, Lionel Navarro, Laetitia Vincensini, Brice Sperandio, Caroline Peron-Cane, Thomas Petit and Simon Guette-Marquet for precious scientific discussion, methodological advice and kind help, and to Olivier Disson for sharing reagents.

Author contributions: A.L. initiated and supervised the study. M.C. and A.L. devised the research hypotheses and methodology, and interpreted results. M.C. performed most experiments with occasional assistance by A.K. and A.C., who she supervised. V.Be. provided RNA samples for long-read RNA-seq and methodological advice. A.M. and C.S.B. prepared sequencing libraries and performed sequencing at the École normale supérieure genomics core facility. M.C. analyzed sequencing data with advice and input from V.Bo. and M.T.C. M.C. and A.L. wrote the manuscript.

Funding

The French National Research Agency 'Investissements d'Avenir' [ANR-10-LABX-54 MemoLife, ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-10-INBS-09]; Mairie de Paris Research [programme Émergence(s) Recherche médicale]; the Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (MESRI) [doctoral fellowship to M.C.]; and LabEx MemoLife [doctoral fellowship to M.C.].

Conflict of interest statement

The authors declare no competing interests. The funders took no part in the orientation of research.

References

1. Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. and Samali, A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.*, 2010, 214074.

2. Galluzzi, L., Yamazaki, T. and Kroemer, G. (2018) Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 731–745.
3. De Leeuw, F., Zhang, T., Wauquier, C., Huez, G., Krays, V. and Gueydan, C. (2007) The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp. Cell Res.*, **313**, 4130–4144.
4. Zhong, P. and Huang, H. (2017) Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein. *Future Sci. OA*, **3**, FSO246.
5. Corre, M. and Lebreton, A. (2023) Regulation of cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP) in response to cellular stresses. *Biochimie.*, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.04.003>.
6. Al-Fageeh, M.B. and Smales, C.M. (2009) Cold-inducible RNA binding protein (CIRP) expression is modulated by alternative mRNAs. *RNA*, **15**, 1164–1176.
7. Haltenhof, T., Kotte, A., Bortoli, F.D., Schiefer, S., Meinke, S., Emmerichs, A.-K., Petermann, K.K., Timmermann, B., Imhof, P., Franz, A., et al. (2020) A conserved kinase-based body-temperature sensor globally controls alternative splicing and gene expression. *Mol. Cell*, **78**, 57–69.
8. Horii, Y., Shimaoka, H., Horii, K., Shiina, T. and Shimizu, Y. (2019) Mild hypothermia causes a shift in the alternative splicing of cold-inducible RNA-binding protein transcripts in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **317**, R240–R247.
9. Neumann, A., Meinke, S., Goldammer, G., Strauch, M., Schubert, D., Timmermann, B., Heyd, F. and Preußner, M. (2020) Alternative splicing coupled mRNA decay shapes the temperature-dependent transcriptome. *EMBO Rep.*, **21**, e51369.
10. Lujan, D.A., Ochoa, J.L. and Hartley, R.S. (2018) Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **9**, e1462.
11. Xia, Z., Zheng, X., Zheng, H., Liu, X., Yang, Z. and Wang, X. (2012) Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis. *FEBS Lett.*, **586**, 3299–3308.
12. Gokhale, N.S., McIntyre, A.B.R., Mattocks, M.D., Holley, C.L., Lazear, H.M., Mason, C.E. and Horner, S.M. (2020) Altered m⁶A modification of specific cellular transcripts affects flaviviridae infection. *Mol. Cell*, **77**, 542–555.
13. Qiang, X., Yang, W.-L., Wu, R., Zhou, M., Jacob, A., Dong, W., Kuncewitch, M., Ji, Y., Yang, H., Wang, H., et al. (2013) Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat. Med.*, **19**, 1489–1495.
14. Ode, Y., Aziz, M., Jin, H., Arif, A., Nicastro, J.G. and Wang, P. (2019) Cold-inducible RNA-binding protein induces neutrophil extracellular traps in the lungs during sepsis. *Sci. Rep.*, **9**, 6252.
15. Celli, J. and Tsolis, R.M. (2015) Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 71–82.
16. Knowles, A., Campbell, S., Cross, N. and Stafford, P. (2021) Bacterial manipulation of the integrated stress response: a new perspective on infection. *Front. Microbiol.*, **12**, 645161.
17. Rodrigues, L.O.C.P., Graça, R.S.F. and Carneiro, L.A.M. (2018) Integrated stress responses to bacterial pathogenesis patterns. *Front. Immunol.*, **9**, 1306.
18. Kammoun, H., Kim, M., Hafner, L., Gaillard, J., Disson, O. and Lecuit, M. (2022) Listeriosis, a model infection to study host–pathogen interactions *in vivo*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **66**, 11–20.
19. Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A. and Gorman, A.M. (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep.*, **17**, 1374–1395.
20. Pillich, H., Chakraborty, T. and Mraheil, M.A. (2015) Cell-autonomous responses in *Listeria monocytogenes* infection. *Future Microbiol.*, **10**, 583–597.
21. Shrestha, N., Bahnan, W., Wiley, D.J., Barber, G., Fields, K.A. and Schesser, K. (2012) Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *J. Biol. Chem.*, **287**, 28738–28744.
22. Besic, V., Habibolah, F., Noël, B., Rupp, S., Genovesio, A. and Lebreton, A. (2020) Coordination of transcriptional and translational regulations in human epithelial cells infected by *Listeria monocytogenes*. *RNA Biol.*, **17**, 1492–1507.
23. Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R.G. and van der Goot, F.G. (2011) Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell. Microbiol.*, **13**, 1026–1043.
24. Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K.-P. and Chakraborty, T. (2012) Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.*, **14**, 949–964.
25. Tattoli, L., Sorbara, M.T., Yang, C., Tooze, S.A., Philpott, D.J. and Girardin, S.E. (2013) *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO J.*, **32**, 3066–3078.
26. Vadia, S. and Seveau, S. (2014) Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ are required for the listeriolysin O-dependent internalization pathway of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, **82**, 1084–1091.
27. Kwon, O.S., Mishra, R., Safieddine, A., Coleno, E., Alasseur, Q., Faucourt, M., Barbosa, I., Bertrand, E., Spassky, N. and Le Hir, H. (2021) Exon junction complex dependent mRNA localization is linked to centrosome organization during ciliogenesis. *Nat. Commun.*, **12**, 1351.
28. Vaquero-Garcia, J., Barrera, A., Gazzara, M.R., González-Vallinas, J., Lahens, N.F., Hogenesch, J.B., Lynch, K.W. and Barash, Y. (2016) A new view of transcriptome complexity and regulation through the lens of local splicing variations. *Elife*, **5**, e11752.
29. Chen, Y., Sim, A., Wan, Y.K., Yeo, K., Lee, J.J.X., Ling, M.H., Love, M.I. and Göke, J. (2023) Context-aware transcript quantification from long read RNA-seq data with Bambu. *Nat. Methods*, **20**, 1187–1195.
30. Vitting-Seerup, K. and Sandelin, A. (2019) IsoformSwitchAnalyzeR: analysis of changes in genome-wide patterns of alternative splicing and its functional consequences. *Bioinformatics*, **35**, 4469–4471.
31. Eldridge, M.J.G., Cossart, P. and Hamon, M.A. (2020) Pathogenic biohacking: induction, modulation and subversion of host transcriptional responses by *Listeria monocytogenes*. *Toxins*, **12**, 294.
32. Lareau, L.F., Inada, M., Green, R.E., Wengrod, J.C. and Brenner, S.E. (2007) Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature*, **446**, 926–929.
33. Müller-McNicoll, M., Rossbach, O., Hui, J. and Medenbach, J. (2019) Auto-regulatory feedback by RNA-binding proteins. *J. Mol. Cell Biol.*, **11**, 930–939.
34. Risso, G., Pelisch, F., Quaglino, A., Pozzi, B. and Srebrow, A. (2012) Regulating the regulators: serine/arginine-rich proteins under scrutiny. *IUBMB Life*, **64**, 809–816.
35. Yang, R., Zhan, M., Nalabothula, N.R., Yang, Q., Indig, F.E. and Carrier, F. (2010) Functional significance for a heterogeneous ribonucleoprotein A18 signature RNA motif in the 3′-untranslated region of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related (ATR) transcript. *J. Biol. Chem.*, **285**, 8887–8893.
36. Boehm, V., Kueckelmann, S., Gerbracht, J.V., Kallabis, S., Britto-Borges, T., Altmüller, J., Krüger, M., Dieterich, C. and Gehring, N.H. (2021) SMG5–SMG7 authorize nonsense-mediated mRNA decay by enabling SMG6 endonucleolytic activity. *Nat. Commun.*, **12**, 3965.
37. Li, J., Cai, Z., Vaites, L.P., Shen, N., Mitchell, D.C., Huttlin, E.L., Paulo, J.A., Harry, B.L. and Gygi, S.P. (2021) Proteome-wide mapping of short-lived proteins in human cells. *Mol. Cell*, **81**, 4722–4735.
38. Aziz, M., Brenner, M. and Wang, P. (2019) Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, **106**, 133–146.

39. Ribet,D., Hamon,M., Gouin,E., Nahori,M.-A., Impens,F., Neyret-Kahn,H., Gevaert,K., Vandekerckhove,J., Dejean,A. and Cossart,P. (2010) *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature*, **464**, 1192–1195.
40. Christie,M.P., Johnstone,B.A., Tweten,R.K., Parker,M.W. and Morton,C.J. (2018) Cholesterol-dependent cytolysins: from water-soluble state to membrane pore. *Biophys. Rev.*, **10**, 1337–1348.
41. Dal Peraro,M. and van der Goot,F.G. (2016) Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 77–92.
42. Krause,K.-H., Fivaz,M., Monod,A. and van der Goot,F.G. (1998) Aerolysin induces G-protein activation and Ca²⁺ release from intracellular stores in human granulocytes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18122–18129.
43. Hamon,M.A. and Cossart,P. (2011) K⁺ efflux is required for histone H3 dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and other pore-forming toxins. *Infect. Immun.*, **79**, 2839–2846.
44. Ninomiya,K., Kataoka,N. and Hagiwara,M. (2011) Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *J. Cell Biol.*, **195**, 27–40.
45. de Oliveira Freitas Machado,C., Schafranek,M., Brüggemann,M., Hernández Cañas,M.C., Keller,M., Di Liddo,A., Brezski,A., Blümel,N., Arnold,B., Bremm,A., *et al.* (2023) Poison cassette exon splicing of SRSF6 regulates nuclear speckle dispersal and the response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.*, **51**, 870–890.
46. Le Hir,H., Saulière,J. and Wang,Z. (2016) The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 41–54.
47. Schroeder,A.L., Metzger,K.J., Miller,A. and Rhen,T. (2016) A novel candidate gene for temperature-dependent sex determination in the common snapping turtle. *Genetics*, **203**, 557–571.
48. Kim,J.S., Jung,H.J., Lee,H.J., Kim,K.A., Goh,C.-H., Woo,Y., Oh,S.H., Han,Y.S. and Kang,H. (2008) Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **55**, 455–466.
49. Kim,J.Y., Kim,W.Y., Kwak,K.J., Oh,S.H., Han,Y.S. and Kang,H. (2010) Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *J. Exp. Bot.*, **61**, 2317–2325.
50. Nicaise,V., Joe,A., Jeong,B., Korneli,C., Boutrot,F., Westedt,I., Staiger,D., Alfano,J.R. and Zipfel,C. (2013) *Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *EMBO J.*, **32**, 701–712.

Supplementary material for
Alternative splicing induced by bacterial pore-forming toxins
sharpens CIRBP-mediated cell response to *Listeria* infection

Morgane Corre, Volker Boehm, Vinko Besic, Anna Kurowska, Anouk Viry, Ammara Mohammad, Catherine Sénamaud-Beaufort, Morgane Thomas-Chollier and Alice Lebreton

This document includes Supplementary Figures S1 to S9 and their captions, as well as captions for Supplementary Tables S1 to S4.

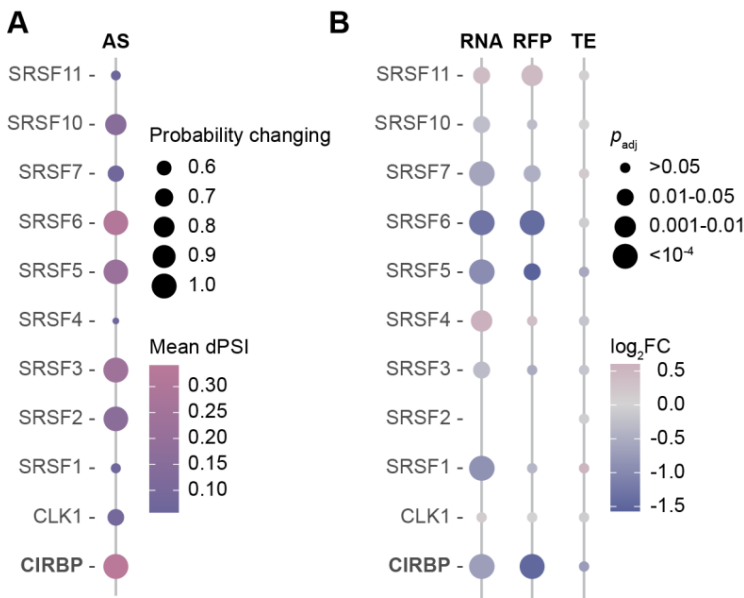


Figure S1. Expression of human genes affected by isoform-based regulations upon 10-h infection with *Listeria monocytogenes*.

(A-B) Dot plot highlighting (A) alternative splicing events (dPSI and probability of changing) for a subset of genes of interest at 10 hpi, and (B) their corresponding genes expression in terms of differential mRNA abundance (RNA), ribosomal occupancy (ribosome footprints, RFP) and translation efficiency (TE) when compared to uninfected cells. \log_2FC (fold change); p_{adj} , adjusted p -value [DESeq false discovery rate (FDR)]. Data from three independent replicates of RNA-seq and Ribo-seq short-read cDNA sequencing at 0, 2 and 5 hpi; 2 replicates at 10 hpi.

Human genome (hg38), chromosome 19

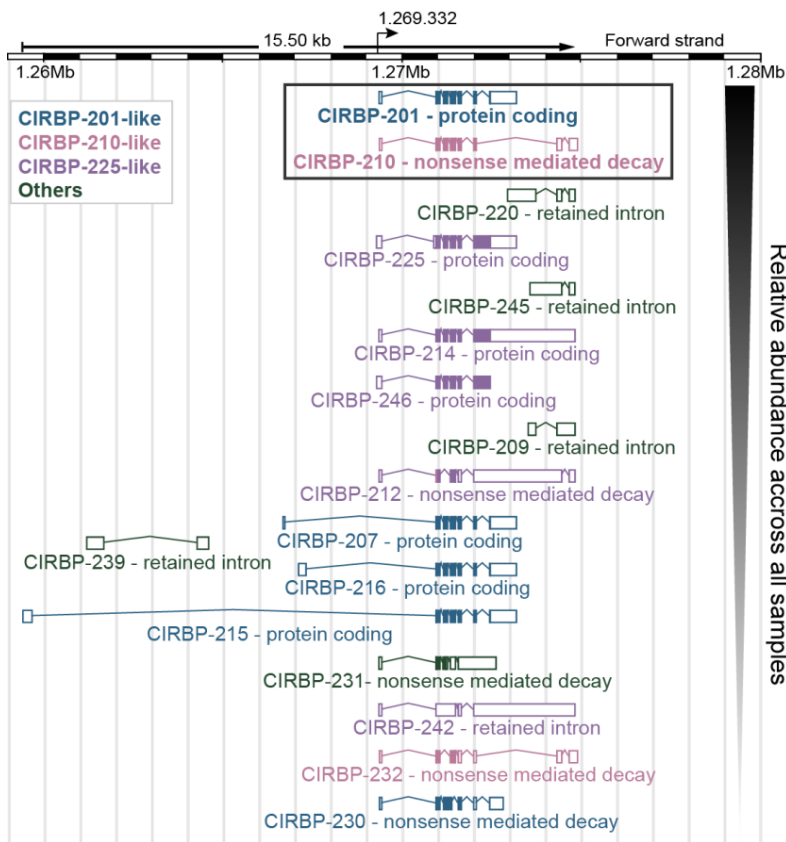


Figure S2. Map of CIRBP isoforms detected in LoVo cells by long-read sequencing.

Assigned isoforms that represented more than 0.5% of overall transcripts in long-read sequenced samples after Bambu-ISAR analysis are represented by decreasing abundance. CIRBP splice variants are grouped into four categories based on LSVs involving the junction of position 1,272,051 in exon 6 with downstream sequences. (a) In CIRBP-201-like isoforms, in blue, the acceptor site is located at position 1,272,427 (exon 7a). The prototype version, CIRBP-201, encodes a 172-amino-acid protein. (b) In CIRBP-210-like isoforms, in pink, the acceptor splice-site is shifted to position 1,274,307 (exon 7b). The prototype CIRBP-210 harbors a spliced exon between exons 7b and 8 in its 3'-UTR, which make it an NMD target and thus unstable. The protein it encodes only has a few amino acid differences compared with CIRBP-201. (c) In CIRBP-225-like transcripts, in purple, no splicing occurs at position 1,272,051, leading to an intron retention. Most CIRBP-225-like isoforms encode elongated versions of the CIRBP protein (292 amino acids for CIRBP-225). (d) Other isoforms. The position of the common transcription start site detected for complete nanopore reads aligning with CIRBP-201- and CIRBP-210-like transcripts in our datasets is indicated with a black arrow.

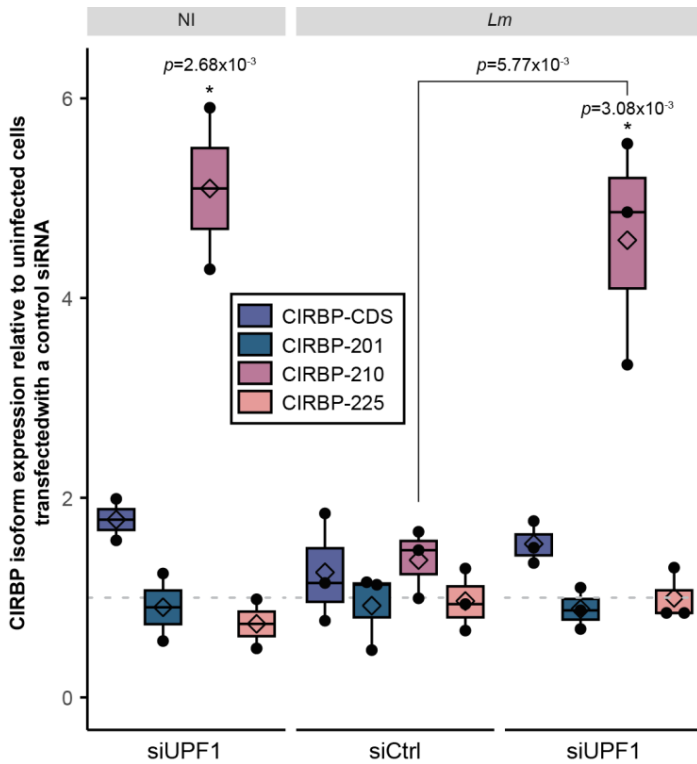


Figure S3. Expression of CIRBP isoforms in conditions of repression of the NMD and/or of infection by *Listeria monocytogenes*.

Total CIRBP mRNAs (CIRBP-CDS) or each one of the isoforms CIRBP-201, -210 or -225 were quantified by RT-qPCR in LoVo cells transfected with a siRNA targeting UPF1 (siUPF1) or a scrambled siRNA (siCtrl), either non-infected (NI) or in cells infected for 10 h with *Lm*, using isoform-specific primers, and normalized to GAPDH. Expression levels are expressed relative to the level of each transcript in uninfected cells transfected with the scrambled siRNA. Boxplots represent medians and quartiles of data from four independent experiments. One way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test was used for statistical testing between conditions.

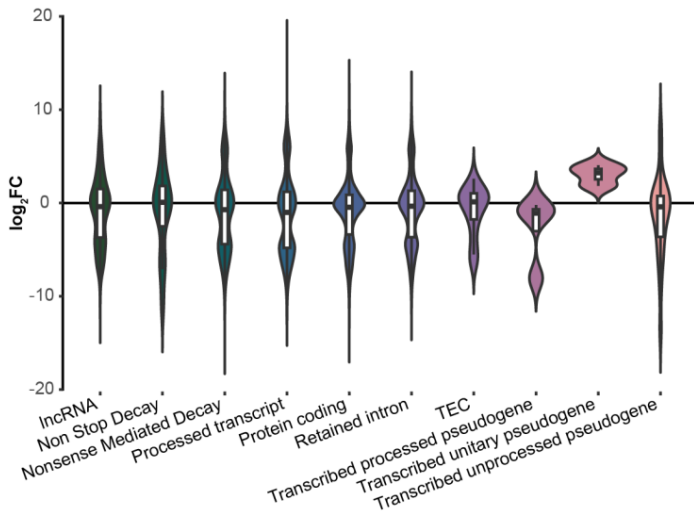


Figure S4. Distribution of isoform switches according to isoform biotypes.

Violin plot of the \log_2 fold change (FC) distribution of the switching isoforms for each isoform biotype represented in BioMart: long non-coding RNA (lncRNA), non-stop decay targets, nonsense mediated decay targets, stable protein coding isoforms, isoforms with a retained intron, so-called “to be experimentally confirmed” (TEC) isoforms, transcribed processed pseudogenes, transcribed unitary pseudogenes and transcribed unprocessed pseudogenes.

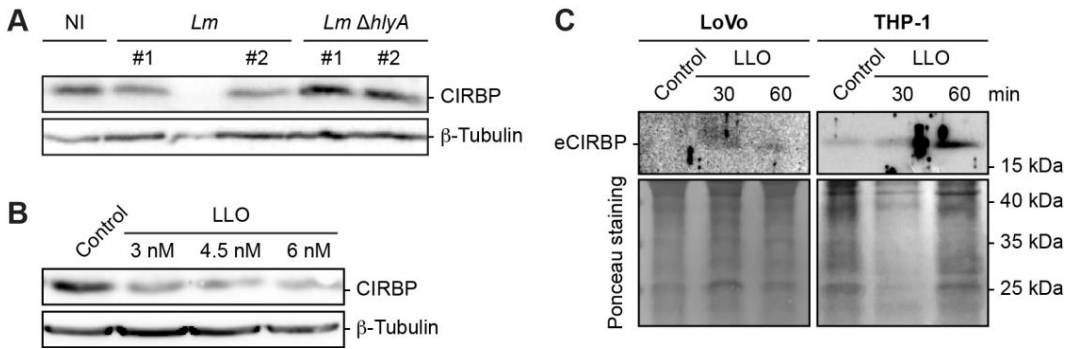


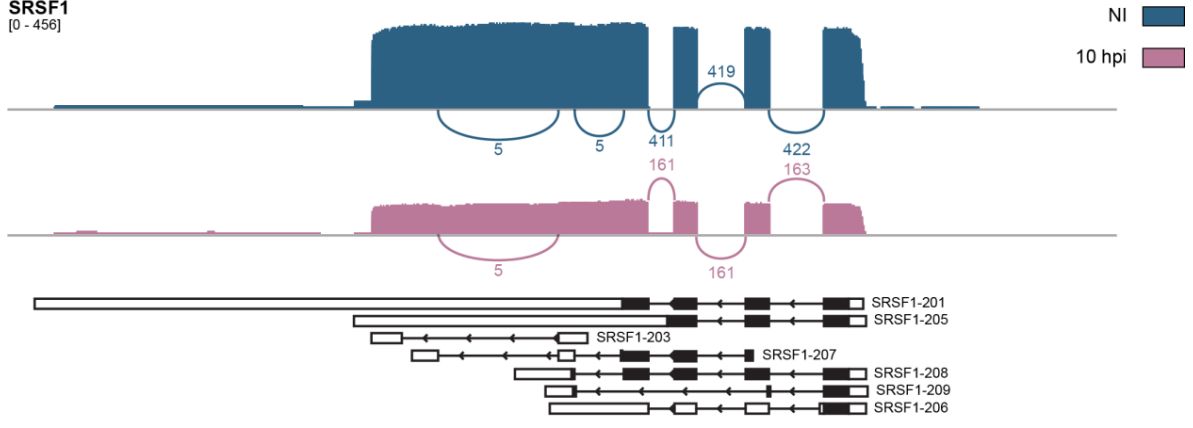
Figure S5. CIRBP protein levels are reduced in cells exposed to LLO.

(A-B) Detection of CIRBP by immunoblot in LoVo cells infected for 10 h with WT *Lm* or *Lm* $\Delta hlyA$, compared to uninfected cells (NI) (A), or in cells treated for 1 h with increasing concentrations of LLO, compared to untreated cells (B).

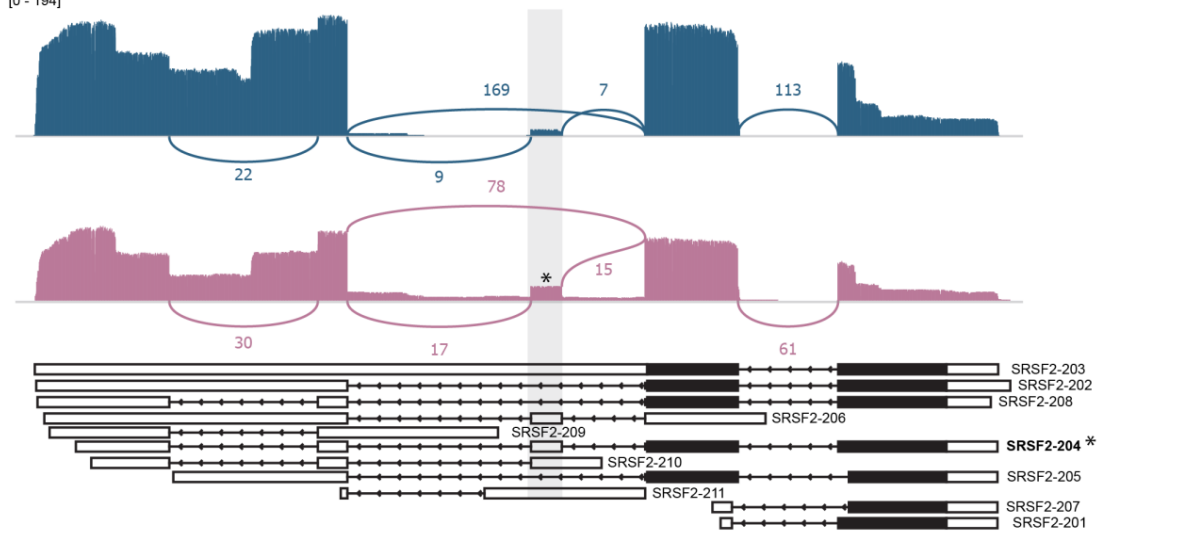
(C) Detection of extracellular CIRBP (eCIRBP) in the supernatants of LoVo or THP-1 cells exposed to LLO.

Note that the first lane in (A) and the fifth lane in (C) are underloaded, which however does not affect conclusions.

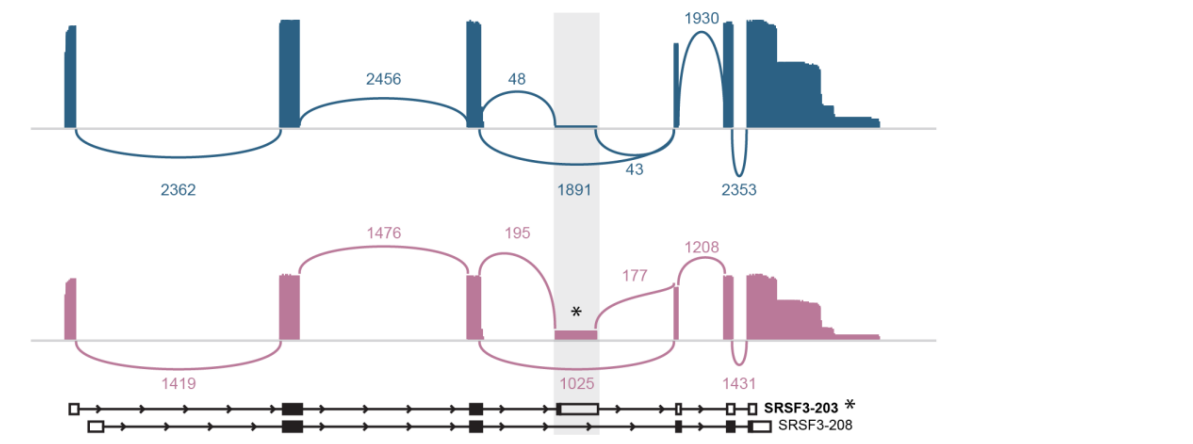
A SRSF1
[0 - 456]



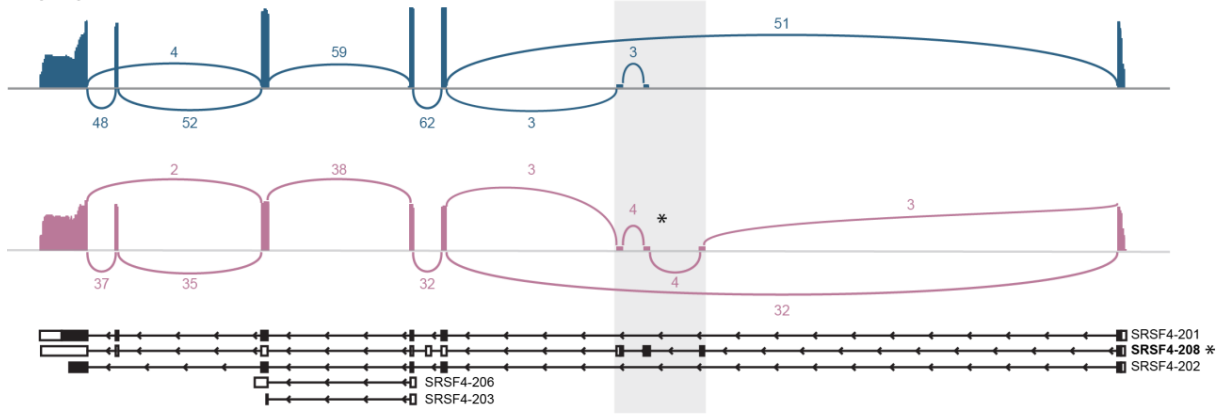
B SRSF2
[0 - 194]



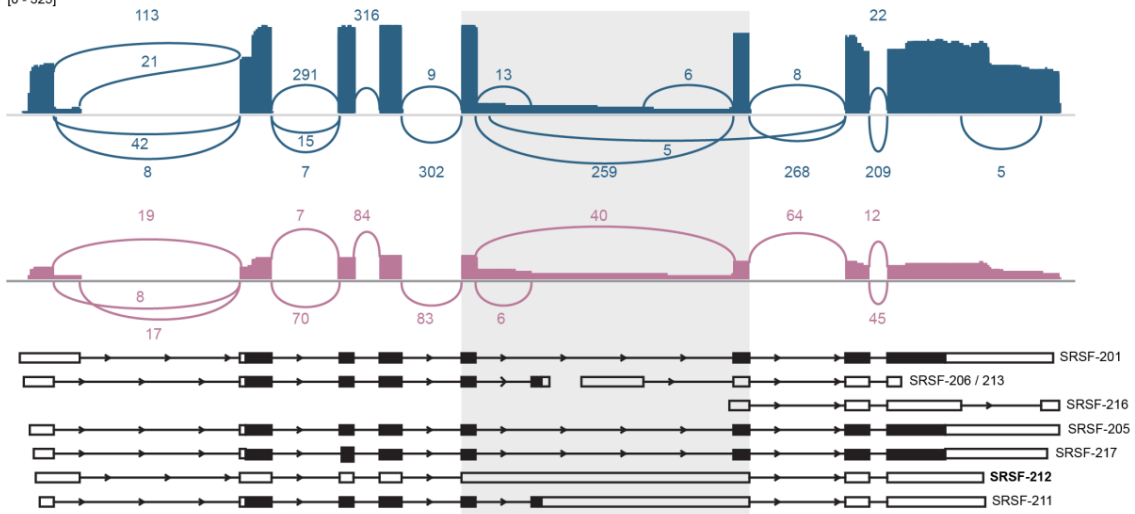
C SRSF3
[0 - 2497]



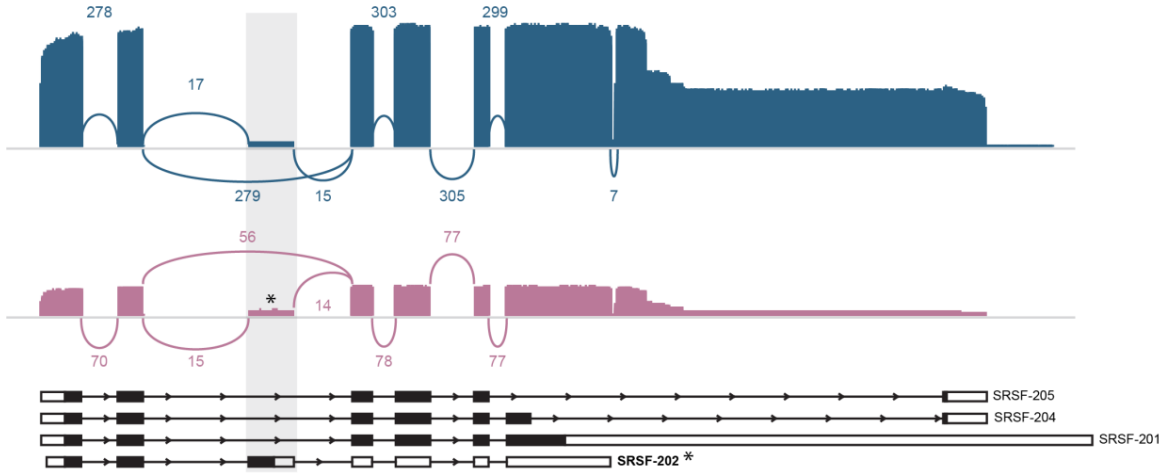
D SRSF4
[0 - 65]



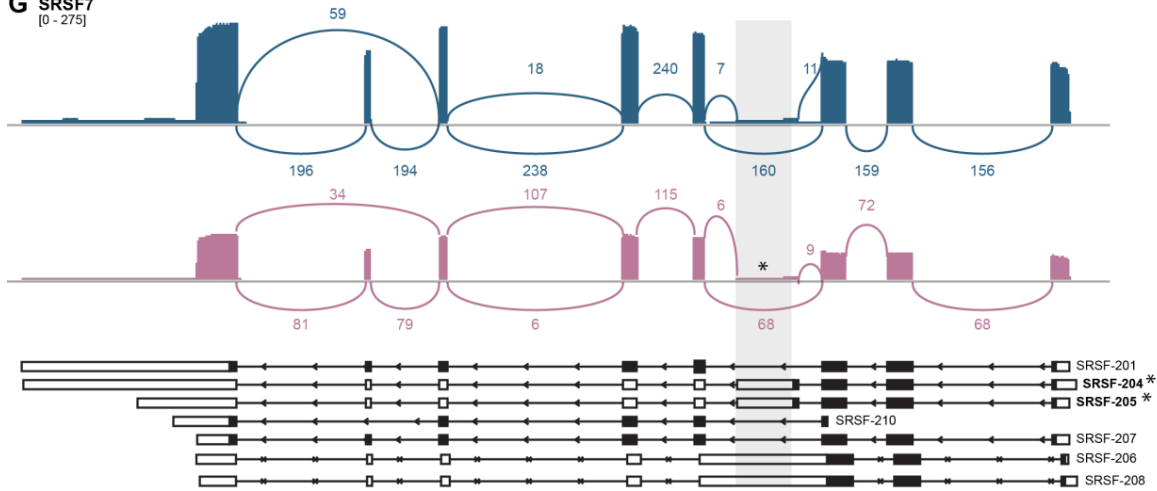
E SRSF5
[0 - 325]



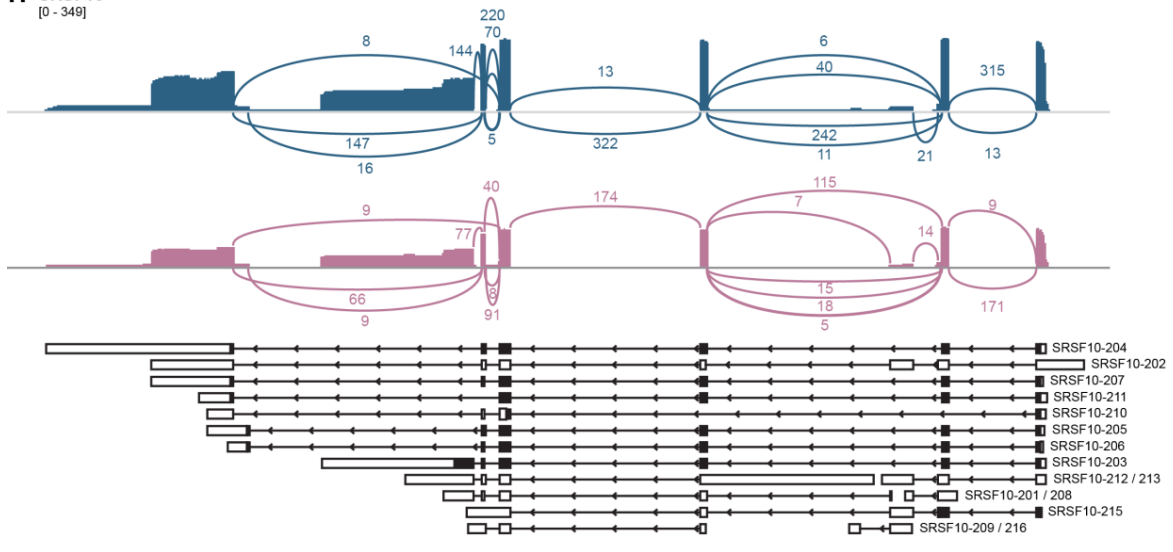
F SRSF6
[0 - 317]



G SRSF7
[0 - 275]



H SRSF10
[0 - 349]



I SRSF11
[0 - 240]

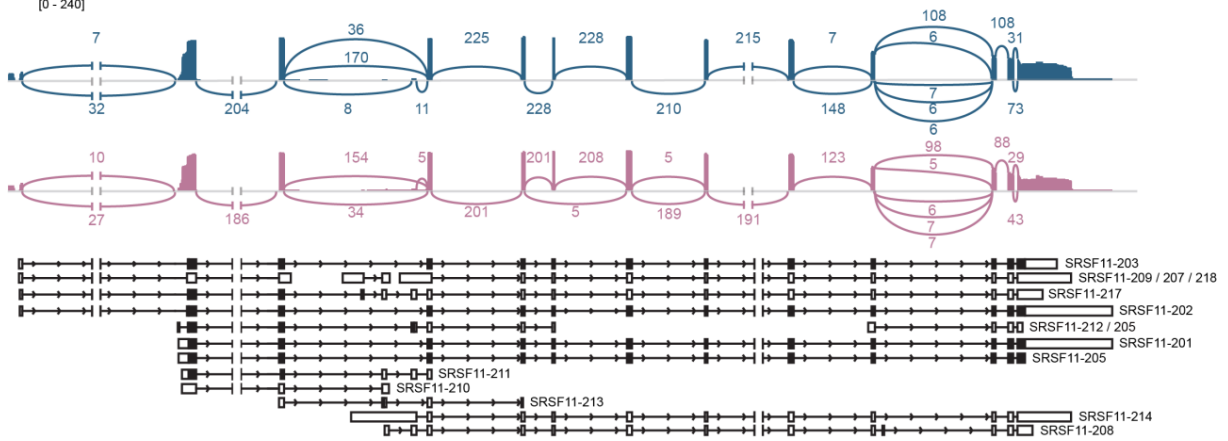


Figure S6. Alternative splicing events affect the expression of a subset serine-arginine rich splicing factors (SRSFs) upon *Listeria* infection.

(A-I) Sashimi plots of a subset of SRSF genes, representing exon coverage and exon junctions in uninfected (blue) and *Lm*-infected cells at 10 hpi (pink). Average values of read counts per genomic position normalized for library size, and exon-junction coverages for each junction, are represented (3 independent replicates at 0, 2, 5 hpi; 2 at 10 hpi). The range for minimum and maximum normalized read counts used as a scale for each SRSF is indicated between brackets, and allows the visualization of overall expression changes between the two conditions. Transcript isoforms identified by mapping long reads to Ensembl annotated transcripts are represented for each gene, with coding sequences displayed as black boxes, and untranslated regions as open boxes. Regions affected by alternative splicing events are highlighted in light grey. Stars indicate the most representative alternative splicing event that led to the inclusion of poison exons due to the presence of premature termination codons (SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF6 and SRSF7). Other such events occurred, in SRSF1 for instance, but were less obviously visualized due to a multiplicity of coexpressed isoforms and to the low stability of transcripts containing poison exons.

Note that precise isoform attribution is sometimes hampered due to non-exhaustivity of current transcript annotations (see for instance SRSF3-208, the 5'-end of which does not correspond to the transcript that is actually produced in LoVo cells); no corresponding transcript with a matching set of exons is currently available in Ensembl).

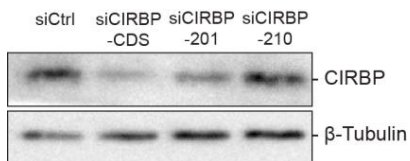


Figure S7. CIRBP protein expression upon CIRBP knock-down.

Assessment of CIRBP protein expression by immunoblotting in uninfected cells transfected by siRNA targeting the common CDS between CIRBP-201 and CIRBP-210 (siCIRBP-CDS), the 3'-UTR of CIRBP-201 specifically (siCIRBP-201) or the 3'UTR of CIRBP-210 specifically (siCIRBP-210). Compared to cells transfected with a scrambled siRNA (siCtrl), a decrease in CIRBP protein levels was observed upon treatment with siCIRBP-CDS and siCIRBP-201, but not with siCIRBP-210, consistently with CIRBP-210 not being expressed in uninfected cells.

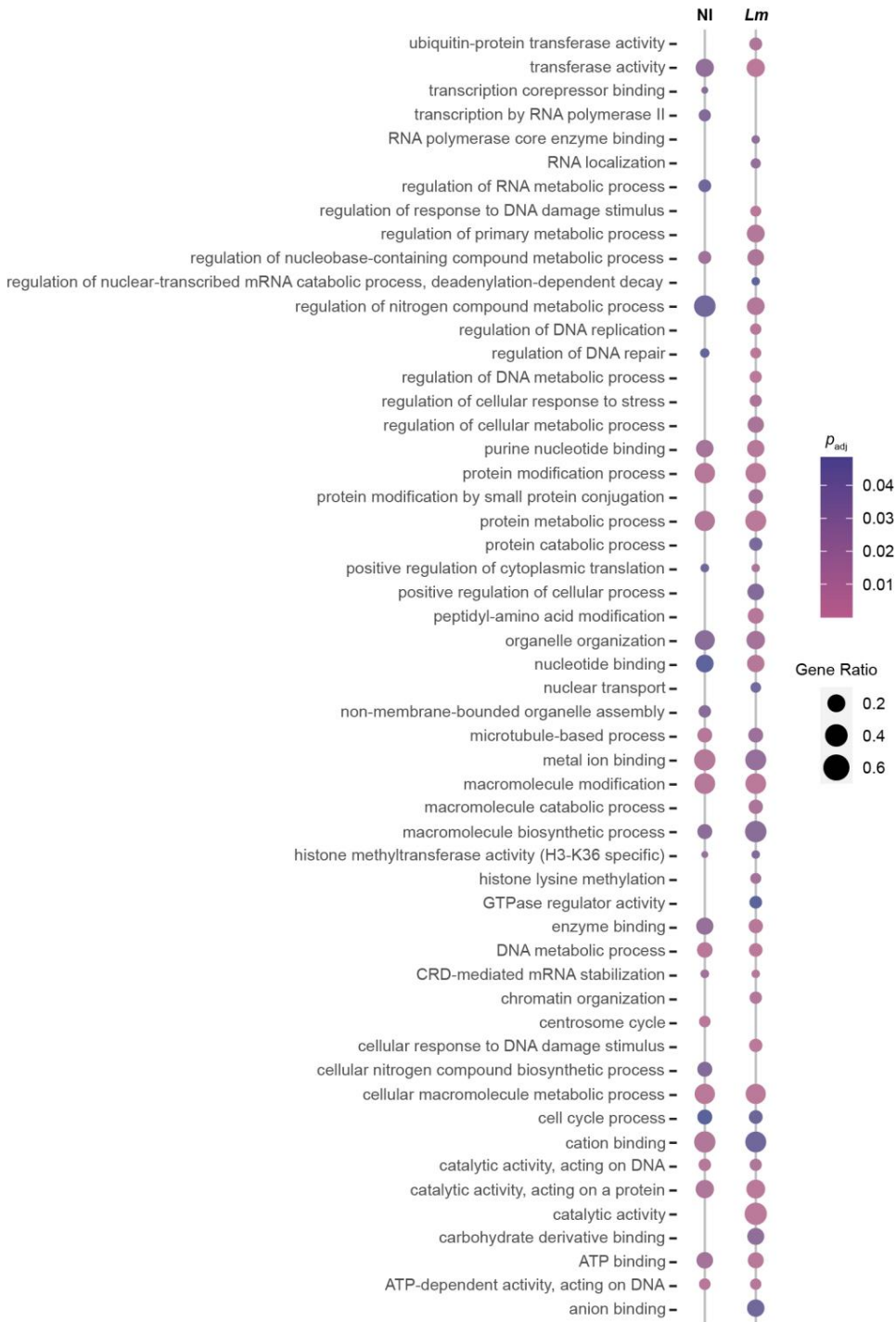


Figure S8. Main biological processes in which products of CIRBP targets are involved.

Over-representation analysis of GO Biological Process terms for CIRBP targets identified by RIP-seq analysis, either in non-infected (NI) LoVo cells, or in cells infected by *Lm* for 10 h. Only transcripts enriched in the CIRBP RIP when compared by differential expression analysis either to the input, or to control IgGs were kept as targets (223 genes in total). p_{adj} , adjusted p -value.

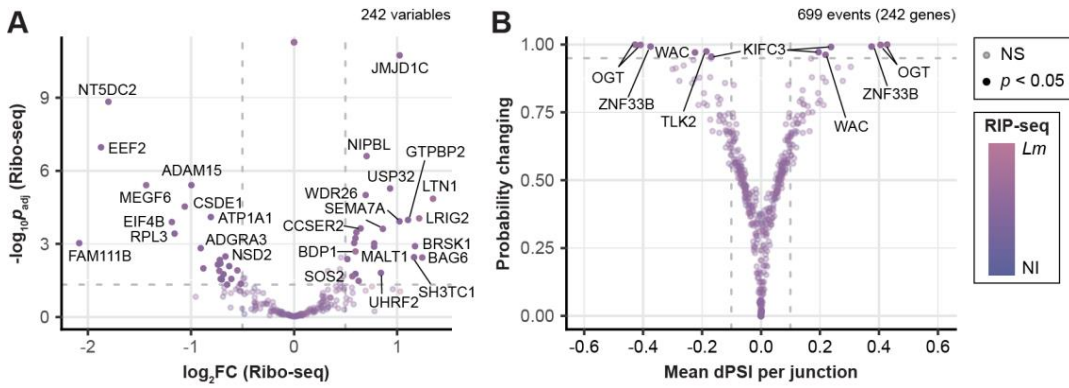


Figure S9. Variations in translation and in alternative splicing among CIRBP mRNA targets.

Volcano plots highlighting changes in mRNA levels (Ribo-seq data; A) and LSVs (output data from MAJIQ; B) for the 242 CIRBP targets, in cells infected with *Lm* for 10 h compared to non-infected cells. The color of data points ranging from blue to pink reflects the $\Delta\log_2FC$ of RIP enrichment in infected (*Lm*) versus non-infected (NI) cells. Data points colored in full color represent genes with p_{adj} below 0.05 (dashed grey horizontal line, $-\log_{10} p_{adj} = 1.3$) and a FC above 1.41 (vertical dashed grey lines, $\log_2 FC = \pm 0.5$). Genes with non-significant variation are displayed with reduced opacity.

Table S1. Bacterial strains used in this study

(A) Bacterial strains used for LoVo cells infections

Strain genotype	Culture medium	MOI	Reference
<i>L. monocytogenes</i> LL195	BHI	30	Weinmaier et al., 2013
<i>L. innocua</i> [pGM30- <i>inlA</i> (LRRs-IR-SPA)]	BHI + Cm 7µg/mL	100	Lecuit et al., 1997
<i>L. monocytogenes</i> LL195 Δ <i>hlyA</i>	BHI	30	Besic et al., 2020

Columns indicate the identifier of the strain, its species and description, the medium used for growth, the multiplicity of infection used in this study (MOI) used for the infection, and the source reference. BHI, brain heart infusion; Cm, chloramphenicol.

(B) Bacterial strains used for the purification of PFTs

Strain genotype	PFT	Culture medium	Reference
<i>E. coli</i> Top10(DE3) [pET29b-LLO-6His]	LLO	LB + Km (30 µg/ml)	Glomski et al., 2002
<i>E. coli</i> Top10 [pET29b-LLO _{C484A} -6His]	LLO _{C484A}	LB + Km (30 µg/ml)	Ribet et al., 2010
<i>E. coli</i> Top10 [pET29b-LLO _{W492A} -6His]	LLO _{W492A}	LB + Km (30 µg/ml)	Ribet et al., 2010
<i>E. coli</i> Top10 [pET29b-LLO _{Y206A} -6His]	LLO _{Y206A}	LB + Km (30 µg/ml)	Ribet et al., 2010
<i>E. coli</i> DH5a [pTrcHisA-PFO]	PFO	LB + Ap (100 µg/mL)	Farrand et al., 2010
<i>E. coli</i> DH5a [pTrcHisA-SLO]	SLO	LB + Ap (100 µg/mL)	Farrand et al., 2010
<i>E. coli</i> NEB5a [pET22b-PA-6His]	ALY	LB + Ap (100 µg/mL)	Iacovache et al., 2006

Columns indicate the identifier of the strain, its species background and plasmid, the produced PFT, the medium used for culture and the source reference. LB, Luria-Bertani medium; Km, kanamycin; Ap, ampicillin.

Table S2. Oligonucleotides used in this study

(A) siRNA used for gene-specific knockdowns

Identifier	Target	Forward Sequence (5'-> 3')	Reverse Sequence (5'-> 3')
siCIRBP-CDS	CIRBP CDS	GUACGGACAGAUCUCUGAAAdTdT	UUCAGAGAUCUGUCCGUACdTdT
siCIRBP-201	CIRBP-201 3'UTR	AAAGAUUGUGGGAGCUUCGdCdT	CGAAGCUCCACAAUCUUUdAdT
siCIRBP-210	CIRBP-210 3'UTR	GACUUCACCUUGGAACAAGAdTdT	UCUUGUUCAGGUGAAGUCdTdT
siUPF1	UPF1	GAUGCAGUUCGCUCAUUdTdT	AAUGGAGCGGAACUGCAUCdTdT

Columns indicate siRNA identifier, their target gene and region, their forward and reverse sequences orientated from the 5'-end to the 3'-end.

(B) Primers for PCR and quantitative PCR

Identifier	Target	Region	Direction	Sequence (5'-> 3')
oAL595	HIF1A	Exon 1	Forward	GAAGTGGCAACTGATGAGCA
oAL596	HIF1A	Exon 2	Reverse	GCGCGAACGACAAGAAA
oAL625	GAPDH	Exon 3	Reverse	TAAAAGCAGCCCTGGTGAC
oAL626	GAPDH	Exon 1	forward	CTCTGCTCCTCTGTTCGAC
oAL988	CIRBP	CDS	Forward	CTCAAAGTACGGACAGATCTC
oAL989	CIRBP	CDS	Reverse	TCGTCAATGTTCTCAAAGGTG
oAL990	CIRBP-201	3'-UTR	Forward	GACAGTTACGCTACACAAA
oAL991	CIRBP-201	3'-UTR	Reverse	CGAAGCTCCACAATCTTTA
oAL992	CIRBP-210	3'-UTR	Forward	GGGTCTACAGAGACAGTTA
oAL993	CIRBP-210	3'-UTR	Reverse	CTCTGTTCCAGGTGAAGTC
oAL1054	CIRBP-225	Retained intron	Forward	GGAGTCAGAGTGGTGGCTACAGTG
oAL1055	CIRBP-225	Retained intron	Reverse	AGTGTCCAGCCTAAAGTGCT
oAL1170	CLK1 RI	Intron 3	Forward	CGGGTATATTGATTGGCTGGA
oAL1171	CLK1 RI	Exon 4	Reverse	CCCTCCTCATCCTCTACA
oAL1172	CLK1 RI	Exon 4	Forward	GGAGTGTAGAGGATGATGAGGA
oAL1173	CLK1 RI	Intron 5	Reverse	AAGATTTCAAATCCCTGAAAGC
oAL1174	CLK1 mature	Exon 3	Forward	GAAAGCCGGTATCAGAACCATAG
oAL1175	CLK1 mature	Exon 3-4 junction	Reverse	TCGGTGACTCTCCCATGT
oAL1176	CLK1 mature	Exon 3-4 junction	Forward	CATGGGAAGAGTCCACCGAAGG
oAL1177	CLK1 mature	Exon 4	Reverse	TACGTCTCCACTCTGACAGATCA
oAL1180	CLK1	Exon 1-2 junction	Forward	CAGGACGATGAGACACTCAAA
oAL1181	CLK1	Exon 2	Reverse	CTGGGCACTGCTATGTGAT
oAL1182	CLK1	Exon 1-2 junction	Forward	TGTCCAGGACGATGAGACACTCA
oAL1183	CLK1	Exon 12	Reverse	CATCCAGTCTAATCGATCGTGG

Columns indicate the primer identifier, the gene ID of the amplified gene, the targeted region, the directionality of the primer and its sequence orientated from the 5' end to the 3' end.

Table S3. Detection of variations in transcript isoform utilization by Majiq and Bambu-ISAR analysis

(A-C) Output of the MAJIQ algorithm (voila.tsv table) used to detect and quantify alternative splicing events on short read sequencing data, filtered by local splice variant (LSV) with a dPSI > 0.05 at least once. AS events were detected in LoVo cells infected by *Lm* for 2 h (A), 5 h (B) or 10 h (C) compared to non-infected cells and reported as delta in Percent Spliced-In (dPSI) per LSV. Data from 3 independent replicates at 0, 2, 5 hpi; 2 at 10 hpi. PSI, percent spliced-in.

(D-F) Output of the Bambu-ISAR analysis. The R package Bambu was used to detect and quantify transcript variants in long-read data while R package ISAR was used to estimate the difference in usage of these isoforms across two conditions. Outputs give identifying information about the gene

and isoform, the variation in both overall gene expression and isoform expression, the fraction of the total gene represented by each isoform in both conditions (isoform fractions, IF) and whether a premature termination codon (PTC) is present in the main expressed isoform. This analysis was used to compare isoform usage in LoVo cells infected by *Lm* for 2 h (D), 5 h (E) and 10 h (F) *versus* non-infected cells. Data from 3 independent replicates at 0, 2, 5 hpi; 2 at 10 hpi. FC, fold change; SE, standard error; PTC, premature termination codon.

(G) Quantification of reads aligning with each one of the three possible local splicing variants at the 3'-junction of CIRBP exon 6, in non-infected cells and cells infected for 10 h by *Lm*. *Short-read analysis*. The number of reads aligning with the junctions of exon 6 with exons 7a or 7b was extracted from the outputs of MAJIQ; the number of reads spanning positions 1,272,051-1,272,052 was extracted from uniquely-mapped reads bam files for each sample. Each value was then normalized for library size. The proportion of each class with respect to the total number of normalized reads spanning this junction was then calculated for each condition. Fold-change (FC) values were calculated by dividing the number of normalized reads for each class in infected cells by their values in non-infected cells. *Long-read analysis*. Likewise, the number of long reads mapping to each one of the three types of junctions was extracted from Nanopore data and normalized for library size. The proportion of each class and FC were calculated from normalized counts as for short-read data. Data from 3 independent replicates at 0, 2, 5 hpi; 2 at 10 hpi. SD, standard deviation.

Table S4. CIRBP RIP-seq

(A-D) Output of DESeq2 analyses between the RNA fraction immunoprecipitated by CIRBP and either the input fractions in non-infected (NI) (A) and 10-h *Lm*-infected cells (B) or the IgG-immunoprecipitated fraction in NI (C) and *Lm* infected (D) cells. Result for each gene is reported as a log₂ fold-change value and its corresponding adjusted *p*-value [*p*_{adj}, DESeq false discovery rate (FDR)].

(E) For each CIRBP target, data of their enrichment in RIP-seq analysis and variations in expression assessed by RNA-seq, Ribo-seq and translational efficiency (TE) in 10-h infected (*Lm*) versus non-infected (NI) cells.

(F) For each CIRBP target, data of their enrichment in RIP-seq analysis and variations in local splicing variants (LSVs) at the different junctions detected with MAJIQ for this target in 10-h infected (*Lm*) versus non-infected cells.

FC, fold-change; SE, standard error; TE, translation efficiency; LSV, local splicing variation.

References

1. Weinmaier,T., Riesing,M., Rattei,T., Bille,J., Arguedas-Villa,C., Stephan,R. and Tasara,T. (2013) Complete genome sequence of *Listeria monocytogenes* LL195, a serotype 4b strain from the 1983-1987 listeriosis epidemic in Switzerland. *Genome Announc.*, **1**, e00152-12.
2. Lecuit,M., Ohayon,H., Braun,L., Mengaud,J. and Cossart,P. (1997) Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.*, **65**, 5309–5319.
3. Besic,V., Habibolahi,F., Noël,B., Rupp,S., Genovesio,A. and Lebreton,A. (2020) Coordination of transcriptional and translational regulations in human epithelial cells infected by *Listeria monocytogenes*. *RNA Biol.*, **17**, 1492–1507.
4. Glomski,I.J., Gedde,M.M., Tsang,A.W., Swanson,J.A. and Portnoy,D.A. (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell Biol.*, **156**, 1029–1038.
5. Ribet,D., Hamon,M., Gouin,E., Nahori,M.-A., Impens,F., Neyret-Kahn,H., Gevaert,K., Vandekerckhove,J., Dejean,A. and Cossart,P. (2010) *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature*, **464**, 1192–1195.
6. Farrand,A.J., LaChapelle,S., Hotze,E.M., Johnson,A.E. and Tweten,R.K. (2010) Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 4341–4346.
7. Iacovache,I., Paumard,P., Scheib,H., Lesieur,C., Sakai,N., Matile,S., Parker,M.W. and van der Goot,F.G. (2006) A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *EMBO J.*, **25**, 457–466.

4.2 Analyse des transcrits affectés par des évènements d'épissage alternatifs au cours de l'infection

Dans l'article [75], nous avons mis en évidence qu'un certain nombre de transcrits subissaient au cours de l'infection par *Lm* un épissage différent des cellules non-infectées. De manière intéressante, la liste des gènes associés à ces transcrits est particulièrement enrichie en régulateurs de l'ARNm. En particulier, nous avons démontré que les protéines de régulation de l'épissage SRSF sont non seulement régulées au niveau de leur épissage (Figure 1 de l'article), mais aussi au niveau de leur phosphorylation (Figure 4C de l'article), suggérant un fort remaniement de l'épissage de leurs cibles. Malgré ces éléments, il reste des incertitudes quant à pourquoi ce jeu de transcrits en particulier subit un épissage alternatif. Pour apporter des éléments de réponse à cette question, j'ai comparé les caractéristiques des isoformes affectés par un évènement d'épissage alternatif (isoformes AS), en séparant les isoformes sur- et sous-exprimés au cours de l'infection, et en les comparant à un set aléatoire de même ordre de grandeur de transcrits correspondant à des gènes non-affectés par l'épissage alternatif. Entre ces deux groupes, j'ai comparé les variations des paramètres suivants :

- Le nombre de transcrits par gène, qui correspond aux nombres d'isoformes décrits dans la base de données ENSEMBL pour le gène en question;
- La qualité canonique ou non du transcrit analysé, à savoir si ce transcrit correspond à l'isoforme de référence du gène;
- La longueur du transcrit d'intérêt en nombre de paires de bases (base pair, bp);
- La proportion de GC du gène auquel correspond le transcrit en %;
- Le nombre d'exons composant le transcrit d'intérêt;
- La longueur du domaine codant (coding domain, CD) du transcrit d'intérêt (si applicable) en paires de bases;
- La longueur du 5'-UTR du transcrit d'intérêt en paires de bases;
- La longueur du 3'-UTR du transcrit d'intérêt en paires de bases;
- La proportion de GC du 5'-UTR du transcrit d'intérêt en %;
- La proportion de GC du 3'-UTR du transcrit d'intérêt en %;
- La classification du gène auquel correspond le transcrit d'intérêt (biotype);
- La classification du transcrit d'intérêt.

Les résultats des comparaisons des différentes caractéristiques sont présentés dans la figure 4.1 et les valeurs moyennes des différents paramètres et résultats des tests statistiques sont présentés dans le tableau figure 4.2. Concernant la répartition des gènes par biotype (figure 4.1 A), on peut observer que le groupe d'isoformes AS surexprimées est légèrement enrichi en ARN long non-codants (lncRNA) par rapport au contrôle et aux isoformes AS sous-exprimées. Cette observation est confirmée dans la figure 4.1 B, où l'on peut aussi observer que ce même groupe est aussi légèrement enrichi en isoforme avec rétention d'intron (24% des isoformes, contre 20.5% pour le contrôle et 18% pour les isoformes sous-exprimés). En miroir de ces observations, on peut voir que le groupe AS sous-exprimée est plus enrichi en isoformes codants (protein coding, 55.4% contre moins de 50% pour les deux autres). Ces résultats confortent l'hypothèse que l'infection par *Lm* induit des évènements d'épissage alternatifs en faveur de transcrits non-codants, mais renforce aussi l'hypothèse que l'inhibition du NMD ne serait pas la source primaire d'augmentation des transcrits NMD-sensibles. En effet, on ne retrouve pas plus d'isoformes NMD-sensibles dans le groupe AS que dans le groupe contrôle.

Concernant les autres paramètres, aucune différence entre les 3 groupes n'est notable concernant la représentation des isoformes canoniques (figure 4.1 C), le nombre de transcrit par gène (figure 4.1 D), le nombre d'exons par transcrit (figure 4.1 F), la longueur des domaines codants (figure 4.1 H) ou la longueur ou taux de GC dans les 3'-UTR (figure 4.1 J et G). Toutefois, l'analyse statistique (tableau 4.1) indique que les isoformes AS ont un 5'-UTR avec un taux de GC statistiquement plus bas, particulièrement les isoformes sous-exprimés (colonne 2 et figure 4.1 H). Le 5'-UTR des isoformes sous-exprimés semblent aussi généralement plus long que les 5'-UTR-contrôle, de 70 bp en moyenne (figure 4.1 I). Dans ce tableau, on peut aussi observer que les gènes correspondants aux isoformes qui sont moins exprimés au cours de l'infection sont aussi moins riches en GC (figure 4.1 E), quand comparées aux isoformes contrôles et surexprimés, et enfin que les transcrits sous-exprimés seraient moins longs de 200 bp en moyenne que les transcrits surexprimés (figure 4.1 G). Concernant les taux de GC, les différences sont assez faibles, la relevance biologique de ces résultats seraient donc à tester, mais ces résultats suggèrent que les 5'-UTR

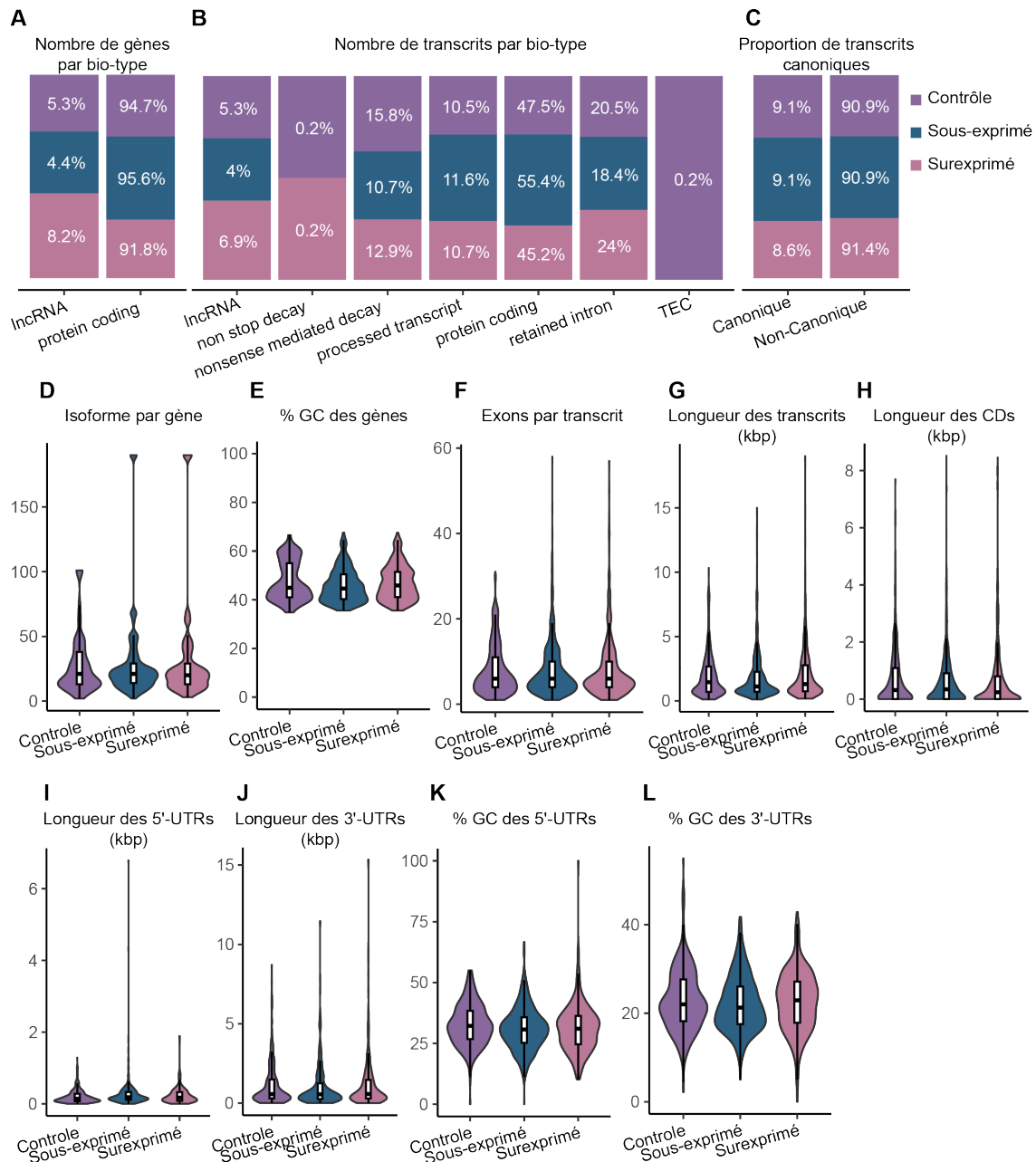


Figure 4.1: Caractérisation des transcrits subissant un changement d'épissage au cours de l'infection. Les transcrits subissant un épissage alternatif ($dPSI > 0.1$) significatif ont été subdivisés en fonction de leur sens de régulation (850 transcrits sous-régulés et 548 transcrits sur-régulés) et comparé à un groupe de taille équivalente de transcrits contrôles ($n=562$). Les caractéristiques de chaque transcrit ont été obtenus avec biomaRt .

pourraient avoir un rôle dans la stabilité ou le contrôle de l'épissage alternatif ou de la stabilité des isoformes affectés au cours de l'infection par *Lm*. Le taux de GC serait particulièrement intéressant à étudier, car il a déjà été beaucoup décrit pour impacter l'épissage [520–522]. En conclusion, il pourrait donc exister des paramètres dans les transcrits qui réguleraient positivement ou négativement leur expression et cette étude reste à affiner, notamment en allant chercher des motifs de liaisons connus pour les facteurs de régulation d'épissage, dans les différentes régions du transcrits.

	Surexprimés vs Ctrl			Sous-exprimés vs Ctrl			AS vs Ctrl			Sous-exprimés vs Surexprimés		
	AS	Contrôle	p.adj	AS	Contrôle	p.adj	AS	Contrôle	p.adj	Sous-exp.	Surexp.	p.adj
% GC du 3'-UTR	22.7	22.9	ns	22.1	22.9	ns	22.3	22.9	ns	22.1	22.7	ns
% GC du 5'-UTR	31.2	32.8	*	30.9	32.8	**	31	32.8	**	30.9	31.2	ns
% GC par gène	47.1	47.8	ns	45.9	47.8	****	46.4	47.8	***	45.9	47.1	**
Exons par transcrit	8.2	8	ns	8	8	ns	8.1	8	ns	8	8.2	ns
Longueur des transcrits (bp)	2062.8	1960.5	ns	1838.3	1960.5	ns	1933.1	1960.5	ns	1838.3	2062.8	*
Longueur du 3'-UTR (bp)	1254.3	1143.7	ns	1057.1	1143.7	ns	1135.9	1143.7	ns	1057.1	1254.3	ns
Longueur du 5'-UTR (bp)	239.5	204.4	ns	273.1	204.4	**	260	204.4	**	273.1	239.5	ns
Longueur du CDS (bp)	647.4	711	ns	673.8	711	ns	662.7	711	ns	673.8	647.4	ns
Nombre de transcrit canonique	47	51	ns	68	51	ns	115	51	ns	68	47	ns
Transcrit par gène	31.6	28.4	ns	29.2	28.4	ns	30.2	28.4	ns	29.2	31.6	ns

Figure 4.2: Analyse statistique des propriétés des transcrits alternativement épissés. Pour déterminer si les groupes de transcrits alternativement épissés sous- et sur-régulés spécifiquement présentent des différences significatives avec le groupe contrôle, les moyennes de valeurs pour chaque caractéristique ont été comparées à l'aide d'un test one-way Anova suivi d'un test post-hoc de Tukey. Les p-values ajustées ont été reportées symboliquement. ns = non-significatif, $p.adj \in [0.05, 0.01] = *$, $p.adj \in [0.01, 0.001] = **$, $p.adj \in [0.001, 0.0001] = ***$, $p.adj < 0.0001] = ****$.

4.3 Identification d'un facteur de régulation de CIRBP d'origine bactérienne

Pour étudier les mécanismes sous-jacents au remaniement des gènes humains en cas d'infection bactérienne, il est commun de rechercher dans un premier temps si un effecteur bactérien est à l'origine de ce changement. L'identification d'un tel facteur se fait fréquemment par mutation gain/perte de fonction de la souche d'intérêt. Si le phénomène est observable dans le cas d'infection avec d'autres types de bactéries, il est aussi possible d'explorer les similarités entre bactéries pour identifier un mécanisme commun, comme par exemple la présence de cytolysine susceptibles d'affecter l'épissage d'un groupe de gènes, comme nous l'avons documenté dans l'article [75]. Les expériences présentées ci-dessous sont en continuité avec celle présentée dans la figure 3A de l'article [75] et offrent des résultats et validations supplémentaires dans l'identification des cytolysines et plus précisément de la LLO dans le contrôle de l'expression de CIRBP.

4.3.1 Etude de la régulation de CIRBP dans le contexte de l'infection par différentes bactéries

Comme démontré dans l'article [75], *Lm* induit un changement d'isoforme de CIRBP de CIRBP-201 à CIRBP-210 avec des conséquences sur l'invasion des cellules. Pour étudier le mécanisme sous-jacent à ce phénomène et au vu de l'importance du changement d'expression de CIRBP dans le contrôle de l'infection (Article [75], figure 5A), j'ai voulu déterminer quel(s) facteur(s) de *Lm* seraient impliqués dans la régulation de CIRBP mais aussi si cet événement était spécifique à l'infection par *Lm*. Parmi la collection de souches du laboratoire, j'ai sélectionné plusieurs souches de *Listeria* qui diffèrent dans l'expression de facteurs de virulence majeurs:

- *Listeria innocua* est une espèce non-pathogène de *Listeria* qui ne comporte pas le principal locus de virulence de *Lm* ni le locus codant les internalines InA et B [523,524]. Elle reste donc extracellulaire. Le premier locus code la cytolysine LLO (A), la métalloprotéase *mpl*, les phospholipases *plcB* et *plcA*, le nucléateur d'actine *actA* et *prfA*, le régulateur de virulence qui permet aussi l'activation de l'opéron des internalines. *L. innocua* partage toutefois 84% de gènes avec *Lm*.
- *Listeria innocua* [InA] et [InB] expriment un plasmide permettant l'expression constitutive des internalines de *Lm* et ont donc la capacité de rentrer dans les cellules.
- *Lm*ΔA est une souche pour laquelle l'expression de la cytolysine LLO a été invalidé.

Cet ensemble de souches m'a donc permis d'étudier le rôle de plusieurs facteurs de virulence de *Listeria* dans le contrôle de CIRBP. En parallèle, j'ai aussi sélectionné plusieurs souches d'autres espèces bactériennes pour tester plus de critères, comme la pathogénicité, la production de cytolysines, le mode de vie intra/extracellulaire ou la nature de la paroi bactérienne (Tableau 4.1).

- *Escherichia coli* K12 est la souche de référence pour *E.coli* en laboratoire. Cette entérobactérie est négative à

la coloration de Gram (Gram-) et extracellulaire. Elle exprime la toxine cytolysine A (ClyA) [525].

- *Escherichia coli* K12 [inv+] exprime l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* [526], lui conférant la capacité à rentrer dans les cellules humaines.
- *Shigella flexneri* (Gram -), intracellulaire facultative, elle peut aussi se propager de cellule en cellule par piratage du système de polymérisation de l'actine [49]. C'est aussi une bactérie pathogène alimentaire et entre également dans la cellule *via* une vacuole d'internalisation [527]. Cependant, contrairement à *Lm*, *S. flexneri* appartient au groupe des entérobactéries et non des firmicutes et ne sécrète pas de cytolysine fonctionnelle [528] [529].
- *Salmonella enterica enterica* Typhimurium C5 (*Salmonella* Typhimurium) (Gram -), est une entérobactérie comme *S. flexneri* ou *E. coli* mais adopte un cycle de vie intracellulaire essentiellement vacuolaire [527]. Cette souche, contrairement au variant Typhi, ne comporte pas de séquence codant la cytolysine ClyA. [530].
- *Enterococcus faecalis* (gram +) est une bactérie intestinale commensale, mais aussi pathogène opportuniste, notamment par la colonisation en biofilm de matériel médical comme les cathéters [531]. Des études ont montré que cette bactérie pouvait produire plusieurs cytolysines [532] [533] et récemment, il a également été décrit un cycle de vie intracellulaire pour *E. faecalis* [534].
- *Staphylococcus epidermidis* (Gram +) est une bactérie commensale trouvée sur la peau. Elle peut devenir pathogène chez des personnes à risque ou en cas de colonisation de matériel médical. Elle ne code aucune cytolysine [535] et seules quelques études suggèrent une possible persistance dans des macrophages [536].

Espèce	Gram	Intra-cellulaire	Perforine	Pathogène
<i>Listeria monocytogenes</i>	(+)	Oui	Oui	Oui
<i>Listeria innocua</i> [InIA+]	(+)	Oui	Non	Non
<i>Listeria innocua</i> [InIB+]	(+)	Oui	Non	Non
<i>Listeria innocua</i>	(+)	Non	Non	Non
<i>Listeria monocytogenes</i> Δ <i>hlyA</i>	(+)	Oui	Non	Non
<i>Shigella flexneri</i>	(-)	Oui	Non	Oui
<i>Escherichia coli</i> [Inv+]	(-)	Oui	Oui	Oui
<i>Escherichia coli</i>	(-)	Non	Oui	Oui
<i>Enterococcus faecalis</i>	(+)	Non	Oui	Opportuniste
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(+)	Non	Non	Opportuniste
<i>Salmonella enterica</i>	(-)	Oui	Non	Oui

Table 4.1: Description des différentes souches bactériennes utilisées pour identifier un facteur régulateur de CIRBP.

Une fois le panel de souches établi, j'ai ajusté les conditions de culture et d'infections à chaque bactérie, comme décrit plus précisément dans le [paragraphe 7.1.1](#) et ai infecté des cellules pour 10h. Les bactéries extracellulaires ont été co-incubées avec les cellules pendant 10h et ont donc pu continuer à se multiplier dans le milieu extracellulaire. Les bactéries intracellulaires ont été mises en contact 1h seulement avec les cellules avant d'être lavées avec un antibiotique. Seules les bactéries ayant pénétré les cellules ont donc pu survivre et se répliquer dans les cellules quand cela était possible. Ensuite, j'ai récupéré les ARN des cellules infectées pour mesurer le changement d'isoforme de CIRBP (figure 4.3). De manière intéressante, en comparant les ratios de CIRBP-201/CIRBP-210 (relatifs aux cellules non-infectées), j'ai pu constater que, parmi les souches de *Listeria*, seule la souche sauvage (*L. monocytogenes*, première boîte à moustache) induit un changement significatif d'isoformes de CIRBP. Ni la souche *Lm*Δ*hlyA*, ni

les souches *L. innocua*, ne produisent la cytolysine LLO, indiquant un possible rôle de celle-ci dans la régulation de CIRBP. Similairement, il semblerait que ni *E. coli* [inv+], ni *S. flexneri*, ni *S. Typhimirium* n'induit de régulation de CIRBP, alors que la co-incubation des cellules avec *E. coli* K12 induit un changement de ratio. La différence de résultats obtenus entre la co-incubation des cellules avec *E. coli* K12 et l'invasion des cellules avec *E. coli* [inv+] pourrait être due à la capacité de réplication amoindrie de cette dernière après internalisation, car cette bactérie n'est pas adaptée à un mode de vie intracellulaire. En revanche, en proliférant dans le milieu de culture, *E. coli* K12 peut y libérer de différents produits dont la cytolysine A. Il semblerait également que *E. faecalis* et *S. epidermidis* induisent un changement d'isoforme de CIRBP, malgré les écarts expérimentaux. En conclusion, il semblerait que les bactéries produisant des cytolysines, et peut-être *S. epidermidis*, sont capables de provoquer le changement d'isoforme de CIRBP, ce qui fortifie l'hypothèse de l'implication de la LLO.

En raison des différences de protocoles, les changements d'isoformes observés dans des cellules infectées avec les bactéries extracellulaires (*E. coli* K12, *E. faecalis* et *S. epidermidis*) et intracellulaires ne sont pas directement comparable. En effet, la croissance massive des bactéries extracellulaires dans le milieu de culture des cellules durant les 10h de l'infection pourrait induire une potentielle compétition pour les nutriments. Le changement d'isoforme de CIRBP pourrait donc être tout aussi lié au stress métabolique qu'à l'effet infectieux des bactéries extracellulaires.

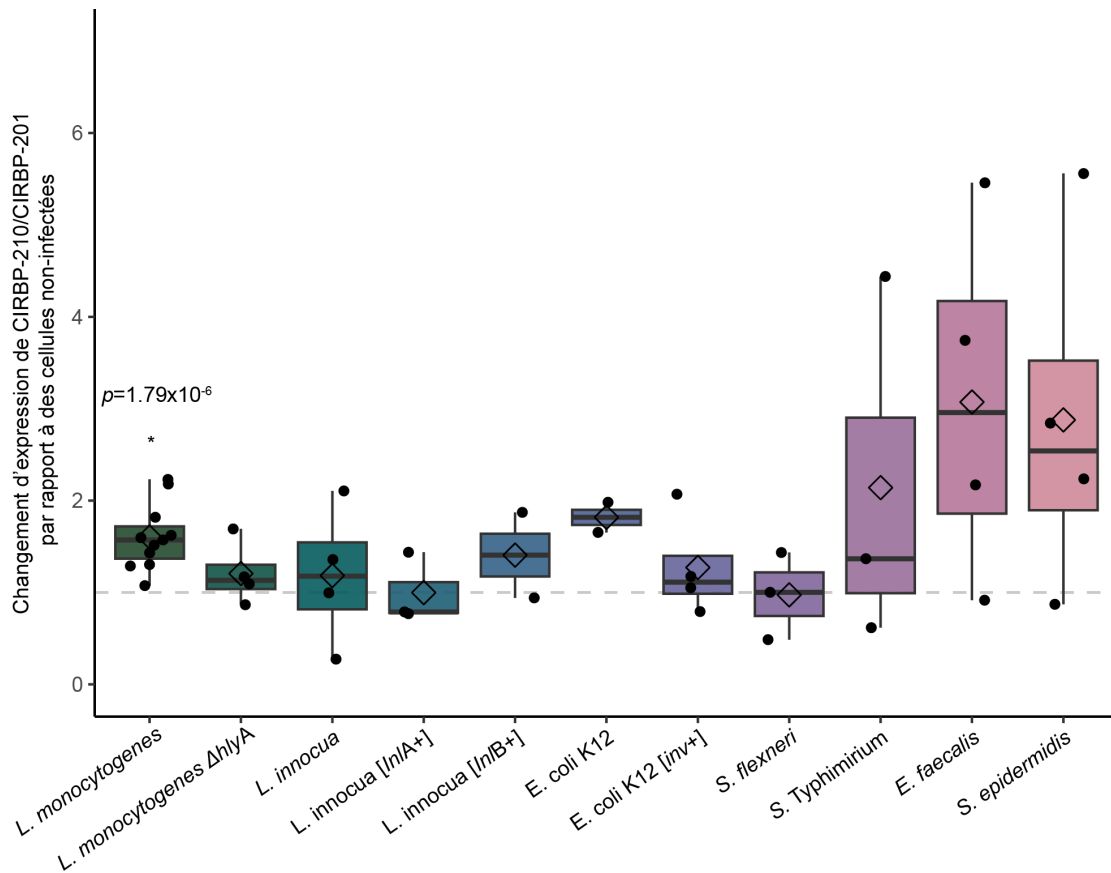


Figure 4.3: Changement d'expression de CIRBP dans le contexte de différentes infections bactériennes. Des cellules LoVo ont été infectées avec plusieurs souches bactériennes. Les ARN ont été extraits et les taux d'expressions des isoformes -201 et -210 de CIRBP ont été quantifiés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules non-infectées. Le changement d'isoforme a été déterminé en quantifiant le ratio d'expression de CIRBP-210 / CIRBP-201. Les moyennes de ratios pour chaque souche bactérienne ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

4.3.2 Validation du rôle de la LLO dans le changement d'isoforme de CIRBP

Pour valider l'implication de la LLO dans la régulation de CIRBP, j'ai testé la complémentation de la déficience en LLO de la souche ΔA par un vecteur d'expression de *A* sous un promoteur constitutif qui permettrait de rétablir le changement d'isoforme de CIRBP. Pour cela, j'ai utilisé la souche *Lm* ΔA transformées avec un plasmide d'expression ectopique de la LLO (pAD-*hlyA*-Myc et son contrôle, transformée avec un plasmide exprimant la GFP à la place de la LLO (pAD-eGFP-myc). Ces deux souches ont été construites en 2019 par Caroline Peron-Cane [33].

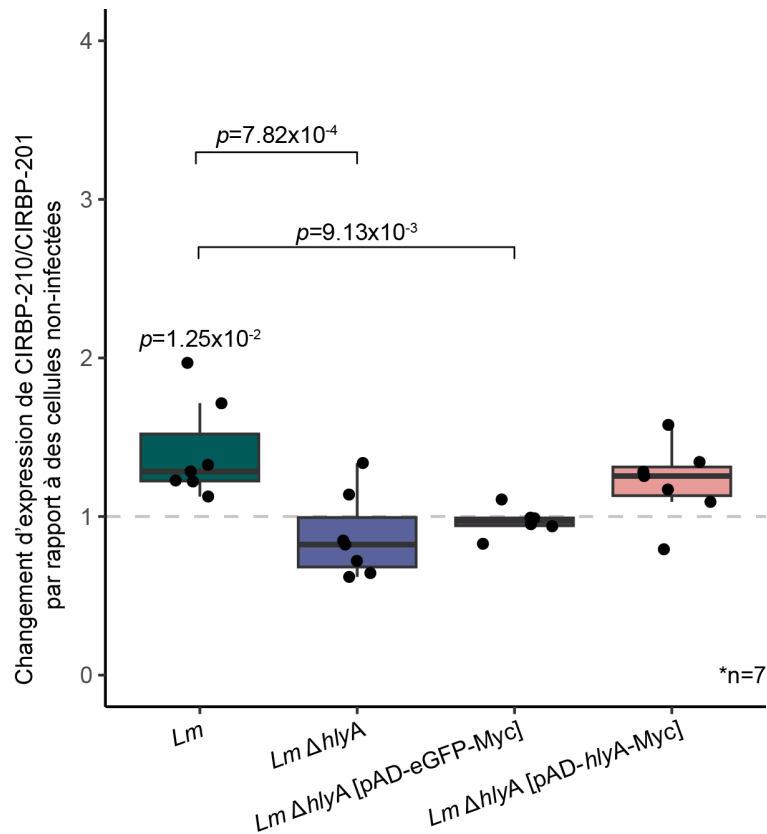


Figure 4.4: Changement d'isoforme de CIRBP par complémentation de l'expression de la LLO dans *Lm*. La souche *Lm* ΔA a été complétement pour la perte de la LLO avec un plasmide codant la cytolysine (*Lm* ΔA [pAD-*hlyA*-Myc]) et des cellules LoVo ont été infectées avec ces souches ainsi qu'avec les souches contrôles *Lm* et *Lm* ΔA [pAD-eGFP-Myc]. Les ARN ont été extraits et les taux d'expressions des isoformes -201 et -210 de CIRBP ont été quantifiés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules non-infectées. Le changement d'isoforme a été déterminé en quantifiant le ratio d'expression de CIRBP-210 / CIRBP-201. Les moyennes de ratios pour chaque souche bactérienne ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

En regardant les profils de ratio d'expression des deux isoformes (figure 4.4), le changement est bien observé dans la condition des cellules infectées avec *Lm* et perdu de manière significative dans les cellules infectées avec la souche mutée pour la LLO (*Lm* $\Delta hlyA$). Les cellules infectées avec la souche $\Delta hlyA$ exprimant le plasmide GFP ne présentent également aucun changement de ratio par rapport au contrôle non-infecté, mais l'infection par la souche complétement restaure partiellement le changement d'isoforme de CIRBP observé avec la souche sauvage, bien que la variabilité expérimentale ne permet pas de conclure quant à la complémentation. Cette observation pourrait être due à une expression moindre de la LLO par la souche complétement que par la souche sauvage en condition d'infections, car l'effet de la LLO sur la régulation de CIRBP est dose-dépendant (Article figure 3B, [75]). Cette hypothèse est en accord avec des résultats obtenus par l'équipe lors d'expériences de quantification de l'expression et de la sécrétion de la LLO par microscopie en temps réel grâce à un rapporteur fluorescent, ou de quantifications de l'activité hémolytique de surnageants de culture: à l'intérieur des cellules ou in vitro dans des

conditions activatrices pour le régulateur PrfA, le promoteur endogène de la LLO donne une expression et une sécrétion de la protéine plus intense que celle permise par le promoteur constitutif pHYPER porté par le plasmide pAD (Travaux menés par Caroline Peron-Cane, Simon Guette-Marquet et Thomas Petit, données essentiellement non publiées).

En conclusion, ces expériences d'infection ont permis de suggérer la LLO comme un facteur essentiel de la régulation de l'épissage de CIRBP, car son absence abolit le changement d'isoforme dans des cellules infectées. Le rôle de la LLO a été confirmé en aval, à l'aide de toxine purifiée [75].

4.4 Surexpression des protéines et des 3'-UTR de CIRBP-201 et CIRBP-210

Les résultats obtenus sur le taux d'invasion des cellules en cas d'inhibition spécifique des isoformes de CIRBP (Article [75], figure 5A) indiquent une différence significative d'effets de chaque isoforme sur l'infection. Pour confirmer ces résultats, je pensais intéressant d'essayer de déterminer si les effets observés étaient dus aux légères différences entre isoformes dans la séquence codante, ou à leurs 3'-UTR (eux, très distincts), en déterminant l'effet de chacune de ces portions. Pour cela, j'ai construit des plasmides de surexpression des cadres de lecture ouverts (Open reading frame, ORF) seuls ou des 3'-UTR seuls. Dans l'hypothèse où l'ORF aurait un impact sur le 3'-UTR ou *vice-versa* et pour la valider, j'ai aussi fusionné l'ORF de CIRBP-201 avec le 3'-UTR de CIRBP-210 et inversement. Enfin, pour étudier l'importance de l'épissage du 3'-UTR de CIRBP-210, j'ai aussi construit un plasmide comportant l'ORF de CIRBP-210 et son 3'-UTR avec l'intron 7 non pré-épisé (I7) (Tableau 4.2).










Insert	Schéma de l'insert
CIRBP-201 ORF + 3'-UTR	
CIRBP-210 ORF + 3'-UTR	
CIRBP-201 ORF	
CIRBP-210 ORF	
CIRBP-201 3'-UTR	
CIRBP-210 3'-UTR	
CIRBP-201 ORF + CIRBP-210 3'-UTR	
CIRBP-210 ORF + CIRBP-201 3'-UTR	
CIRBP-210 ORF + 3'-UTR + intron 7	

Table 4.2: Description des constructions pour la surexpression transitoire de CIRBP.

4.4.1 Quantification de la surexpression de CIRBP

Après avoir validé les constructions par séquençage et purifié les plasmides, j'ai transfecté des cellules LoVo avec chacune des constructions. J'ai validé la surexpression par RT-qPCR pour quantifier le taux de transcription des inserts et par western blot pour quantifier la production de protéines. La quantification de la surexpression des plasmides se fait grâce aux couples d'amorces décrits dans l'article [75], qui amplifient une région des 3'-UTR CIRBP-201 et -210 spécifiquement et grâce à un couple d'amorces amplifiant une région commune à l'ORF de CIRBP-201 et CIRBP-210 (figure 4.5 A), qui permet donc la quantification totale de CIRBP.

Lors de la quantification de l'expression de CIRBP (total) et des isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210 spécifiquement

par RT-qPCR, j'ai pu observer de grandes variations d'expression des différents plasmides. Pour rappel, le couple d'amorces CIRBP-CDS permet de quantifier l'expression confondue de CIRBP-201 et CIRBP-210, en amplifiant une région commune de l'ORF. Les couples d'amorces -201 et -210 permettent l'amplification et la quantification des 3'-UTR respectifs. Ainsi, les isoformes ne peuvent être spécifiquement quantifiées que par leur 3'-UTR et si celui-ci est absent, comme dans le cas des constructions avec les ORF seulement, on n'observera pas d'augmentation de l'expression spécifiques des isoformes, seulement une observation des parties communes. La surexpression des ORF seuls semble avoir marché, ainsi que celles du transcrite CIRBP-210 avec son ORF et son 3'-UTR (épissé ou non) et la surexpression de la chimère avec l'ORF de CIRBP-201 et le 3'-UTR de CIRBP-210. Étonnamment, la surexpression de l'ORF+3'-UTR de CIRBP-201, qui présente bien une augmentation de l'expression de CIRBP en général et du 3'-UTR de CIRBP-201, montrerait aussi une augmentation de l'expression du 3'-UTR de CIRBP-210 (qui reste à valider en raison de la forte variabilité expérimentale). Enfin, malgré l'intégrité vérifiée des séquences, il semblerait que les 3'-UTR seuls ne soient que peu voire pas surexprimés, à l'instar de la chimère avec l'ORF de CIRBP-210 et le 3'-UTR de CIRBP-201.

En accord avec les difficultés expérimentales déjà rencontrées pour construire les plasmides et valider la surexpression des inserts en RT-qPCR, la quantification de la protéine CIRBP dans les cellules transfectées avec les différents plasmides ne suit pas tout à fait les résultats obtenus en RT-qPCR (figure 4.5 B). Effectivement, la protéine ne semble pas surexprimée par rapport au contrôle lors de la transfection avec le plasmide exprimant l'ORF de CIRBP-201 seul, malgré une forte surexpression en ARN, et qui ne peut pas être entièrement expliqué par les différences en charge de protéines dans les puits. Peut-être que l'absence de 3'-UTR impacte la traduction de CIRBP. En revanche, la protéine CIRBP est surexprimée par la transfection avec les plasmides exprimant l'ORF de CIRBP-201 et son 3'-UTR et celui exprimant l'ORF de CIRBP-210. Si il n'est pas étonnant de ne pas observer d'augmentation de la protéine dans le cas de surexpression du 3'-UTR de CIRBP-210 en raison de son instabilité, la chimère d'expression de l'ORF de CIRBP-210 et du 3'-UTR de CIRBP-201 induit aussi une surexpression de la protéine, contrairement à son ARN.

4.4.2 Impact de la surexpression de CIRBP sur l'invasion des cellules par *Lm*

En raison des différences d'expression entre les différentes constructions, et de la variabilité mentionnée plus haut dans la quantification de cette expression par une méthode ou l'autre, laissant à l'heure actuelle des doutes sur l'efficacité de l'expression de certaines constructions, les résultats de quantification de l'infection dans les cellules transfectées par chaque construction restent à interpréter avec des réserves.

Il est par ailleurs important de mentionner de noter qu'à 10h post-infection, les puits avec des cellules transfectées avec un plasmide surexprimant l'ORF de CIRBP-201 montraient une mortalité bien supérieures à celles de autres puits (environ 80%), ce qui pourrait être expliqué par l'action potentiellement pro-bactérienne de CIRBP-201 mise en évidence par siARN (ARN interférence, siRNA en anglais) (Article [75], figure 5A). Pour contourner cet écueil, j'ai divisé par deux le temps d'infection et les résultats du taux d'invasion des cellules sont présentés dans la figure 4.6.

Ces résultats préliminaires semblent indiquer que la surexpression des ORF seulement n'impactent pas le taux d'invasion des cellules, alors que toutes les autres conditions font baisser ce taux, ce qui pourrait suggérer l'importance du 3'-UTR dans la régulation de l'infection. Les diminutions d'invasion significatives sont remarquables pour la surexpression du transcrite ORF+3'-UTR de CIRBP-210, de la chimère ORF CIRBP-210 et des 3'-UTR CIRBP-201 et des deux 3'-UTR seuls. Le fait de n'observer que des baisses d'infection est assez surprenant et en contradiction avec les résultats de la figure 5A du papier [75], car je m'attendais à voir le taux d'infection augmenter avec la surexpression de CIRBP-201. Ainsi, ces résultats ne nous permettent pas de conclure quant aux rôles des différentes parties des transcrits, ni des transcrits eux-même sur le contrôle de l'infection. Les incertitudes quant à l'expression des plasmides, tant en protéines qu'en ARN, l'efficacité de transfection, assez basse, des cellules LoVo, conduisant à une hétérogénéité des populations transfectées ou le fait d'avoir dû réduire le temps d'infection, et la mortalité cellulaire induite par CIRBP-201 sont de nombreuses sources possibles de paramètres mal maîtrisés dans cette expérience, qui nous empêchent à ce stade de conclure sur son issue.

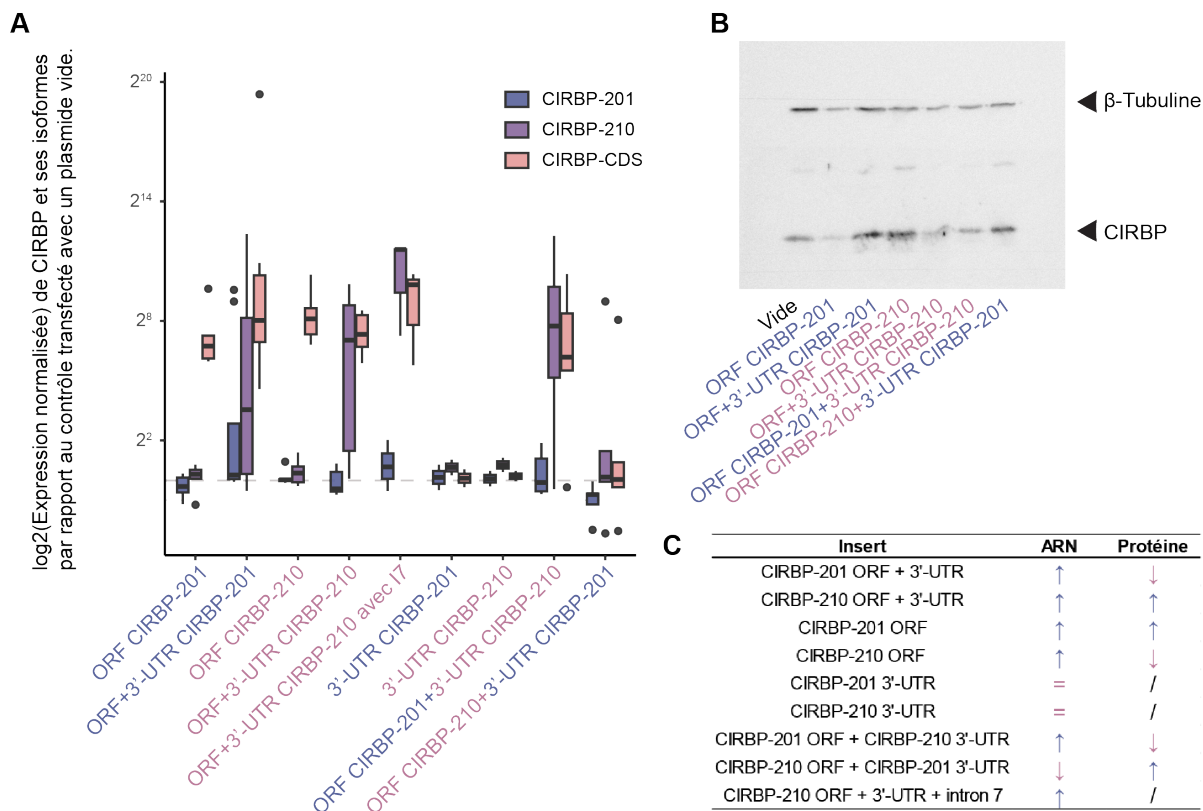


Figure 4.5: Validation de la surexpression de CIRBP par les différents plasmides. Des cellules LoVo ont été transfectées avec les différents plasmides de surexpression des différentes régions de CIRBP-201 et -210. 24h plus tard, les ARN et les protéines ont été extraits. (A) Les taux d'expression des ARN de CIRBP et de ses isoformes -201 et -210 spécifiquement ont été déterminés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules transfectées par un plasmide vide. Les moyennes d'expression de CIRBP pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey. (B) La quantité de protéine CIRBP a été déterminé par immunodétection avec un anticorps anti-CIRBP. (C) Tableau récapitulatif de l'expression des inserts en ARN et protéine par rapport au contrôle.

4.5 Etude de l'impact de l'ISR et du NMD sur la variation d'abondance des isoformes de CIRBP dans le contexte de l'infection par *Lm*

Un précédent projet du laboratoire; mené par Vinko Besic lors de son post-doctorat et dont une partie des données générées a posé les bases de mon projet de thèse; a démontré que l'infection par *Lm* induisait la phosphorylation du facteur eIF2 α par l'activation de la voie de la réponse intégrée au stress (Integrated stress response, ISR) [110]. La phosphorylation de eIF α peut être activée par différentes voies, notamment le stress du réticulum endoplasmique (ER stress) *via* la kinase PERK ou la carence en acides aminés *via* la kinase GCN2 [537]. Avant cette étude, il avait déjà été montré que l'infection par *Lm* pouvait induire l'ER stress sous l'effet de l'activité de la LLO [106] mais aussi une carence transitoire en acides aminés [111] et donc la phosphorylation de eIF2 α . L'une des conséquences notables de cette phosphorylation est l'inhibition du NMD [189], ce qui est nécessaire au bon établissement de l'ISR, car beaucoup d'ARN codant pour des facteurs clés de l'ISR sont dégradés par le NMD (ATF3, ATF4, CHOP, etc.) [189,538,539]. Enfin, CIRBP est aussi interconnecté avec l'ER stress. En effet, il a été montré que, lorsqu'il est sécrété en cas de septicémie, CIRBP peut induire l'ER stress en se liant à TLR4 [423]. Cependant, l'ER stress, notamment l'axe PERK/ATF4, activé par la molécule tunicamycine, induit une diminution de la quantité de protéine de CIRBP [436] alors que l'induction de l'ER stress par la thapsigargine augmente la quantité d'ARN de CIRBP et fait baisser son taux de méthylation [318]. Ces deux résultats ne sont pas nécessairement incompatibles si, en réponse à la thapsigargine et à la tunicamycine, l'ER stress altère l'épissage alternatif de CIRBP en faveur d'un

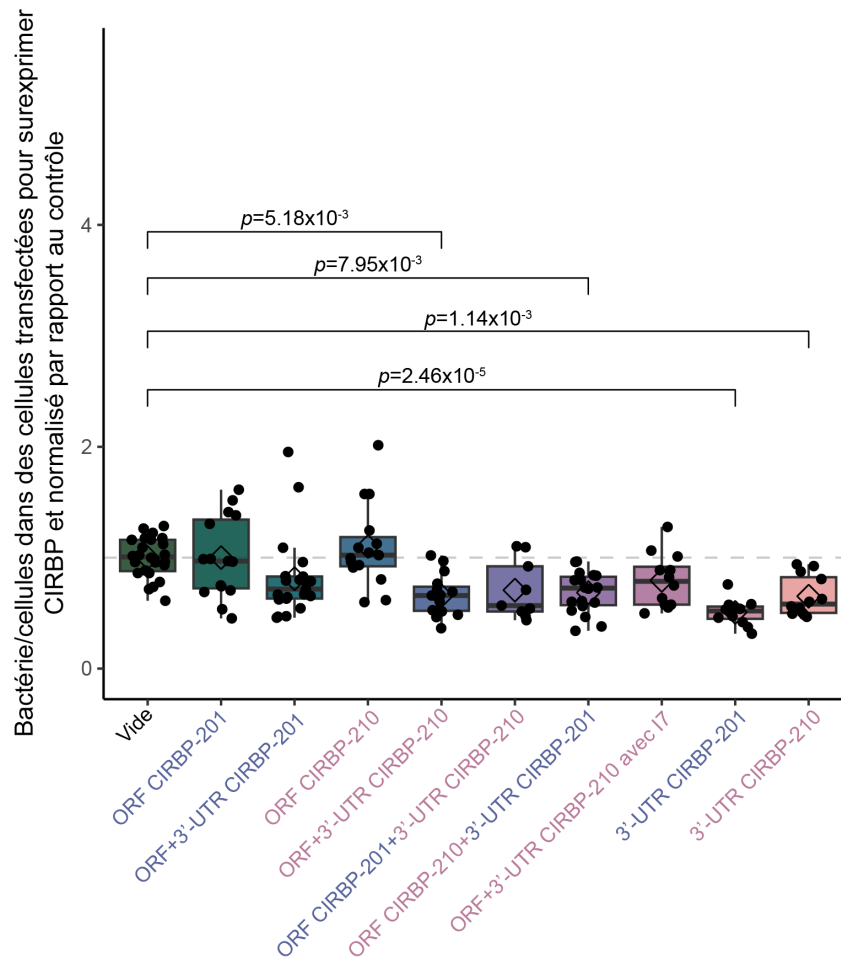


Figure 4.6: Taux d'invasion des cellules LoVo surexprimant CIRBP. Des cellules LoVo transfectées pour la surexpression des différentes régions de CIRBP-201 et -210 ont été infectées avec *Lm* pour 10h. Les taux d'expression des ARN de CIRBP et de ses isoformes -201 et -210 spécifiquement ont été déterminés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules non-infectées. Le changement d'isoforme a été déterminé en quantifiant le ratio d'expression de CIRBP-210 / CIRBP-201. Les moyennes de ratios pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

isoforme instable ou non-codant, ce qui affecterait la production de protéine et ils suggèrent que l'expression de CIRBP est étroitement liée à l'ER stress et au NMD. En revanche, il reste à étudier la représentation des différents isoformes de CIRBP et son impact sur la quantité de protéine produite lors des traitements à la thapsigargine et tunicamycine. La voie de régulation décrite ci-dessus est schématisée dans la figure 4.7.

En m'inspirant de ces travaux antérieurs, et pour répondre à la question de si l'ISR fait partie des réponses aux stress qui conduisent à une régulation de CIRBP via l'épissage alternatif / le changement d'isoforme; j'ai cherché à déterminer si (i) l'induction de l'ER stress et plus largement la phosphorylation de eIF2 α pouvaient induire le changement d'isoforme de CIRBP en faveur de CIRBP-210 et (ii) à affiner les résultats présentés dans l'article sur la sensibilité des isoformes de CIRBP au NMD.

4.5.1 Régulation de CIRBP par perturbation chimique de l'ISR

Pour répondre à la première partie de la question, j'ai utilisé plusieurs approches pour induire l'ER stress et/ou la phosphorylation d'eIF2 α . J'ai incubé des cellules LoVo en culture avec de la tunicamycine, qui induit la déglycosylation des protéines [540] qui s'accumulent alors dans le réticulum endoplasmique et active la kinase PERK;

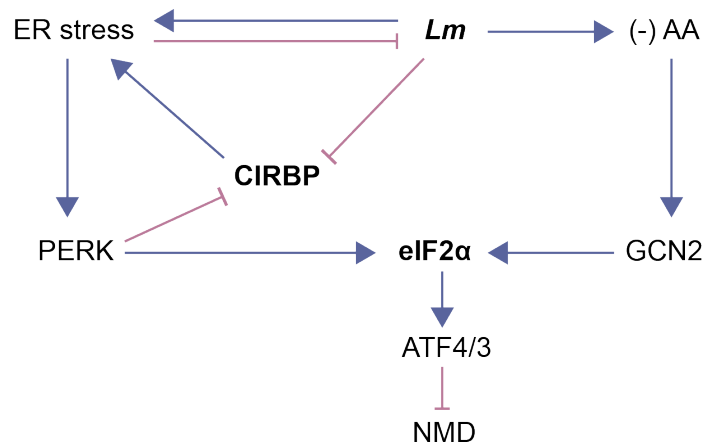


Figure 4.7: Schéma des interactions décrites entre *Lm*, CIRBP, l'ISR et le NMD.

et la thapsigargine, qui inhibe les pompes ATPase calcium dépendantes du réticulum sarcoplasmique [541]. J'ai aussi créé une carence en acides aminés en incubant les cellules dans un milieu sans glutamine. Après 5h d'incubation, j'ai quantifié le changement d'isoforme de CIRBP (figure 4.8).

L'absence de glutamine seule ne semble pas avoir d'effet sur le changement d'isoforme de CIRBP, alors qu'on peut observer un changement en faveur de CIRBP-210 dans les cellules traitées avec de la tunicamycine ou de la thapsigargine, mais il sera nécessaire de répliquer l'expérience avant de pouvoir valider statistiquement l'effet des composés sur la régulation de CIRBP. L'absence de glutamine n'ayant pas d'effet pourrait s'expliquer par le fait que seul l'ER stress régule CIRBP. Une autre possibilité serait que la carence en acides aminés ne soit pas assez forte pour induire un état de stress conséquent chez les cellules. Toutefois, ces résultats sont en faveur de l'hypothèse suggérant que l'ISR pourrait induire une variation de l'épissage de CIRBP en cas d'infection par *Lm*.

4.5.2 Etude de l'impact des deux voies de dégradation du NMD sur la stabilité différentielle des isoformes de CIRBP

L'isoforme CIRBP-210 est une cible du NMD, précédemment décrite [542], que j'ai par la suite validée dans les cellules LoVo. Son abondance peut donc varier si l'activité du NMD est perturbée, quelles que soient les conditions.

Dans le contexte de l'infection par *Lm*, la figure S3 de l'article [75] indique que, parmi les isoformes cible du NMD affectées par des événements d'épissage alternatif au cours de l'infection par *Lm*, on observe autant de hausse que de baisse de l'abondance des transcrits, ce qui réfute l'hypothèse d'une inhibition générale du NMD. Ainsi l'augmentation relative de CIRBP-210 ne serait pas due à une inhibition générale du NMD, mais à une réorientation en amont de l'épissage alternatif en faveur de l'isoforme instable.

Comme décrit dans l'introduction, il existe deux voies de dégradation des cibles du NMD : celle gouvernée par le complexe SMG5/7, impliquée dans la dégradation exonucléolytique des ARN par promotion de la déadénylation, et celle gouvernée par SMG6, induisant la dégradation endonucléolytique des ARN cibles. Ces deux voies restent fonctionnellement interconnectées mais ne sont pas entièrement redondantes dans les ARN qu'elles affectent. Dans ce contexte, j'ai voulu savoir si CIRBP-210 était plus sensible à l'une des voies, pour consolider les résultats obtenus par l'inhibition d'UPF1 (figure 2D de l'article [75]) en réprimant plus sélectivement l'expression des acteurs de l'une ou l'autre voie, afin d'affiner les connaissances sur les contributeurs à la stabilité de CIRBP-210 dans notre modèle cellulaire. Pour rappel, l'inhibition du NMD par inhibition de l'hélicase UPF1 par siARN induit l'augmentation de l'expression de CIRBP-210 mais ne change pas l'expression de CIRBP-201.

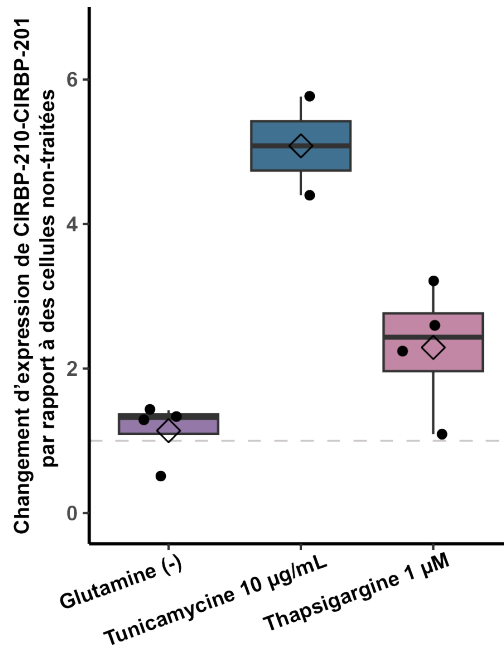


Figure 4.8: Changement d'isoforme de CIRBP en cas d'activation de l'ISR. L'ISR a été induite dans des cellules LoVo avec de la tunicamycine, de la thapsigargine et par carence en glutamine. Les taux d'expression des ARN de CIRBP et de ses isoformes -201 et -210 spécifiquement ont été déterminés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules non-traitées. Le changement d'isoforme a été déterminé en quantifiant le ratio d'expression de CIRBP-210 / CIRBP-201. Les moyennes de ratios pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

4.5.2.1 Expression de CIRBP-210 dans un contexte d'inhibition partielle du NMD

Pour étudier si CIRBP-210 serait plus sensible à la dégradation par une voie qu'une autre, j'ai spécifiquement inhibé chacune des protéines SMG (SMG5, SMG6 et SMG7), individuellement ou en combinaison et j'ai quantifié l'expression de chaque isoforme par RT-qPCR dans des cellules infectées.

Dans un premier temps, j'ai quantifié l'expression de CIRBP-201 et CIRBP-210 en condition d'inhibition partielle du NMD. Bien que le nombre de réplicats expérimentaux ne soit pas optimal (figure 4.9), il semblerait que, à part pour l'inhibition de SMG5, les simples inhibitions des protéines SMG ne soient pas suffisantes pour stabiliser CIRBP-210 comme l'inhibition de UPF1. Une augmentation est observée avec l'inhibition de SMG5, mais au vu de la variabilité expérimentale, elle mériterait d'être confirmée. En revanche, l'expression de CIRBP-201 n'est pas impactée par l'inhibition des SMG, comme attendu. Concernant les doubles inhibitions, la tendance générale est à la hausse pour l'expression de CIRBP-210, mais que ce soit l'inhibition de la voie exonucléolytique (SMG5/7) ou la combinaison de l'inhibition totale de la voie endonucléolytique (SMG6) et partielle de la voie exo-nucléotique (SMG5 ou 7), l'augmentation de l'expression reste sensiblement la même. Ces résultats montrent une influence de la voie exonucléolytique, surtout lorsque SMG7 est inhibé, qui s'amplifie lorsque l'acteur de la voie endonucléolytique, SMG6, est aussi inhibé. Ces observations sont cohérentes avec l'article de Boehm *et al.*, [542] qui trouve que les deux voies s'interconnectent, avec une redondance fonctionnelle partielle pour la dégradation des substrats, à laquelle s'ajoute une coopération des acteurs des deux voies pour un même processus.

Bien que l'ensemble des cibles du NMD ne soient pas stabilisées au cours de l'infection, indiquant que le NMD reste fonctionnel, il reste possible que l'activité du NMD soit partiellement diminuée au cours de l'infection en raison de la phosphorylation d'eIF2 α et de l'activation de l'ISR. Il est donc possible que l'expression de CIRBP-210 puisse être partiellement affectée dans un tel scénario, même s'il est peu probable que ce soit le mécanisme principal à l'origine des changements d'isoformes observés au cours de l'infection.

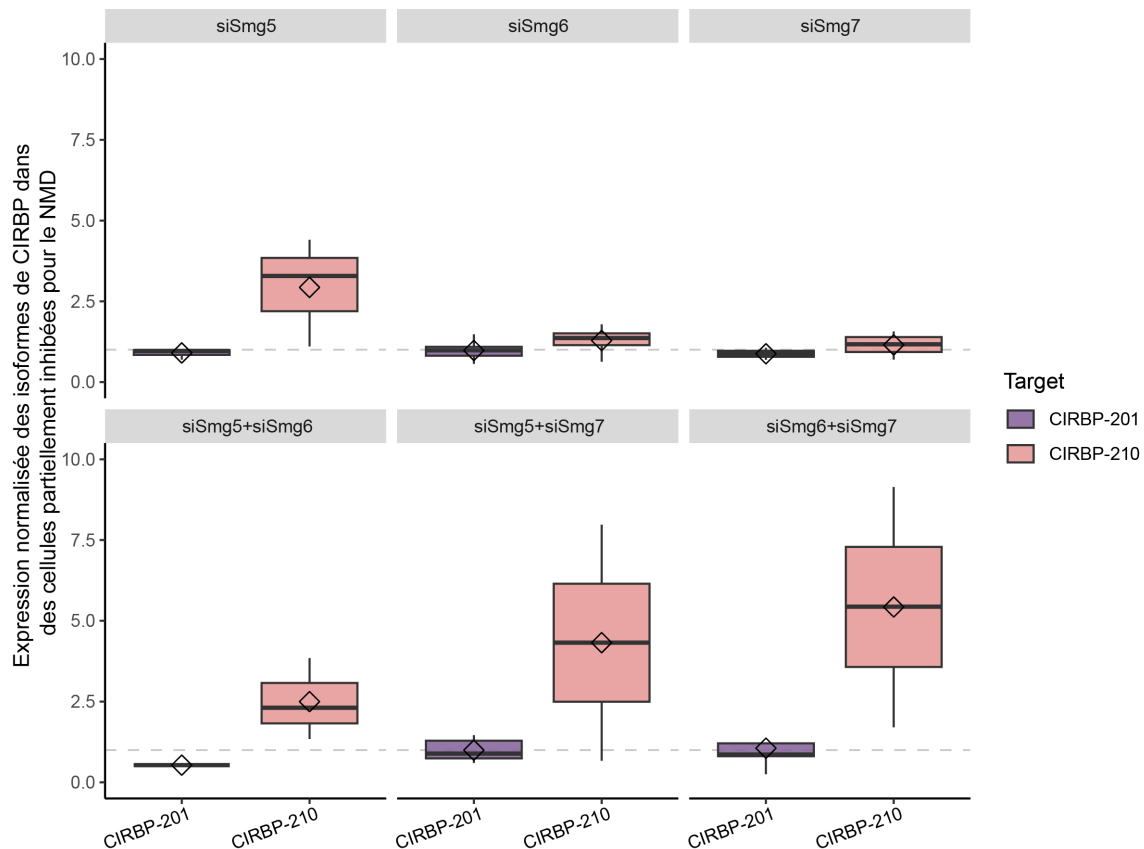


Figure 4.9: Expression des isoformes de CIRBP en cas d'inhibition partielle du NMD dans des cellules infectées. Les voies de dégradation endonucléolytique (SMG6) et exonucléolytique (SMG5/7) du NMD ont été inhibées avec des siARN correspondants. 48h après la transfection, les taux d'expression des ARN de CIRBP et de ses isoformes -201 et -210 spécifiquement ont été déterminés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules transfectées avec un siARN contrôle. Le changement d'isoforme a été déterminé en quantifiant le ratio d'expression de CIRBP-210 / CIRBP-201. Les moyennes de ratios pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

4.5.2.2 Impact de l'inhibition du NMD sur l'invasion des cellules

Étant donné l'effet pro-bactérien observé lors d'une inhibition de CIRBP-210 (Article [75], Fig. 5a), on pouvait s'attendre à ce qu'une inhibition globale du NMD ait un effet sur l'infection. En théorie, l'inhibition du NMD devrait conduire à une augmentation de l'abondance de CIRBP-210, et potentiellement d'autres cibles du NMD dont l'expression pourrait avoir un effet sur le contrôle de l'infection bactérienne. Comme le NMD inhibe des gènes de la réponse au stress [539], inhiber le NMD devrait alors augmenter l'expression de ces gènes, ce qui peut aider à promouvoir la réponse cellulaire autonome et améliorer le contrôle de l'infection, au-delà d'un rôle passant uniquement par la régulation de CIRBP. Pour évaluer l'ampleur de cet effet, j'ai quantifié l'effet de l'inhibition par siARN de plusieurs facteurs du NMD sur l'infection par *Lm*, en dénombrant le nombre de bactéries intracellulaires après 10h d'infection.

Comme montré dans la figure 4.10, la plupart des inhibitions des facteurs du NMD n'induisent pas de modulation significative de l'infection. La diminution la plus notable est obtenue en utilisant une combinaison si-UPF1 + siCIRBP-201. Cependant, l'inhibition de UPF1 en plus de CIRBP-201 n'a pas d'effet supplémentaire par rapport à l'inhibition de CIRBP-201 seul. La co-inhibition de CIRBP-210 et UPF1 n'affecte pas le taux d'invasion par rapport au contrôle, contrairement à l'inhibition de CIRBP-210 seule. Une possible interprétation serait que la stabilisation de CIRBP-210 par si-UPF1 pourrait compenser la répression de CIRBP-210 par le siARN correspondant. Les inhibitions de SMG5 et SMG6 seuls n'ont pas beaucoup d'effet mais l'inhibition de SMG7 fait aussi légèrement

baisser le taux d'invasion des cellules, ce qui est en phase avec son rôle central dans la coordination de la dégradation des ARN cibles. Les doubles-inhibitions des protéines SMG font aussi baisser le taux d'invasion, malgré une faible reproductibilité expérimentale dans le cas de l'inhibition de SMG5/7. En conclusion, les effets sur l'infection de l'inhibition du NMD sont plus modérés que l'inhibition des isoformes de CIRBP, probablement en raison du nombre important de gènes impactés, ce qui masquerait le phénotype. Ainsi, plutôt que de suggérer un rôle actif du NMD dans la régulation de CIRBP et le contrôle de l'infection par *Lm*, ces résultats renforcent plutôt le rôle crucial de CIRBP, notamment de CIRBP-210, dans le contrôle de l'infection.

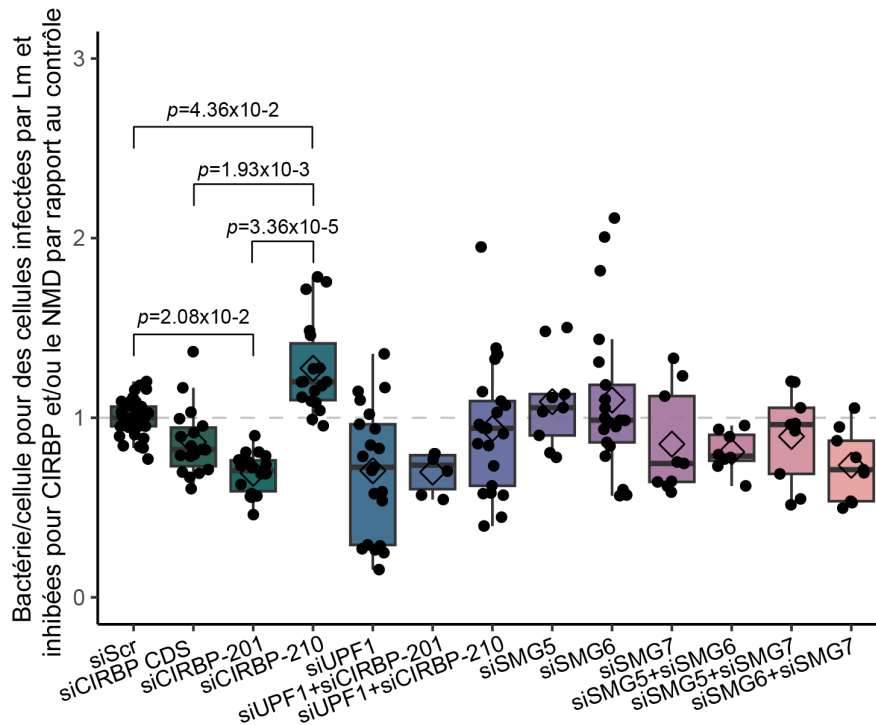


Figure 4.10: Invasion des cellules en cas d'inhibition totale ou partielle du NMD et/ou de CIRBP. Le NMD en général (siUPF1) ou ses voies de dégradation endonucléolytique (siSMG6) et exonucléolytique (siSMG5 et siSMG7), CIRBP total (siCIRBP CDS) ou ses isoformes (siCIRBP-201 ou siCIRBP-210) ont été inhibés avec des siARN correspondants. 48h après la transfection, les cellules ont été infectées pour 10h avec *Lm* puis lysées. Les bactéries intracellulaires ont été dénombrées et rapportées au nombre de cellules, puis normalisées par rapport aux taux d'invasion des cellules transfectées avec un siARN contrôle. Les moyennes d'invasions pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

4.6 Quantification des différentes isoformes de CLK1 par RT-qPCR

Comme décrit dans les études de Haltenhof *et al.* [197] et Ninomiya *et al.* [227], en cas d'hyperthermie et plus récemment dans mes travaux [75] sous l'action de la LLO, l'activité de la kinase de réponse au stress de CLK1 (cdc-like kinase 1) est inhibée. Cette inhibition a pour conséquence une déphosphorylation de ses protéines cibles, les facteurs d'épissage SRSF et donc un remaniement de l'épissage des cibles des SRSF, dont CIRBP mais aussi CLK1 elle-même. En effet, l'ARNm de CLK1 est présent sous deux versions dans des cellules non-stressées : un transcrite mature et codant (mature) et un transcrite incomplètement épissé ayant retenu les introns 3 et 4 et donc non-codant (RI). En cas de stress chaud ou induit par la LLO, la reprise d'épissage du transcrite RI va permettre d'accumuler des transcrits matures qui pourront rapidement être traduits à la levée du stress et donc rétablir la phosphorylation des protéines cibles [227]. Dans l'article [75] Fig. 4B, j'illustre cette reprise de l'épissage de CLK1 sous l'action de la LLO par une analyse par PCR spécifique de chaque transcrite. Afin de compléter ce résultat par une analyse plus quantitative, j'ai quantifié chacune des deux versions du transcrite par RT-qPCR, dans chacune des conditions (figure 4.11).

Ici, les expressions des transcrits ont été normalisées par rapport à l'expression totale de CLK1. Dans les cellules non-traitées (Neg), le ratio CLK1-RI/CLK1-mature est en faveur du transcrit RI, environ 50% plus abondante que l'isoforme mature. ces proportions se retrouvent inversées dans des cellules traitées avec de la LLO, où l'isoforme mature est 50% plus exprimée que le transcrit RI. La différence significative entre les ratios d'expression confirme la reprise de l'épissage de CLK1 en présence de LLO. Comme dans le cas de l'hyperthermie, cette reprise de la maturation de l'ARN de CLK1 est indicatrice d'une perturbation de l'activité des facteurs d'épissage SR et en amont, de l'inhibition de l'activité de kinase de CLK1 elle-même. La déphosphorylation des protéines SR que j'ai observée lors de l'infection (article [75], figure 4C) conforte cette hypothèse, suggérant que la perte de fonction de CLK1 est clé dans la signalisation liant le stress induit par la LLO à l'épissage alternatif de CIRBP.

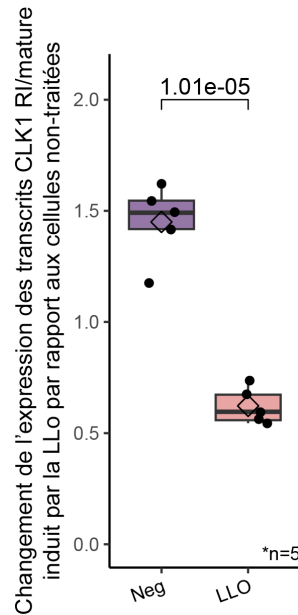


Figure 4.11: Changement d'isoforme de CLK1 dans des cellules LoVo incubées avec de la LLO. Des cellules LoVo nt été incubées 1h avec ou sans LLO. Les ARN ont été extraits et les taux d'expressions des transcrits RI et mature de CLK1 ont été quantifiés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par l'expression totale de CLK1 dans des cellules non-traitées. La reprise d'épissage a été déterminée en quantifiant le ratio d'expression de RI / mature. Les moyennes de ratios pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un t-test.

4.7 Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires

Si le changement d'isoforme de CIRBP a bien lieu dans des cellules LoVo, une lignée modèle d'adénocarcinome du colon dans l'étude des mécanismes d'infection de *Lm*, j'ai souhaité déterminer si ce résultat était généralisable à d'autres modèles cellulaires. En effet, bien que la grande diversité des contextes de stress dans lesquels une régulation de CIRBP a été observée laisse penser que de telles régulations occupent une position de carrefour, conservée dans l'évolution et commune à de nombreux contextes de stress et types cellulaires, il serait envisageable que certains types cellulaires, en fonction de leur différenciation fonctionnelle, soient plus sensibles que d'autres à certains types de stress, et que la mise en œuvre d'une régulation de CIRBP y diffère.

4.7.1 Régulation de l'épissage de CIRBP dans d'autres lignées de cellules adhérentes non-immunitaires

Les cellules LoVo dérivent de cellules intestinales épithéliales et sont adhérentes en culture. Lors de leur invasion par *Lm*, elles sont aussi bien permissives à une internalisation par la voie InIA que par la voie InIB. Afin de comparer leur

compartiment à celui d'autres lignées adhérentes de cellules non phagocytaires. J'ai sélectionné, dans la collection de lignées cellulaires du laboratoire, trois autres lignées adhérentes pour évaluer l'effet de l'infection par *Lm* sur l'expression de CIRBP. Les cellules Hela (ATCC #CCL2) sont très répandues en laboratoire et dérivent de cellules utérines, plus précisément d'un adénocarcinome du cervix. Ces cellules ont déjà été utilisées pour étudier l'infection par *Lm* [543]. Une des particularité des cellules Hela est l'absence d'expression de cadhérine-E à la surface de leur membrane plasmique [544], si bien que l'entrée ne peut se faire que par la voie InIB, avec une efficacité réduite, ce qui nécessite d'ajuster la MOI en conséquence. Les cellules Caco2 (ATCC #HTB-37) dérivent aussi de cellules intestinales épithéliales et sont aussi une lignée modèle pour étudier les mécanismes d'infection par *Lm* [545]. Enfin, les cellules A549 (ATCC #CCL-18) dérivent du tissu pulmonaire qui n'est pas la cible privilégiée d'une bactérie alimentaire comme *Lm*, mais elles sont très permmissibles à l'infection en culture cellulaire, et pour cette raison ont déjà été utilisées dans des études *Lm* [546]. Valider un phénotype dans une lignée cellulaire non ciblée par le pathogène pourrait permettre de le généraliser comme réponse à un stress. J'ai donc cultivé et infecté ces trois lignées de sorte à obtenir un taux d'invasion similaire à celui des cellules LoVo et estimé l'expression relative des isoformes de CIRBP à 5h et 10h après l'infection (figure 4.12 A).

Malgré des difficultés à harmoniser les paramètres d'infection (différences importantes de vitesse de croissance et donc de confluence au jour de l'infection et de taille et donc de nombre de cellules), il semblerait que l'infection par *Lm* a un effet à 5h post-infection, et, malgré une importante variabilité expérimentale, induise un déséquilibre d'épissage de CIRBP en faveur de l'isoforme -210 dans ces trois lignées cellulaires. Le phénomène semble le moins marqué dans les cellules Hela. De manière surprenante, à 10h post-infection, on observe une baisse du ratio CIRBP-210/CIRBP-201. La différence de paramètres expérimentaux par rapport aux infections de cellules LoVo pourrait expliquer la différence observée dans la dynamique du phénomène. Au vu de ces résultats, il semble que les différents types de cellules adhérentes testées soient affectées par un changement similaire de l'épissage de CIRBP, chacune avec leur cinétique propre dépendant, probablement, de la cinétique infectieuse dans chaque modèle. Toutefois, les résultats présentés ici mériteraient d'être fortifiés en répétant cette expérience en optimisant les conditions d'infection pour chaque lignée, mais aussi peut-être en utilisant de la LLO purifiée plutôt qu'en les infectant, ce qui permet un contrôle plus précis des paramètres expérimentaux.

4.7.2 Régulation de l'épissage de CIRBP en réponse à la LLO dans une lignée de macrophages

Outre les cellules épithéliales, *Lm* infecte aussi plusieurs types de cellules immunitaires, dont les macrophages [547–549]. Ce modèle cellulaire serait alors prometteur pour étudier à l'avenir les relations entre réponses immunitaires et changement d'isoforme de CIRBP. Pour déterminer si l'expression de CIRBP était modulée dans les macrophages en réponse à la LLO, j'ai utilisé des cellules THP-1, d'origine monocyttaire, différenciées avec du PMA pour les rendre adhérentes. Je les ai ensuite incubées 1h avec de la LLO à concentration croissante (1 nM, 3,nM, 6,nM) et j'ai quantifié l'expression de chaque isoforme par RT-qPCR.

Comme présenté dans la figure 4.12 B, le changement d'isoforme de CIRBP dans les cellules THP-1 semble encore plus important que dans les cellules LoVo. Effectivement, une dose de LLO à 1nM suffit déjà à obtenir un ratio d'expression de CIRBP-201/CIRBP-210 de 2,5 en moyenne alors qu'il n'atteint que 1,5-2 à des doses plus élevées dans des cellules LoVo (Article [75], Figures 3 B-E). Dans le cas des cellules THP-1, comme dans les cellules LoVo, l'épissage alternatif de CIRBP croît avec la dose de LLO, puisque le ratio d'expression des isoformes atteint 3,5-3,75 à 3 nM de LLO et ~ 4 à 6 nM de LLO. En conclusion, ces résultats indiquent que le changement d'isoforme de CIRBP a aussi lieu dans des THP-1 en réponse à la LLO et de manière plus conséquente, peut-être car les THP-1 sont des cellules immunitaires et sont peut-être plus prônes à réguler des gènes comme CIRBP, fortement impliqués dans des réponses immunitaires [550].

4.8 Localisation de CIRBP dans des cellules non-infectées, infectées ou incubées avec de la LLO

Comme je l'ai décrit dans la revue de littérature [322], (paragraphe 3.3.2.1) la localisation de la protéine CIRBP impacte fortement son activité. Schématiquement, CIRBP nucléaire est décrit pour stabiliser ses transcrits cibles

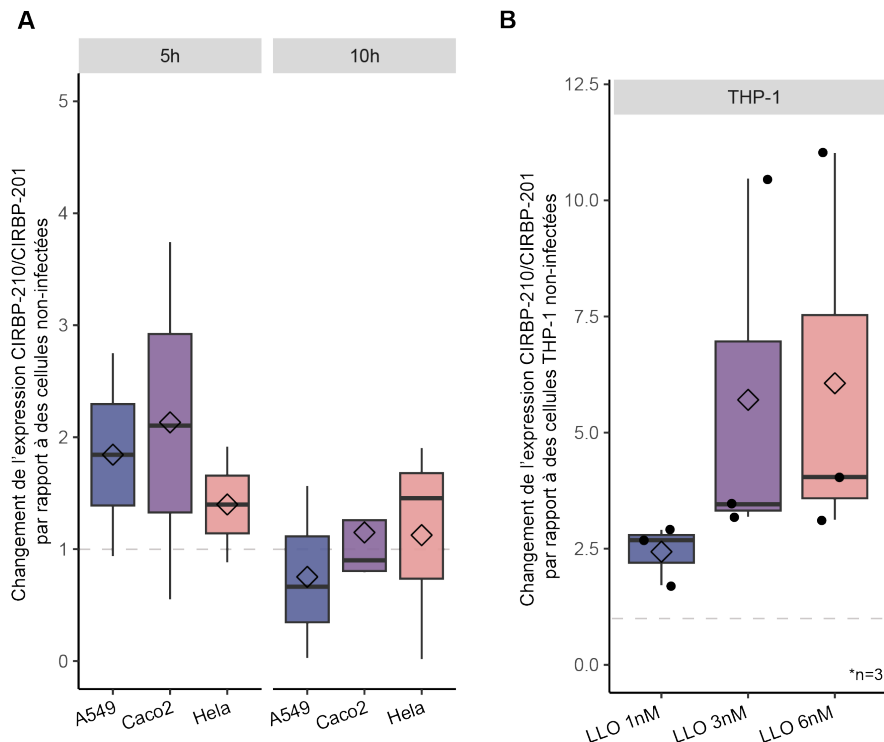


Figure 4.12: Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires. (A) Des cellules A549, Caco2 et HeLa ont été infectées avec *Lm*. (B) Des macrophages THP-1 ont été différenciés et incubées avec de la LLO pendant 1h. Dans les deux cas, les ARN ont été extraits et les taux d'expression des isoformes -201 et -210 de CIRBP ont été quantifiés par RT-qPCR, normalisés par un gène de contrôle (GAPDH) et pondérés par leurs expressions dans des cellules non-infectées ou non-traitées. Le changement d'isoforme a été déterminé en quantifiant le ratio d'expression de CIRBP-210 / CIRBP-201. Les moyennes de ratios pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

par polyadénylation alternative, CIRBP cytoplasmique va favoriser leurs interactions avec les ribosomes, CIRBP dans les granules de stress va au contraire inhiber la traduction des ARN cibles et enfin, CIRBP extracellulaire est décrit comme un DAMP (damage -associated molecular pattern) et stimule *via* le récepteur TLR4 une forte réponse immunitaire, notamment en cas de septicémie. Pour ces raisons, il était important de déterminer la localisation de la protéine CIRBP dans des cellules infectées, non-infectées et incubées avec de la LLO car une relocalisation de la protéine au cours de l'infection pourrait affecter sa fonction. J'ai également analysé la localisation des isoformes -201 et -210 de CIRBP par sm-FISH. Dans ce cas aussi, une relocalisation des transcrits pourraient avoir un impact sur leur maturation et leur traduction. Les travaux d'immunofluorescence ont été réalisés par deux jeunes chercheuses au cours de leur stage de master 1 sous ma supervision. Ania Kurowska a travaillé sur la localisation de CIRBP dans des cellules infectées et Anouk Viry sur la localisation de CIRBP au cours d'une cinétique d'incubation avec de la LLO. Je rends compte ici de leur travail avec leur accord explicite.

4.8.1 Analyse de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées et infectées

Au vu de la différence d'impact qu'ont les isoformes de CIRBP sur l'invasion des cellules par *Lm*, je me suis demandé si leurs effets pouvaient découler des différences entre les séquences protéiques. En effet, la protéine codée par CIRBP-210 diffère de la protéine canonique (codée par CIRBP-201) dans sa région C-terminale : on y observe une mutation A168G, suivie d'un codon stop prématuré, ce qui ampute la protéine codée par CIRBP-210 de 4 acides aminés (T169, H170, N171 et E172) par rapport à la protéine codée par CIRBP-201.

Il a été décrit que la thréonine 169, manquante dans la protéine CIRBP-210, est phosphorylée par la kinase CK2

[329] et est impliquée dans le transport de la protéine CIRBP du noyau vers le cytoplasme en cas de certains stress comme les dommages à l'ADN. Ainsi, il serait envisageable que, en exprimant majoritairement l'isoforme CIRBP-210 et donc en produisant la protéine CIRBP tronquée, la cellule module à la fois la quantité de protéine (la dégradation de l'ARNm CIRBP-210 étant dépendante de la traduction) et sa localisation. La séquestration de la protéine dans le noyau aurait en conséquence un impact sur ses fonctions. Pour tester la phosphorylation de CIRBP, j'ai immunoprécipité la protéine CIRBP à partir d'extraits protéiques de cellules infectées ou non par *Lm* et je les ai fait migrer en SDS-PAGE. J'ai ensuite utilisé un anticorps anti-phospho-thréonine pour si détecter si CIRBP était phosphorylé.

Cependant, j'ai rencontré des grandes difficultés expérimentales à réaliser cette expérience. D'après mes hypothèses, les cellules que j'utilisais à cette période avaient trop de passage (et se comportaient comme pré-stressées avant même l'infection) et le milieu de culture des bactéries s'était acidifié (impactant fortement leur croissance et virulence). J'ai donc eu du mal, à cette période, à induire le changement d'isoforme de CIRBP de manière générale. De plus, les résultats des immunoblots anti-phospho-thréonine ne sont pas satisfaisants, car le signal est souvent dur à discerner et les résultats sont très peu reproductibles. J'ai donc choisi de mettre cette hypothèse en suspens.

En observant la figure 4.13, dans les puits d'immunoprécipitation (IP), on voit sur la première image une bande fantôme dans le puits NI et pas dans le puits *Lm*, sur la deuxième, on devine une bande plus intense dans le puits NI que dans le puits *Lm* et sur la troisième image, le signal est à peine détectable et non-interprétable. Je ne peux malheureusement pas tirer de conclusion quant à l'état de phosphorylation de CIRBP entre cellules infectées et non-infectées.

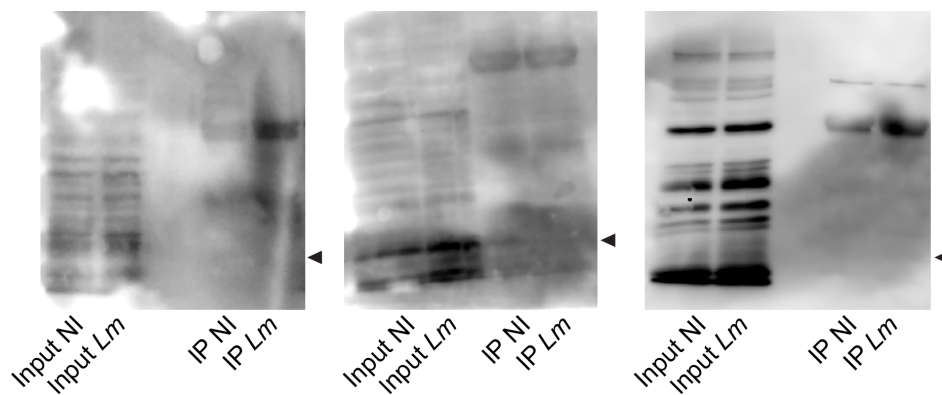


Figure 4.13: Phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées ou infectées par *Lm*. Des cellules LoVo ont été infectées avec *Lm* pendant 10h, les protéines ont été extraites et CIRBP a été immunoprécipité (puits IP). La phosphorylation de CIRBP est observée par immunodétection à l'aide d'un anticorps anti-phospho-thréonine. La flèche indique la bande qui correspondrait à la taille de CIRBP.

Pour pouvoir valider ou invalider l'hypothèse de la phosphorylation de CIRBP, je pense qu'il vaudrait mieux répéter ces expériences en utilisant de la LLO plutôt que d'infecter les cellules, car les paramètres expérimentaux sont alors mieux contrôlés et le changement d'isoforme est plus net. Au cours de ma thèse, j'ai également optimisé le protocole de détection de protéines phosphorylées par immunoblotting, ce qui améliorerait sans doute le signal.

4.8.2 Localisation des ARN CIRBP-201 et CIRBP-210 par sm-FISH

Comme décrit dans la littérature, la localisation des ARN dans la cellule peut impacter leur traduction [551,552], par exemple s'ils sont séquestrés dans des MLO comme le noyau ou dans les granules de stress [553,554]. De plus, l'épissage peut aussi influencer la localisation et donc la traduction des ARN [555]. Comme nous avons observé une baisse d'expression de la protéine CIRBP (article [75], figure 2F) dans les cellules infectées, elle pourrait être en partie liée à une relocalisation de l'isoforme ARN majoritaire. Ainsi, pour déterminer spécifiquement la localisation des transcrits CIRBP-201 et CIRBP-210, j'ai utilisé une approche de sm-FISH (single-molecule Fluorescent *in situ* hybridization) en marquant spécifiquement chaque isoforme (figure 4.14 A). J'ai ensuite quantifié chaque isoforme, sous forme de foyer fluorescent dans le noyau et dans le cytoplasme (figure 4.14 B).

Dans les cellules non-infectées, il y a plus de foyers correspondant à CIRBP-201, dans le cytoplasme et dans le noyau. CIRBP-201 est aussi plus présent dans le noyau que dans le cytoplasme, de manière statistiquement significative. Dans cette même condition, CIRBP-210 est aussi essentiellement nucléaire (figure 4.14 B). Dans les cellules infectées, on observe une hausse du nombre de foyers de CIRBP-210, mais pas de CIRBP-201. La répartition de CIRBP-201 ne change pas et les foyers nucléaires sont toujours significativement plus nombreux que les foyers cytoplasmiques. Pour CIRBP-210, on observe une hausse statistiquement significative du nombre de foyers cytoplasmique par rapport au contrôle, suggérant que cet isoforme est au moins aussi présente dans le cytoplasme voire plus que CIRBP-201.

Cependant, la méthode d'analyse de ces images présente quelques limites. Un premier défaut apparaît, en constatant que certains comptes de CIRBP-210, obtenus par soustraction des comptes CIRBP-201 aux comptes CIRBP-CDS, sont négatifs, suggérant que l'algorithme a détecté plus de foyers CIRBP-201 que de foyers CIRBP-CDS, ce qui est biologiquement impossible. Cela suggère l'introduction de faux-positifs au moins dans un des canaux. Pour améliorer la détection des foyers, il serait plus pertinent de faire une première analyse de colocalisation des deux types de foyers, et de ne considérer comme CIRBP-201 que les foyers colocalisant avec les signaux des deux sondes. De même, dans la mesure où les cellules LoVo n'expriment pas que les isoformes 201 et 210 de CIRBP, les sondes peuvent aussi marquer d'autres isoformes et introduire un signal additionnel, masquant peut-être des différences plus marquées de localisation. Ainsi, si cette expérience était à refaire, il serait peut-être plus sûr d'utiliser un jeu de sonde plus spécifique à chacun des isoformes, qui ne marquerait alors que les parties différentes de CIRBP-201 et CIRBP-210.

4.8.3 Localisation cellulaire des protéines CIRBP-201 et CIRBP-210 dans des cellules infectées

Travail réalisé par Anna Kurowska de février à juin 2021

Il a été décrit qu'en cas de stress induit par des dommages à l'ADN (avec des UV [329]), CIRBP migre vers le cytoplasme, et même vers les granules de stress en cas de stress oxydatif [289]. Nous avons donc voulu déterminer si l'infection par *Lm* induisait aussi une relocalisation cytoplasmique de CIRBP. Pour discriminer la localisation des protéines codées par CIRBP-201 et CIRBP-210, nous avons transfecté des cellules LoVo avec les siARN décrits dans l'article [75] pour inhiber CIRBP en général, ou chacun des isoformes, comme illustré en figure 4.15 A. Lors de l'inhibition de l'expression de l'un des isoformes par siARN, en théorie on ne devrait plus observer que l'autre isoforme, et donc la localisation spécifique de ce dernier, selon les conditions (infection ou non).

Pour mesurer la relocalisation de CIRBP, nous avons quantifié l'intensité totale de fluorescence de CIRBP dans la condition transfectée avec le siARN contrôle (Ctrl), pour s'assurer que la transfection n'affectait pas la régulation de CIRBP. D'après les résultats de la figure 4.15 B, l'intensité de CIRBP dans la cellule diminue significativement dans les cellules infectées, ce qui est en accord avec la baisse d'expression de CIRBP observée en western blot dans la figure 2E de l'article [75].

Dans un premier temps, indépendamment du compartiment, on peut voir sur la figure 4.15 C que la quantité de CIRBP diminue en présence de l' siARN siCIRBP-CDS par rapport au contrôle, indiquant une inhibition globale de CIRBP dans les cellules NI comme infectées. On observe aussi une diminution de CIRBP dans des cellules NI en présence de l' siARN siCIRBP-201 par rapport au contrôle, mais pas dans les cellules infectées, où une légère hausse de l'expression est même visible, ce qui est attendu car c'est l'isoforme -210, non affectée par l' siARN contre -201, qui est majoritaire. Dans les cellules NI transfectées avec l' siARN siCIRBP-210, aucune baisse de l'expression de CIRBP n'est à observer, ce qui est en accord avec le fait que l'isoforme -210 est minoritaire dans les cellules NI. Toutefois, aucune baisse d'expression de CIRBP n'est détectée dans des cellules infectées en présence de l' siARN contre CIRBP-210, qui devrait pourtant être l'isoforme majoritaire. En résumé, les observations décrites ci-dessus valident dans cette expérience l'efficacité d'extinction par les siARN dirigés contre CIRBP-CDS et CIRBP-201, mais pas CIRBP-210.

En observant les répartitions d'expression de CIRBP dans les différents compartiments en fonction des conditions, il n'apparaît pas de relocalisation de CIRBP vers le cytoplasme ou vers le noyau, suggérant que la localisation de CIRBP n'est pas impliquée dans la régulation de la fonction de sa protéine au cours de l'infection. Cependant, cette

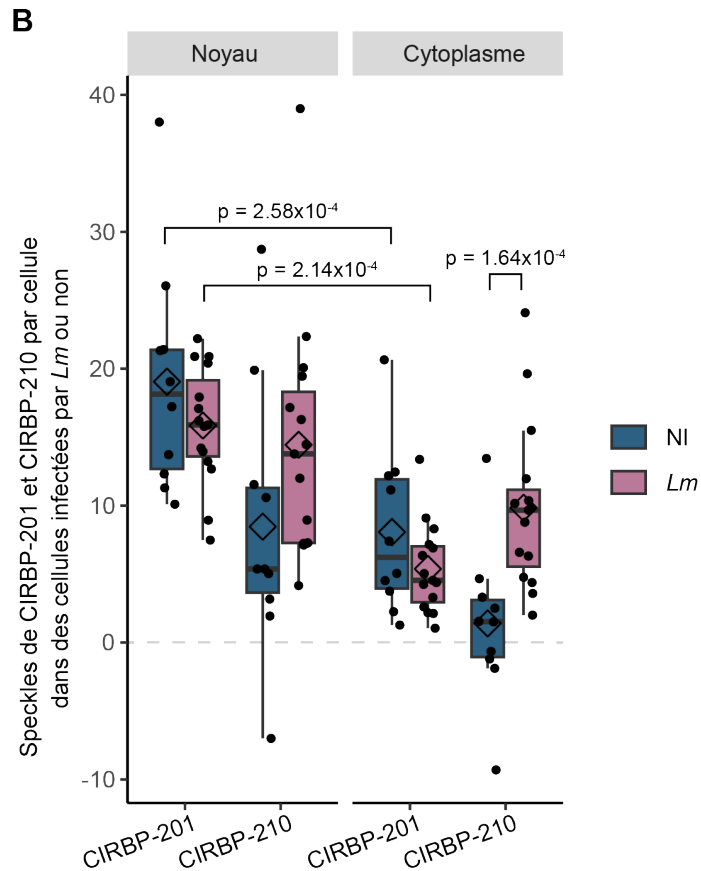
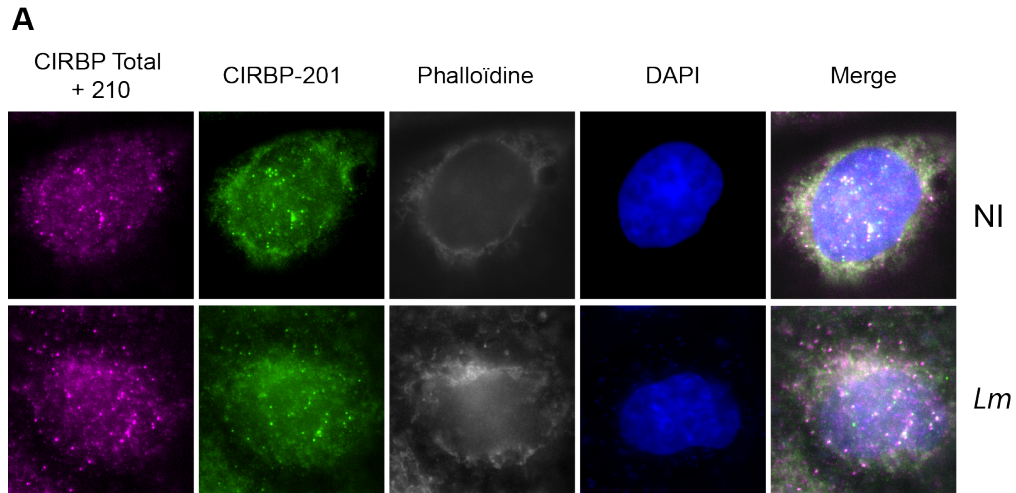


Figure 4.14: Localisation des isoformes de CIRBP dans des cellules infectées par *Lm*. Des cellules LoVo ont été infectées avec *Lm* pendant 10h. Les ARN CIRBP-201 et CIRBP-CDS + CIRBP-210 ont été spécifiquement marquées à l'aide de sondes fluorescentes en sm-FISH. (A) Cellules représentatives de la répartition des deux isoformes dans les conditions infectée et non infectée. Le panneau "Merge" correspond à la superposition des signaux.. (C) Quantification de signaux de foyers individuels par cellule pour chaque isoforme dans le noyau et le cytoplasme respectivement, dans les conditions infectées et non-infectées. Les moyennes de signaux individuels pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

analyse pourrait être affinée en déterminant si CIRBP est relocalisé à des MLO au cours de l'infection, comme des U-bodies ou des nSB. De même, il serait intéressant de pouvoir discriminer les deux isoformes protéiques de CIRBP, plutôt que de travailler avec des extinctions partielles, pour suivre précisément leur trafic au cours de l'infection par *Lm*. Enfin, comme le temps d'infection est assez long, et nous n'avons étudié la localisation de CIRBP qu'à 10h post-infection. Mais il serait envisageable de penser que la protéine CIRBP répond au stress avant le changement d'isoforme, il serait donc judicieux de déterminer sa localisation à des temps intermédiaires de l'infection.

4.8.4 Localisation cellulaire de la protéine CIRBP dans des cellules incubées avec de la LLO

J'ai mis en évidence [75] que la LLO seule suffisait à reproduire la régulation de l'épissage alternatif de CIRBP observée lors de l'infection par *Lm*, de façon plus rapide et franche en raison de la ponctualité du traitement par rapport à une accumulation progressive de toxine lors de l'infection, et en l'absence d'autres fluctuations de paramètres liés à l'infection. Pour affiner les résultats de localisation présentés dans le paragraphe précédent, l'expérience a été répétée en traitant les cellules avec de la LLO purifiée. La localisation de CIRBP a été ici observée d'une part par immunofluorescence et d'autre part par fractionnement des contenus protéiques cytoplasmiques et nucléaires suivi d'une immunodétection de CIRBP par western blot.

4.8.4.1 Répartition de CIRBP entre le cytoplasme et le noyau

4.8.4.1.1 Localisation de la protéine CIRBP dans des cellules en présence de LLO au cours du temps

Expériences réalisées par Anouk Viry d'octobre à décembre 2022, analyses des images réalisées par Anouk Viry et Morgane Corre

Pour avoir plus de précision sur la cinétique de re-localisation de CIRBP, les cellules ont été incubées avec de la LLO pour 0-15-30-45 et 60 min puis un marquage de CIRBP a été réalisé pour chaque point de temps. La proportion de CIRBP nucléaire / CIRBP cytoplasmique a ensuite été calculée (figure 4.16).

L'évolution du ratio CIRBP nucléaire / cytoplasmique au cours de l'incubation avec la LLO suggère d'abord une sortie de CIRBP dans le cytoplasme dans les temps précoces de l'incubation (jusqu'à 30 min). Après 30 min d'incubation, la protéine CIRBP se retrouve de nouveau adressée au noyau, soit par une inhibition de son export, soit par une activation de l'entrée. Dans la mesure où les isoformes -201 et -210 de CIRBP codent des protéines légèrement différentes avec un potentiel effet sur la localisation de la protéine, il serait, dans ce cas aussi, intéressant de développer un outil qui discriminerait les deux formes protéiques, pour précisément faire le lien entre changement d'isoforme et trafic de la protéine. Ces résultats suggèrent un rôle actif de CIRBP dans les temps intermédiaires de l'infection et sont en accord avec l'absence de relocalisation de CIRBP à 10h post-infection, puisque CIRBP y retrouve sa répartition initiale.

4.8.4.1.2 Immunodétection de CIRBP dans des extraits protéiques cytoplasmiques et nucléaires de cellules en présence de LLO.

Pour confirmer les résultats de la re-localisation transitoire de CIRBP vers le cytoplasme en présence de LLO, j'ai également séparé les protéines cytoplasmiques et nucléaires de cellules incubées pendant 0, 30 et 60 min avec de la LLO (figure 4.17 A). En parallèle, j'ai aussi regardé la quantité totale de CIRBP dans des cellules contrôle et incubées pendant 60 min avec de la LLO (figure 4.17 B). J'ai ensuite vérifié la qualité du fractionnement à l'aide d'un marqueur nucléaire (la fibrillarine) et un marqueur cytoplasmique (la β -tubuline) et quantifié les intensités normalisées des bandes correspondants à CIRBP (figure 4.17 C). Dans le noyau, l'intensité de CIRBP diminue, en accord avec la baisse générale de CIRBP observée au cours de l'infection et de l'incubation générale avec la LLO. Dans le cytoplasme en revanche, on observe un pic à 30 min qui redescend rapidement à 60 min, en accord avec les résultats d'immunofluorescence. Ainsi, les expériences d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaires suggèrent fortement que CIRBP est relocalisé dans les temps précoces d'exposition des cellules à la LLO, et retourne et reste dans le noyau, ce qui doit moduler la capacité de CIRBP d'interagir avec ses cibles et de les réguler.

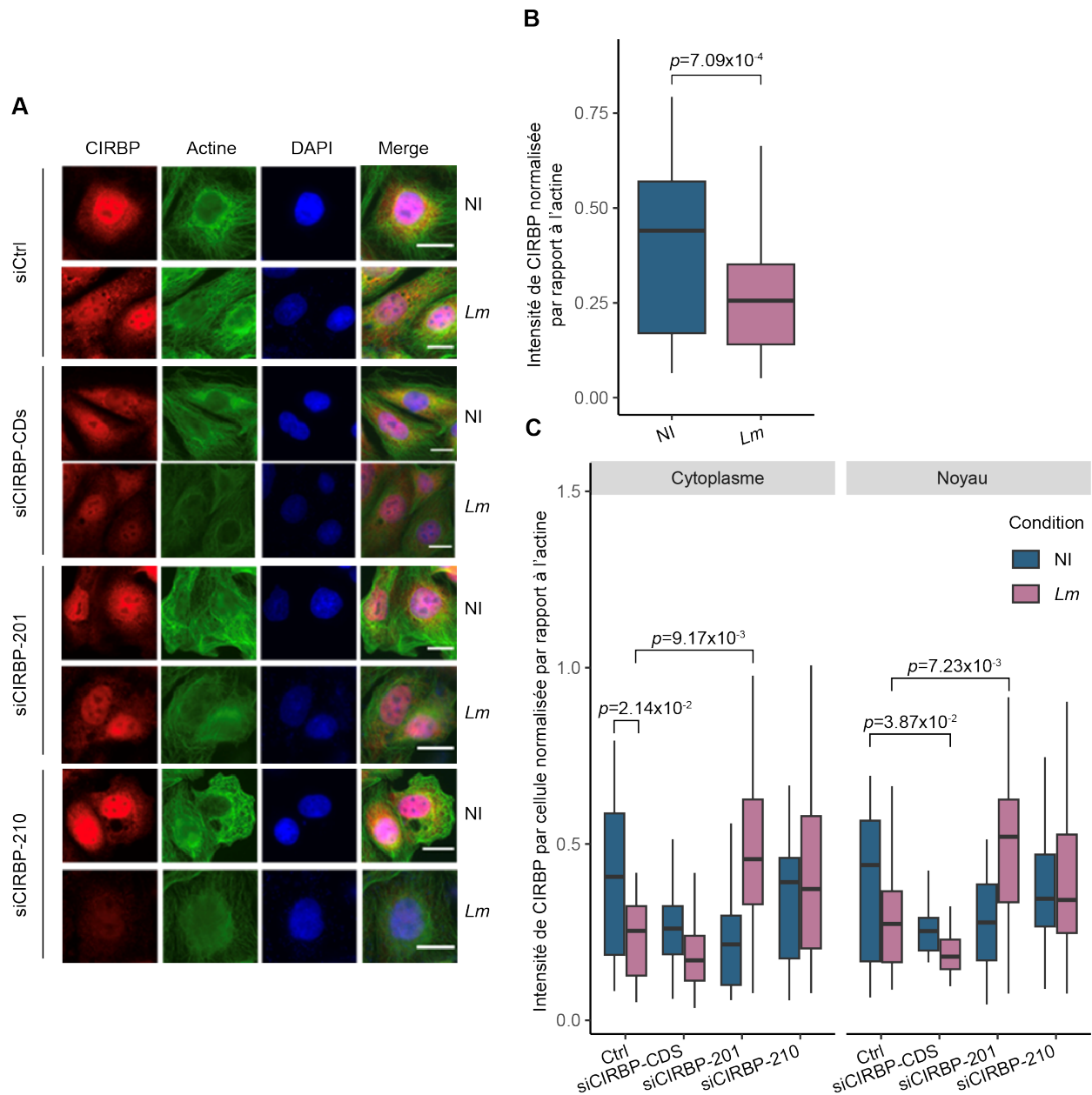


Figure 4.15: Localisation cellulaire de la protéine CIRBP et de ses isoformes dans des cellules infectées par *Lm*. Des cellules LoVo ont été transfectées avec des siARN contre CIRBP (siCIRBP CDS) ou ses isoformes (siCIRBP-201 et si-CIRBP-210), et infectées avec *Lm* pendant 10h. La protéine CIRBP a été marquée par immunofluorescence. (A) Cellules représentatives de la répartition de CIRBP dans les différentes conditions infectée et non infectée. Le panneau "Merge" correspond à la superposition des signaux. (B) Quantification de l'intensité de CIRBP dans des cellules transfectées avec un siARN contrôlé dans les conditions infectées et non-infectées. (C) Quantification de l'intensité de CIRBP par cellule dans le cytoplasme et le noyau respectivement, dans les conditions infectées et non-infectées, et normalisée par rapport à l'actine. Les moyennes des intensités et des signaux individuels pour chaque condition ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

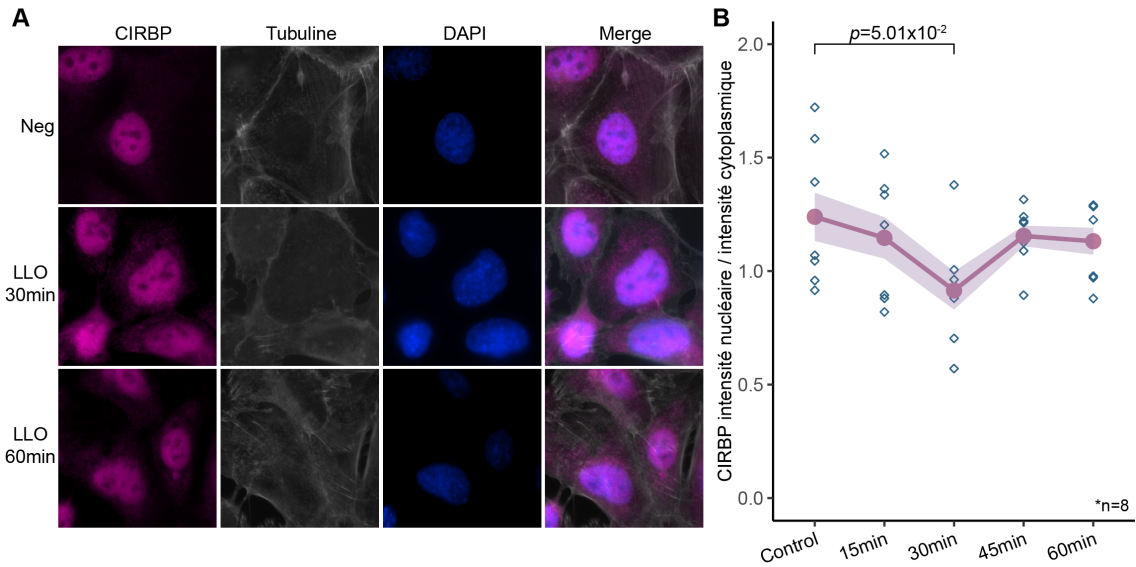


Figure 4.16: Localisation de CIRBP en présence de LLO. Des cellules LoVo ont été incubées pendant 15, 30, 45 et 60 min avec de la LLO. La protéine CIRBP a été marquée par immunofluorescence. (A) Cellules représentatives de la répartition de CIRBP dans des cellules contrôles non-traitées et traitées 30 et 60 min avec de la LLO. Le panneau "Merge" correspond à la superposition des signaux. (B) Evolution de la localisation de CIRBP au cours du temps. Les intensités cytoplasmique et nucléaire ont été quantifiées et le ratio de CIRBP nucléaire / cytoplasmique a été calculé pour chaque point de temps. Les moyennes de ratios pour chaque point de temps ont été comparées à l'aide d'un test statistique one-way ANOVA corrigé par un test post-hoc de Tukey.

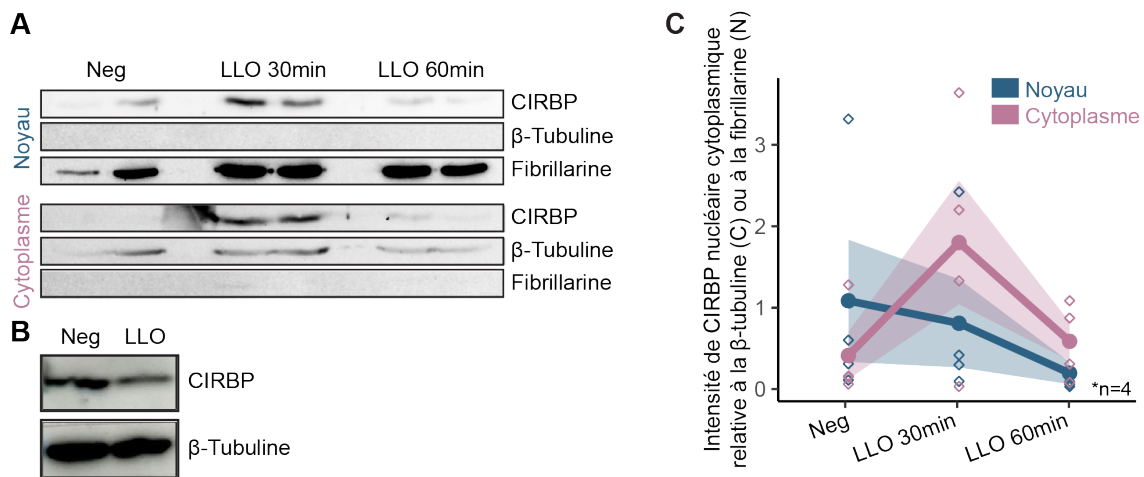


Figure 4.17: Détection de CIRBP dans les fractions cytoplasmique et nucléaire de cellules en présence de LLO. Des cellules LoVo ont été incubées pendant 30 et 60 min avec de la LLO. Les cellules ont été lysées et les fractions protéiques nucléaire et cytoplasmique ont été séparées. (A) La quantité de CIRBP dans ces deux compartiments a été définie par immunodétection de CIRBP. (B) La quantité de CIRBP total a été définie par immunodétection, sans séparation des fractions. (C) Les intensités des bandes de (A) ont été calculées et normalisées par l'intensité du témoin de charge correspondant (fibrillarine pour la fraction nucléaire (N) ou β -tubuline pour la fraction cytoplasmique (C)) et représentées en fonction du temps.

4.8.4.2 CIRBP comme protéine extracellulaire

Outre de son action de régulation de la traduction et de la stabilité de ses ARN cibles, une forme extracellulaire de CIRBP (eCIRBP) a été décrite pour son rôle de DAMP, dont la libération dans le milieu extracellulaire était

un signal de dommages aux tissus. [413]. Il a été montré que l'interaction entre eCIRBP et le récepteur TLR4 à la surface des cellules immunitaires induisait une activation de NF- κ B et la sécrétion de cytokine inflammatoires [414,556]. Dans les neutrophiles, eCIRBP active la voie de mort cellulaire dite NETose [488], qui permet de piéger des agents infectieux (comme des bactéries) dans le milieu extracellulaire à l'aide de filaments de chromatine (Neutrophil extracellular traps, NET) et de ralentir l'invasion [557]. Dans des cellules endothéliales, eCIRBP a été décrit pour induire la pyroptose *via* l'activation de l'inflammasome [420]. La pyroptose est aussi un type de mort cellulaire programmée décrit pour contrer les infections bactériennes, comme synthétisé ici [558]. Ainsi, il serait légitime de regarder si CIRBP se retrouve dans le milieu extracellulaire au cours de l'infection.

Pour cela, j'ai incubé des cellules LoVo avec de la LLO pendant 30 min et 1h. J'ai aussi réalisé cette expérience avec des cellules THP-1 activées au PMA, en m'attendant à y observer une sortie plus importante de CIRBP si celui-ci était bien extracellulaire, car la réponse de la régulation de CIRBP était plus marquée dans les THP-1 que dans les cellules LoVo. De même, eCIRBP a essentiellement été décrit dans des modèles de cellules immunitaires [413] J'ai ensuite précipité les protéines du surnageant et j'ai détecté CIRBP par western blot (figure 4.18). **Ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être reproduits avant d'être validés.**

Si de très faibles bandes correspondant à CIRBP sont décelables dans le surnageant des cellules LoVo incubées avec de la LLO (30 et 60 min), le résultat est beaucoup plus net pour le surnageant des cellules THP-1. Pour ces dernières, on peut observer eCIRBP même dans la condition contrôle, puis sa quantité augmente pour les cellules incubées pendant 60 min avec de la LLO, indiquant une augmentation tangible de CIRBP dans le milieu de culture. La coloration au rouge Ponceau indique que le puits "LLO 30 min" est moins chargé en protéines que les autres (environ de moitié), ce qui masque probablement la libération d'eCIRBP à 30 min celle des cellules contrôles. Ainsi, il semblerait que eCIRBP augmente dans le surnageant des cellules lors de la mise en contact avec la LLO, ce qui pourrait annoncer une réponse pro-inflammatoire sous-jacente induite par eCIRBP.

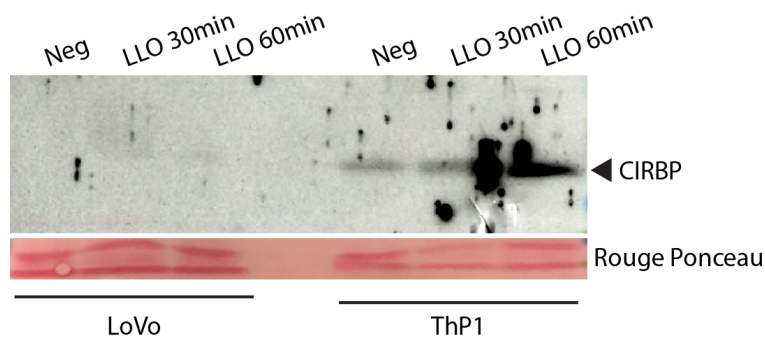


Figure 4.18: Détection de CIRBP dans le surnageants de cellules LoVo et THP-1 incubées avec de la LLO. Des cellules LoVo et THP-1 activées au PMA ont été incubées pendant 30 et 60 min avec de la LLO. Le surnageant des cellules a été recueilli pour en précipiter les protéines. La présence de CIRBP dans le surnageant a été testée par immunodétection avec un anticorps anti-CIRBP. La coloration de la membrane au rouge ponceau avant l'incubation avec l'anticorps primaire fait office de témoin de charge.

Pour approfondir la question de la présence de CIRBP dans le surnageant des cellules, il serait important de déterminer si CIRBP est sécrété activement ou si la protéine est relarguée à cause de la mort des cellules perméabilisées par la LLO. Enfin, pour un futur projet, il serait intéressant de vérifier si (i) CIRBP se lie aux récepteurs TLR4 en condition d'infection et (ii) quelles seraient les conséquences d'une telle interaction sur l'issue de l'infection.

5 Discussion

Table des matières

5.1	Résumé de l'article Corre <i>et al.</i> , 2023	152
5.2	Compléter la caractérisation de la régulation de CIRBP dans le contexte d'infection bactérienne	152
5.2.1	Régulation de CIRBP par la reconnaissance de la perturbation de la membrane par la LLO	152
5.2.2	Quels sont les facteurs d'épissage à l'origine de la régulation de CIRBP ?	153
5.3	Approfondir les rôles de CIRBP pour mieux cerner son importance	157
5.3.1	Généralisation de la réponse CIRBP au-delà des cellules LoVo	157
5.3.2	Comment CIRBP impacte-t-il la progression de l'infection ?	157
5.3.3	Quelles sont les différences d'activité des isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210 ?	158
5.4	Optimiser les outils d'identification des événements d'épissage alternatif	160
5.4.1	Tirer le meilleur des lectures longues	160
5.4.2	Les lectures courtes à la rescousse	161

Dans cette section, il m'importe de prendre du recul sur les résultats que j'ai généré au cours de ma thèse, afin de les replacer plus largement dans le contexte de ce que l'on connaît aujourd'hui des réponses de l'hôte aux infections bactériennes. Les résultats principaux sont déjà discutés dans l'[article](#) [75] et seront résumés dans le paragraphe suivant.

5.1 Résumé de l'article Corre *et al.*, 2023

En résumé de la discussion de l'article, nous revenons sur le fait que ce travail a permis de placer CIRBP comme un acteur central de la réponse à *Lm* suite aux dommages causés par la LLO, concept que j'ai pu étendre à une réponse au stress généré par d'autres cytolysines. J'ai aussi confirmé la régulation de CIRBP par CLK1, comme déjà observé dans le cas du stress chaud [197] et j'ai complété la voie de régulation en amont de CLK1, en démontrant que c'était la perturbation des flux ioniques à travers la membrane qui précédait la régulation induite par CLK1. Toutefois, le signal précis senti par la cellule pour induire la voie de régulation par CIRBP reste inconnu. En réponse à la perte d'activité kinase de CLK1 induite par la LLO, j'ai observé la perte de phosphorylation des protéines cibles SRSF, ce qui réoriente alors l'épissage alternatif des transcrits cibles des SRSF, dont les SRSF eux-mêmes, CLK1 et CIRBP. Sur les 12 SRSF, il reste à déterminer le ou lesquels de ces facteurs sont spécifiquement impliqués dans la régulation de l'épissage de CIRBP.

L'absence du codon codant la thréonine 169 de la protéine canonique de CIRBP dans le produit de CIRBP-210 est aussi potentiellement importante pour la régulation fonctionnelle de CIRBP, dans la mesure où cette thréonine pourrait être impliquée dans la relocalisation de CIRBP, gouvernant ainsi ses actions. Pouvoir discriminer les deux isoformes protéiques serait alors précieux préciser la voie de régulation de CIRBP au cours de l'infection. En plus de coder des protéines différentes, les isoformes de CIRBP ont aussi un rôle opposé sur le contrôle de la progression de l'infection, où l'isoforme canonique CIRBP-201 joue un rôle pro-bactérien, contrairement à l'isoforme instable CIRBP-210, donc l'inhibition révèle ses fonctions antibactériennes. Ces résultats résonnent avec le rôle proviral de CIRBP décrit dans l'article de Gokhale *et al.* [318]. La protéine CIRBP étant très conservée, il serait alors envisageable que sa régulation en présence de pathogènes soit un mécanisme central de la réponse anti-infectieuse. Il serait pertinent évaluer à l'avenir si ce postulat peut être généralisé d'autres cas de figures.

5.2 Compléter la caractérisation de la régulation de CIRBP dans le contexte d'infection bactérienne

Au cours de ma thèse, j'ai donc mis à jour une voie de régulation de CIRBP qui implique la perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique par la LLO, ce qui amène à une inhibition de l'activité kinase de CLK1 et à la perte de phosphorylation des protéines SRSF, ce qui influencerait alors l'épissage de CIRBP en faveur de CIRBP-210. Cependant, il manque encore des éléments qui permettraient la caractérisation complète de cette voie.

5.2.1 Régulation de CIRBP par la reconnaissance de la perturbation de la membrane par la LLO

5.2.1.1 Détection des efflux de potassium comme un signal de stress

Dans un premier temps, j'ai observé que la concentration de potassium, mais pas de calcium qui induisait un changement d'isoforme de CIRBP. Une concentration élevée en potassium du milieu induit l'épissage de CIRBP en faveur de l'isoforme 210 alors que la déplétion du milieu en potassium induit la stabilisation de CIRBP-201, indiquant que la perturbation des gradients de cations serait centrale au déclenchement de la cascade de régulation. Cependant, il reste à savoir quel signal est senti par la cellule : est-ce l'accumulation LLO-dépendante d'ions potassium dans le milieu extra-cellulaire ? Est-ce une perturbation du potentiel de membrane ? Comme, lors de la préparation du milieu de saturation, j'ai ajusté la concentration en sodium au profit du potassium pour conserver un milieu isotonique, il est aussi envisageable que les ions sodium soient aussi impliqués, ce qui plaiderait alors pour une perturbation du potentiel de membrane, gouverné par le sodium et le potassium. Malheureusement, je me suis retrouvée techniquement limitée pour tester ces hypothèses. En effet, il n'est pas possible d'inhiber spécifiquement l'efflux potassique tout en conservant l'activité cytolitique de la LLO, mais peut-être serait-il possible de tester l'impact de la LLO sur le potentiel de membrane, ou spécifiquement perturber ce dernier, avec des composés comme la nigéricine [559] et observer l'effet sur la régulation de CIRBP. Bien que ces expériences ne prouveraient pas que ce soit la perturbation du potentiel de membrane par la LLO qui induisent le changement d'isoforme de CIRBP, elles permettraient de favoriser cette hypothèse sur celle de la détection d'une concentration extracellulaire trop élevée en ions potassiques.

5.2.1.2 Inhibition de l'activité de CLK1 en réponse à la LLO : l'hypothèse AKT

Une autre interrogation est de déterminer comment CLK1 sent la perturbation de la membrane plasmique. Il est envisageable de penser qu'un acteur intermédiaire médie la régulation de CLK1. En effet, l'activité kinase de CLK1 est elle-même régulée par phosphorylation, notamment par autophosphorylation. En parallèle, il a été décrit que CLK1 peut être phosphorylée par AKT, en condition de stress métabolique [560,229] : en réponse à l'insuline, AKT va être phosphorylée et va à son tour phosphoryler CLK1, qui phosphoryle alors les protéines SRSF. AKT est aussi affectée par le potentiel de membrane car, en réponse à l'ischémie/reperfusion, la perte de la polarisation de la membrane par la fermeture des canaux potassiques induit une hausse de la phosphorylation d'AKT [561]. En réponse à l'infection par *Lm*, bien qu'InIB induise l'activation par phosphorylation de AKT dans des cellules intestinales [562] et que cette activation de AKT soit favorable à l'invasion [563], il a aussi été montré que la LLO inhibait la phosphorylation de AKT [564]. A la lumière de ces éléments, il serait donc envisageable que la déphosphorylation de AKT induite par la LLO, peut-être en réponse à la perturbation de la membrane, serait le maillon manquant en amont de la déphosphorylation de CLK1. Cette hypothèse pourrait expliquer la plus forte régulation de CIRBP en réponse à la LLO purifiée qu'à l'infection par *Lm*, car lors de l'infection, l'action de la LLO sur AKT pourrait contrecarrer celle de InIB, moins marquée et plus précoce. Ainsi, on peut imaginer que l'activation de AKT est variable au fil de l'infection, initialement phosphorylé en réponse à InIB dans les débuts de l'infection, puis déphosphorylé par la LLO lorsque l'infection se prolonge, induisant alors la cascade de déphosphorylation aboutissant au changement d'isoforme de CIRBP. Dans la mesure où AKT a aussi été décrite pour phosphoryler les protéines SRSF en complément de CLK1 [560], cette kinase participe peut-être à plusieurs niveaux à la régulation de l'épissage lors de l'infection. En résumé, préciser l'activation d'AKT et son impact sur CLK1 et les SRSF en condition d'incubation avec la LLO et d'infection avec *Lm* serait une piste très intéressante pour compléter la caractérisation de la voie de régulation de CIRBP.

5.2.2 Quels sont les facteurs d'épissage à l'origine de la régulation de CIRBP ?

Dans la figure S5 de l'article [75], nous montrons que 9 SRSF sont régulés par épissage alternatif, le plus souvent en faveur d'isoformes poisons, conduisant à une baisse de leur expression. De plus, dans la figure 4C et dans les annexes, nous observons aussi la déphosphorylation de plusieurs SRSF, indiquant ici aussi une altération de leur fonction. Dans le cas de la caractérisation de la régulation de CIRBP, il serait pertinent de déterminer quel(s) SRSF influe(nt) sur son épissage, ainsi que l'état de phosphorylation de ce dernier qui induirait un épissage alternatif de CIRBP. Par exemple, chez la souris, CIRBP est régulé par SRSF3 et SRSF7: des inhibitions de ces facteurs induisent respectivement une augmentation et une baisse de l'expression générale de CIRBP, suggérant que ces SRSF influent sur l'épissage alternatif et la stabilité générale des transcrits de CIRBP [565].

Bien que, par la mise en lumière de CLK1, je me suis essentiellement concentrée sur les SRSF, ce ne sont pas les seuls facteurs d'épissage qui pourraient influencer celui de CIRBP. Par exemple, il est tout à fait envisageable que l'exclusion de l'exon 7a de CIRBP-201 au profit de l'exon 7b de CIRBP-210 soit modulé par des hnRNP, dont le rôle est décrit dans l'introduction (paragraphe 3.2.3.2.1).

Précisément déterminer l'ensemble des facteurs de régulation de l'épissage de CIRBP nécessiterait la purification spécifiques des ARN de CIRBP et de leur facteurs associés, par exemple par expression ectopique d'ARN de CIRBP dans lesquels on aurait inséré un aptamère, qui est par la suite spécifiquement purifié. Les protéines associées seraient ensuite identifiées par spectrométrie de masse [566].

5.2.2.1 Une régulation de l'épissage alternatif, au-delà de CLK1 ?

Bien que nous ayons établi l'importance de CLK1 dans le contrôle de CIRBP, d'autres facteurs pourraient aussi intervenir. Par exemple, il a été décrit que la protéine PTBP1 pouvait induire la dissociation de UPF1 de ses ARNm cibles, les protégeant ainsi de la dégradation par le NMD [567,568]. De plus, la protéine hnRNP L aurait des effets similaires [569]. De manière intéressante, l'inhibition de hnRNP L induit une augmentation statistiquement significative de CIRBP-201, indiquant peut-être que hnRNP L stabilise d'autres isoformes de CIRBP; leur dégradation suite à l'inhibition de hnRNP L favoriserait alors l'expression de CIRBP-201. Une étude suggère aussi que l'infection par *Lm* induit l'expression de hnRNP L [570]. En revanche, CIRBP ne semble pas être cible de PTBP1. Au cours de mes travaux, j'ai pu vérifié que l'inhibition de PTBP1 n'avait pas d'effet sur l'expression de CIRBP-210. En

résumé, étudier hnRNP L dans la régulation des gènes de l'hôte, dont CIRBP, serait une piste intéressante, car son activité de protection contre le NMD pourrait être une des raisons pour laquelle certains transcrits cibles du NMD sont spécifiquement stabilisés au cours de l'infection, alors que le NMD est toujours fonctionnel.

Similairement à CLK1, SRPK1 est aussi impliquée dans la régulation de l'épissage, notamment en phosphorylant les SRSF et en modulant l'activité de CLK1. Il existe déjà un lien entre SRPK1 et CIRBP, où la kinase phosphoryle la protéine CIRBP et conditionne ainsi son import nucléaire [571], mais rien n'est connu sur la régulation de l'ARNm de CIRBP par SRPK1. Cependant, cette kinase est aussi fortement impliquée dans la régulation de l'épissage en réponse au stress chaud, dont la réponse ressemble beaucoup à celle de l'infection par *Lm*, et mériterait donc d'être étudiée dans ce contexte. Par exemple, comparer les gènes affectés par l'AS au cours de l'infection par *Lm* aux cibles connues de SRPK1 pourrait nous renseigner sur un potentiel rôle dans le contrôle de l'épissage au cours de l'infection.

5.2.2.2 Mécanismes alternatifs de régulation de l'expression des isoformes de CIRBP

5.2.2.2.1 Contribution du NMD et de l'ISR

Bien que la voie LLO – perturbation de la membrane – CLK1 – SRSF ait été mise à jour comme la voie centrale de régulation de CIRBP au cours de l'infection, il se pourrait que des mécanismes annexes régulent aussi l'épissage de ce transcrit. En effet, *Lm* peut induire l'UPR et plus généralement l'ISR par divers moyens. L'une des conséquences de l'activation de l'UPR peut être un remaniement de l'épissage alternatif, comme décrit dans cet article [572], mais aussi une inhibition du NMD. Toutefois, dans nos conditions, il semblerait que l'épissage alternatif soit le mécanisme prédominant dans cette régulation, car autant d'isoformes NMD-sensibles sont sur-régulées que sous-régulées (figure S3 de l'article [75]). Cependant, il n'est pas à exclure que l'activation de l'ISR au cours de l'infection par *Lm* peut aussi avoir un impact, bien que moindre et pas encore caractériser, sur l'épissage alternatif de certains gènes de l'hôte.

5.2.2.2.2 Modulation de l'expression des transcrits de CIRBP par miARN

Outre la dégradation des ARNm par le NMD, il existe d'autres moyens de moduler leur stabilité et traduction. Au cours de l'infection par *Lm* il a été montré une modification de l'expression de certains microARN, comme résumé dans [573], qui modulent notamment la survie cellulaire et la réponse inflammatoire. Pour rappel, les miARN régulent l'expression de leur cible en s'hybridant à un court motif et induisent la répression de l'expression du gène cible. Dans la littérature, il est décrit que le miARN-23a est impliqué dans la survie bactérienne au cours de l'infection par *Lm* dans des cellules hépatiques [574], mais aussi dans la survie cellulaire de lymphocytes T [575] dans les mêmes conditions. Or, il se trouve aussi que l'expression de CIRBP est positivement régulée par le miARN-23a, en réponse à l'hypoxie [432]. Ainsi, il est envisageable que l'expression de CIRBP soit partiellement modulée par le miARN-23a à un moment de l'infection et les effets observés de miARN-23a sur l'infection pourraient être partiellement médiés par les activités pro-bactériennes de CIRBP. A noter toutefois que CIRBP n'est pas une cible de miARN-23a, mais est seulement positivement régulé en sa présence, suggérant que miARN-23a impacterait l'expression d'un antagoniste de l'expression de CIRBP.

Si l'on entre les séquences de CIRBP-201 et CIRBP-210 respectivement dans l'outil de recherche de séquence miARN de la base de données mirbase.org, on observe que ces derniers comportent, dans leurs 3'-UTR respectifs, des motifs de liaisons de miARN différents. Ainsi, il serait possible que la stabilité des isoformes soit régulée par des miARN qui leur sont propre. Toutefois, les miARN concernés (*hsa-miR-6813-5p* pour CIRBP-201) et (*hsa-miR-4298* pour CIRBP-210) n'ont à ce jour pas été décrits comme différentiellement exprimés dans le contexte de l'infection par *Lm*.

5.2.2.2.3 Modulation de l'expression des transcrits de CIRBP par méthylation de l'ARNm

Comme décrit dans l'article de Gokhale *et al.*, [318], l'expression des ARNm de CIRBP peut aussi être régulée par méthylation. En effet, en condition d'infection par des *Flaviridae*, le pré-ARNm de CIRBP va perdre une marque de méthylation vers la fin de l'exon 6, commun aux isoformes CIRBP-201, -210 et -225, ce qui induit la réduction de l'expression de l'isoforme CIRBP-225, pour lequel l'intron 7 n'a pas été épissé. L'isoforme -225 code

une protéine de 297 résidus peu traduite (contre 172 pour CIRBP-201). Dans ce contexte, CIRBP-201 comme -225 semblent pro-infectieux, puisque leur inhibition respective réduit la charge virale des cellules. Ce résultat fortifie notre observation concernant l'effet pro-bactérien de CIRBP-201, et renforce l'idée que favoriser l'isoforme instable CIRBP-210 est bénéfique à la cellule pour contrôler l'infection. Étonnamment, dans ce jeu de données, un autre changement de méthylation statistiquement significatif de CIRBP est indiqué dans les résultats supplémentaires, mais n'a pas été exploité. Il s'agit d'une région de 475 bp allant de la position 1 274 436 à la position 1 274 910 sur le chromosome 19 et qui correspond au début de l'intron 7 de CIRBP-210. Cette marque de méthylation est aussi perdue au cours de l'infection virale, indiquant une possible conséquence sur l'expression de CIRBP-210 aussi. En continuité de cette étude, nous pourrions aussi déterminer si une méthylation différentielle à ces sites contribue à la modulation de l'épissage de CIRBP observée lors de l'infection par *Lm*.

5.2.2.2.4 CIRBP et ses 46 isoformes

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, l'isoforme CIRBP-225 serait régulée en réponse à l'infection virale. Si, pour des raisons pratiques, je me suis exclusivement concentrée sur les isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210, qui apparaissent comme majoritaires dans les cellules LoVo, ce ne sont pas les seules à être exprimées. En effet, j'observe aussi l'isoforme CIRBP-225, qui code une protéine beaucoup plus longue que la protéine canonique, mais aussi CIRBP-222 par exemple, qui est une version stable de CIRBP-210 et peut donc être efficacement traduite. Si CIRBP-222 reste trop peu exprimée pour avoir un effet fort sur le contrôle de l'infection, elle pourrait tout de même participer à la production de la version CIRBP-210 de la protéine. Concernant CIRBP-225, j'ai quantifié que, si dans les cellules non-infectées, il représentait moins de 8% des transcrits totaux de CIRBP, sa proportion montait à plus de 20% dans les cellules infectées, ce qui indique que l'expression différentielle de cet isoforme pourrait être impliquée dans la régulation de CIRBP lors de l'infection. Étonnamment, malgré une forte hausse en de la quantité de transcrits de CIRBP-225, le taux de protéine semble constant (figure 5.1), ce qui est pourrait être due au fait qu'il soit traduit de manière peu efficace. Si au moins ces deux autres isoformes pourraient jouer un rôle dans la contrôle de l'infection par CIRBP, il en existe 46 versions possibles dans la base de données [ENSEMBL](#). Peut-être serait-il pertinent d'identifier précisément quelles sont celles exprimées dans les cellules LoVo, et quel serait leur impact sur l'infection et l'expression globale de CIRBP.

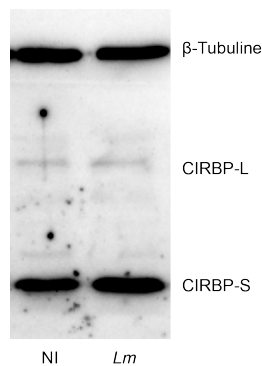


Figure 5.1: Isoformes protéiques de CIRBP. Détection des isoformes protéiques de CIRBP longue (CIRBP-L) et courte (CIRBP-S) dans des cellules non-infectées et infectées avec *Lm*.

5.2.2.2.5 Régulation de la localisation de CIRBP dans des MLO

La régulation de l'épissage n'est pas le seul moyen de contrôler l'activité de CIRBP, une autre manière est de séquestrer CIRBP dans des MLO. En effet, CIRBP a déjà été détecté dans différents types de MLO, comme les granules de stress [289], où il participe à la répression de la traduction de transcrits cibles. Des expériences complémentaires d'immunofluorescences ont été réalisées par Ania Kurowska lors de son stage de M1, pour tester la formation de SG dans des cellules LoVo à l'aide d'un anticorps anti-TIAR, un marqueur central des granules de stress, et nous n'avons pas observé la formation de SG (résultats non présentés), suggérant que *Lm* n'induit pas la formation de granules de stress. La capacité des cellules LoVo à former des SG avait été validée en les incubant avec de l'arsenic, un fort activateur de leur formation. Cependant, l'article de De Leeuw [289] décrit aussi que CIRBP est

recruté aux SG indépendamment de TIAR; il serait donc plus pertinent d'utiliser un marqueur additionnel des SG, comme G3BP1, pour s'assurer de leur absence dans des cellules infectées. Cette même étude induit la formation des SG avec de l'arsenic, qui génère un stress intense. Peut-être donc que nous n'avons pas observé de SG dans nos cellules infectées par *Lm* car l'infection n'occasionne pas un stress suffisant pour les induire. Dans ce cas, il serait intéressant de répéter l'expérience avec de la LLO purifiée, plus efficace dans l'induction du stress que l'infection. D'autres MLO pourraient être aussi intéressantes à étudier dans le contexte de la régulation de CIRBP au cours de l'infection par *Lm*. L'article de Tsalikis [111] décrit la formation des U-bodies au cours de l'infection, qui interfèrent avec la maturation du spliceosome. Leur formation pourrait avoir un effet sur l'épissage de différents gènes *via* la séquestration de snRNP-U. Parmi eux, CIRBP pourrait être affecté. Enfin, une autre MLO serait aussi intéressante à étudier. En 2020, l'équipe de Tetsuro Hirose décrit la formation des nSB-HSATIII dépendantes au cours du stress chaud. Une analyse de spectrométrie de masse a identifié la protéine CIRBP comme étant recrutée aux nSB [156]. Les nSB servent de plateforme de régulation de l'expression des gènes, notamment par le recrutement de CLK1 et la phosphorylation de SRSF9 après la levée du stress, qui induit une augmentation de la rétention d'introns, notamment de CLK1 elle-même. Malheureusement, l'article ne donne pas accès à la liste des gènes affectés par ces rétentions d'introns; il n'est donc pas clair si l'ARNm de CIRBP est aussi recruté aux nSB. Toutefois, nous avons déjà montré de nombreuses similitudes entre la réponse au stress chaud et à l'infection par *Lm*, comme la perte d'activité kinase de CLK1, la déphosphorylation des SRSF et bien sûr l'épissage alternatif de CIRBP. Ainsi, il serait envisageable que de telles structures nucléaires soient aussi formées au cours de l'infection et qu'elles servent de plateforme de régulation de l'épissage à de nombreux gènes, dont peut-être CIRBP. De même, peut-être que la protéine CIRBP elle-même joue un rôle dans la formation des nSB ou dans le contrôle de l'expression des transcrits cibles dans les nSB. Il serait donc très intéressant d'étudier (i) la formation des nSB en infection par *Lm*, par exemple en marquant HSATIII, son composant principal et (ii) si CIRBP, ARN comme protéine, y est localisé, ce qui permettrait de compléter la caractérisation de ses fonctions et/ou de sa régulation.

5.2.2.2.6 Autres effecteurs bactériens de la modulation de l'épissage de CIRBP

Bien que nous ayons déterminé que la LLO était le principal facteur de virulence impliqué dans la régulation de l'épissage de CIRBP, peut-être n'est-il pas le seul facteur à induire des changements d'isoformes. Récemment, il a été décrit que le facteur de virulence InIP pouvait induire la séquestration de RBM5, une protéine régulatrice de l'épissage, dans des granules nucléaires, inhibant ainsi son action [114]. Ce mécanisme pourrait donc avoir des conséquences sur l'épissage des cibles de RBM5 [576].

Lorsque j'ai testé la régulation de CIRBP en réponse à des infections avec plusieurs souches de bactéries, j'ai identifié *E. coli*, *E. faecalis* et *S. epidermidis* comme pouvant aussi induire le changement d'isoforme de CIRBP. Bien que *E. coli* et *E. faecalis* sécrètent des cytolysines, ce n'est pas le cas pour *S. epidermidis*. Pour valider le changement d'isoforme de CIRBP en réponse aux deux bactéries extracellulaires qui produisent une cytolysine, il serait intéressant de purifier les cytolysines, comme ceci a été fait pour la LLO, et de tester son effet en incubant des cellules avec, ainsi que d'infecter des cellules avec des mutants défectueux pour l'expression des cytolysines. Si les résultats obtenus dans ces conditions récapitulent ceux obtenus avec *Lm* et la LLO, alors la régulation de CIRBP pourra être généralisée à ces espèces. Si non, alors il se pourrait que ce soit la croissance des bactéries dans le milieu de culture cellulaire qui aurait généré un stress (métabolique ?) à l'origine du changement d'isoforme de CIRBP. Pour identifier les effecteurs impliqués dans le cas de *S. epidermidis*, il faudrait cribler des mutants pour les facteurs de virulence de la bactérie, dans le but d'identifier celui ou ceux à l'origine du changement d'isoforme et donc peut-être de découvrir d'autres facteurs bactériens capables d'induire une régulation de l'épissage alternatif.

Inversement, pour documenter plus largement l'implication des cytolysines dans la régulation de CIRBP, il serait aussi intéressant de déterminer si les espèces dont j'ai purifié les cytolysines utilisées dans la figure 3D (*Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae* et *Aeromonas hydrophila*) induisent aussi un changement d'isoforme de CIRBP en condition d'infection. En effet, on pourrait imaginer que, similairement à ce qui est décrit pour les *Flaviridae* [318], un autre mécanisme favorise l'expression de CIRBP-201, et vienne donc concurrencer l'épissage de CIRBP en faveur de l'isoforme -210. Ceci indiquerait alors que la réponse d'épissage de CIRBP en faveur de l'isoforme instable, bien que dépendante de l'activité des cytolysines, ne serait pas généralisable à toutes les bactéries porteuses d'une telle toxine. En résumé, caractériser et valider la régulation de CIRBP dans des contextes d'infection avec plus de bactéries pourrait généraliser ou non le modèle proposé et permettrait potentiellement d'aborder la régulation de CIRBP d'un point de vue thérapeutique, dans le but de lutter contre la progression des

infections bactériennes.

5.3 Approfondir les rôles de CIRBP pour mieux cerner son importance

5.3.1 Généralisation de la réponse CIRBP au-delà des cellules LoVo

Pour conforter le modèle de régulation et de réponse de CIRBP à l'infection par *Lm*, j'ai déterminé si ce mécanisme pouvait être observé dans d'autres lignées cellulaires. Je l'ai donc caractérisé dans 3 lignées de cellules adhérentes (Hela, A549 et Caco2) infectées avec *Lm*. Bien que les résultats obtenus tendent en faveur d'une réponse générale, les variations expérimentales n'ont pas permis de valider la régulation de CIRBP dans ces trois lignées. Si cette expérience était à refaire, j'incuberais ces lignées directement avec de la LLO, qui donne des résultats plus reproductibles, mais à l'époque de ces expériences, je n'avais pas encore identifié la LLO comme le facteur responsable du changement d'isoforme de CIRBP. Il se trouve aussi que ni les Hela, qui sont des cellules utérines, ni les A549, qui sont des cellules pulmonaires, ne proviennent de niches de colonisation principales de *Lm*, qui sont l'intestin, le foie et la rate et les macrophages essentiellement. Les Caco2 proviennent quant à elles d'un adénocarcinome du colon, comme les LoVo. Ainsi, pour compléter le panel de types cellulaires testé, il serait biologiquement pertinent de valider le changement d'isoforme de CIRBP dans des cellules Huh7 ou HepG2 d'origine hépatique, communément utilisées dans des études portant sur les interactions humain - *Lm* [577].

Concernant les macrophages, je n'ai récupéré la lignée THP-1 que tardivement au cours de ma thèse mais le changement d'isoforme de CIRBP en réponse à la LLO y est plus important que dans les LoVo. Dans ce modèle cellulaire, j'ai aussi pu caractériser CIRBP en tant que DAMP en réponse à la LLO, car on peut clairement le détecter dans le milieu extracellulaire dès 30 min d'incubation avec de la LLO, ce qui suggère aussi que la réponse pro- ou antibactérienne de CIRBP pourrait y être plus forte aussi que dans les LoVo. A l'avenir, cette lignée serait certainement mieux adaptée à l'étude des rôles de CIRBP en réponse à l'infection, notamment car beaucoup de fonctions de CIRBP ont été décrites dans des cellules immunitaires et sont impliquées dans la régulation de l'immunité.

5.3.2 Comment CIRBP impacte-t-il la progression de l'infection ?

Dans la figure 5A de l'article [75], j'ai pu démontrer, par inhibition spécifique de chaque isoforme, que CIRBP-201 favorisait l'invasion des cellules par *Lm*, ce qui est en accord avec son rôle proviral [318], alors que CIRBP-210 semblait la réprimer. Pourtant, ces isoformes ne diffèrent que dans leur 3'-UTR et pour 4 acides aminés en C-terminale de la protéine CIRBP-201, qui sont absents de la protéine CIRBP-210. Ainsi, comment ces différences peuvent mener à des effets opposés sur l'Infection ?

Comme le changement d'isoformes bénéficie à l'hôte et qu'il a pour impact la baisse de la quantité de la protéine, alors, c'est peut-être que l'activité canonique de CIRBP qui crée un environnement favorable à l'invasion. En effet, les analyses de localisation de CIRBP en réponse à la LLO indiquent : (i) une relocalisation transitoire dans le cytoplasme après 30min d'incubation et (ii) une sortie de CIRBP vers le milieu extracellulaire, où CIRBP a déjà été décrit comme un DAMP.

Concernant sa relocalisation cytoplasmique, elle a déjà été décrite en réponse au stress hypoxique, aux UV [329], où CIRBP favorise la traduction de la kinase ATR, qui est d'ailleurs ressortie comme une cible de CIRBP dans notre RIP-Seq, mais aussi au stress oxydatif [289] ou viral [363] où la protéine CIRBP est recrutée aux SG dans lesquels il régule négativement la traduction de gènes cibles. Ainsi, les cibles de CIRBP, et donc son effet, sont différentes entre le cytoplasme et le noyau et, bien que les différences entre les deux groupes ne soient pas bien définies, il se pourrait que CIRBP cytoplasmique régule positivement des gènes pro-infectieux ou bien négativement des gènes anti-infectieux. Dans ce cas de figure, le rapatrier dans le noyau, comme observé dans les figures 4.16 et 4.17 du paragraphe 4.8.4.1, permettent alors d'inhiber cette réponse, en parallèle de la baisse d'expression de la protéine induite par le changement d'isoforme (figure 2F de l'article [75]) .

Comme décrit en introduction dans le paragraphe concernant les rôles de CIRBP, celui-ci est impliqué dans la mise en place d'une réponse immunitaire, dont la translocation nucléaire du facteur de transcription central de l'inflammation, NF- κ B, notamment lorsqu'il est extracellulaire [413]. Dans les cellules THP-1, des macrophages, le changement d'isoforme de CIRBP est d'ailleurs plus prononcé, peut-être car ses fonctions ont plus d'impact

dans des macrophages que dans des cellules épithéliales. Son interaction avec les TLR4 déclenche entre autres la formation de l'inflammasome canonique NLRP3-dépendant et la réponse interféron de type 1, tout comme l'infection par *Lm* par ailleurs. Sans en connaître les mécanismes exacts, il a été démontré que, bien qu'à vocation anti-infectieuse, ces deux mécanismes pourraient aussi être soit délétères à la cellule, soit favoriser l'invasion des cellules par *Lm*. Il a même été montré récemment que eCIRBP avait un rôle pro-bactérien puisqu'il s'oppose à l'élimination des bactéries dans des souris en septicémie [364] : en favorisant la phosphorylation de STAT3, eCIRBP participe à la diminution de l'expression de β PIX, impliqué dans la modélisation de l'actine, et inhibe ainsi la phagocytose. Or, l'expérience de détection de CIRBP dans le milieu des THP-1 (et des Lovo dans une moindre mesure) indique que eCIRBP est détectable dès 30 min d'incubation avec de la LLO, donc avant même que le changement d'isoforme n'ait eu lieu.

Une hypothèse pourrait être que la signalisation de CIRBP ou eCIRBP induise des mécanismes pro-inflammatoire délétères à la cellule ou favorable à la bactérie, comme la réponse interféron de type I par exemple. Exprimer une isoforme plus instable de CIRBP serait un moyen de modérer l'activation de ces mécanismes, sans éteindre complètement l'établissement d'une réponse de cette infection. Pour tester cette hypothèse, il faudrait définir dans notre modèle quelles sont les voies inflammatoires mises en place en réponse à l'infection par *Lm* et à quel moment de l'infection elles sont activées. Ensuite, il faudrait définir si ces mécanismes sont dépendants de CIRBP, et si oui, à partir de quel compartiment (cytoplasmique, nucléaire, extracellulaire ?) et s'il y a des différences d'activation entre les isoformes. Ensuite, en quantifiant l'infection en inhibant des facteurs clés de ces voies, comme je l'ai fait pour CIRBP (Figure 5A, l'article [75]), nous pourrions déterminer si ces voies favorisent l'infection ou au contraire renforcent les défenses de la cellule et donc quel serait l'intérêt pour la cellule de changer d'isoforme de CIRBP.

On pourrait supposer que l'action pro-bactérienne de CIRBP repose aussi sur le contrôle des programmes de morts cellulaires (paragraphe 3.3.3.3.5, figure 3.43), notamment de l'apoptose, de la nécroptose et de la pyroptose, déjà décrites dans le contexte de l'infection par *Lm* (paragraphe 3.1.2.1.4, figure 3.13). Le rôle de ces morts cellulaires n'étant pas encore tout à fait défini, il se pourrait qu'elles participent, *via* leur activation par CIRBP, à la progression et à la dissémination de l'infection. Les modérer pourrait alors être plus bénéfique aux cellules hôtes. Par exemple, la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par des cellules apoptotiques peut créer un environnement plus favorable à la croissance bactérienne.

Pour continuer à étudier les fonctions de CIRBP, un projet mis en place par le laboratoire consiste à exploiter les résultats obtenus par RIP-Seq. En effet, plusieurs cibles intéressantes pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection dont ATR, bien décrit dans la réponse aux dommages à l'ADN et au stress UV, NOD1, un NLR déjà impliqué dans la détection et la mise en place d'une réponse à l'infection par *Lm* ou eIF4B, un facteur d'initiation de la traduction.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de comparer les mécanismes de régulation de CIRBP entre les infections virales, plus particulièrement celles décrites dans l'article Gokhale *et al.* [318] et les infections bactériennes. En effet, bien que l'expression de CIRBP ait un effet pro-infectieux dans les deux cas, CIRBP est stabilisé dans les infections virales à *Flaviridae* et inhibé en réponse à *Lm*. Peut-être que les virus ont évolué pour stabiliser l'expression de CIRBP et profiter de son rôle pro-infectieux, ou alors il y a une différence de temporalité entre les deux études, et à l'instar de ce que suggère notre modèle, CIRBP est d'abord stabilisé et activé, puis interviendrait le changement d'isoforme, non détecté dans Gokhale *et al.* [318]. Alternativement, on peut supposer que l'hôte perçoit différemment les pathogènes (pas de perturbation de la membrane dans le cas des infections par *Flaviridae*) et induit donc un autre type de régulation de CIRBP.

5.3.3 Quelles sont les différences d'activité des isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210 ?

5.3.3.1 Analyses de rôles des régions non-traduites

Au cours de ma thèse, je me suis surtout concentrée sur le rôle que pouvait avoir les 3'-UTR, par exemple en tentant de les surexprimer (paragraphe 4.4.2, figure 4.5), car cette région diffère entre CIRBP-201 et CIRBP-210. Les 3'-UTR sont de puissantes plateformes de régulation, comme revu dans l'article suivant [578], qui sont impliqués dans la stabilité des ARNm, leur localisation, leur traduction, la liaison avec des RBP, dans l'épissage, dans la signalisation et aussi servent de plateforme d'interaction protéine-protéine.

Dans le cas des isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210, la présence d'un intron dans le 3'-UTR du dernier le cible

pour la dégradation par le NMD, ce qui impacte donc l'expression de CIRBP lorsque l'isoforme majoritairement produit est CIRBP-210. Pourtant, d'autres éléments régulateurs au sein des 3'-UTR respectifs pourraient aussi jouer un rôle sur l'expression de CIRBP. Par exemple, j'ai décrit plus haut que les deux 3'-UTR pouvaient être ciblés par un miARN différent, ce qui pourrait aussi affecter leur stabilité. Étonnamment, le taux de GC des deux régions est très différent. Le 3'-UTR de CIRBP-201 se compose de GC à 46%, ce qui est un taux moyen, alors que le 3'-UTR de CIRBP-210 se compose à 66% de GC. Sans surprise, un article [174] associe un fort taux de GC avec un recrutement plus efficace du NMD, renforçant les critères qui font de CIRBP-210 une cible privilégiée du NMD. De plus, les régions riches en GC pourraient être reconnues par des RBP spécifiques, comme la nucléoline par exemple [579]. Au contraire, les régions riches en AU, comme on en retrouve plus dans le 3'-UTR de CIRBP-201, sont reconnues par un groupe de RBP appelé AU-RBP, impliqués notamment dans la relocalisation des ARN aux MLO, mais aussi dans leur stabilisation [580]. Ainsi, les signalisations régulant respectivement les deux isoformes sont potentiellement très différentes, ce qui participe à assurer un contrôle strict de l'expression de CIRBP. Ainsi, un futur projet pourrait consister à caractériser les signalisations induites par les 3'-UTR de chaque isoforme, au-delà du recrutement du NMD.

Concernant le 5'-UTR, il n'est pas clair s'il est différent entre les deux isoformes de CIRBP. Sur la base de données ENSEMBL, CIRBP-210 présente un 5'-UTR plus court que celui de CIRBP-201 mais ce n'est pas ce que nous observons dans nos données de séquençages, où les deux isoformes majoritairement présentes dans les cellules LoVo présentent le même site d'initiation de la transcription et le même 5'-UTR. Ces 5'-UTR sont associés à la régulation de la transcription, à la traduction, par exemple en comportant un IRES (Internal ribosome entry site), mais peut aussi affecter la stabilité des ARNm, puisque la présence d'un petit ORF (uORF) en amont de l'ORF principal peut activer la dégradation du transcrite par le NMD, mais aussi car la présence de quadruplex de G peut induire la relocalisation des ARNm vers les p-bodies [581,582]. Ainsi, les 5'-UTR ne sont pas en reste concernant la régulation des transcrits, et s'il n'était pas forcément pertinent de l'étudier dans le cadre de CIRBP, le 5'-UTR pourrait avoir un impact sur la régulation d'autres gènes subissant un épissage alternatif.

5.3.3.2 Prochaine étape : discriminer les protéines CIRBP-201 et CIRBP-210

Le principal obstacle à l'étude précise de l'impact différentiel des isoformes de CIRBP sur l'infection est le fait que nous n'avons pas encore de moyen de discriminer les protéines. En effet, les anticorps anti-CIRBP disponibles ciblent une région commune à de nombreux isoformes, dans l'ORF, et, si on peut aisément différencier les isoformes protéiques de 297 résidus (32kDa) de CIRBP-225 des isoformes de 172 résidus (18,5 kDa) de CIRBP-201, il est impossible de différencier les isoformes de 172 résidus et 168 résidus de CIRBP-210 (18kDa).

Initialement, en plus des plasmides de surexpression des différentes parties de CIRBP, j'avais aussi construit des plasmides exprimant CIRBP avec un tag FLAG, qui m'aurait alors permis de suivre précisément la protéine ectopique au cours de l'infection à l'aide d'un anticorps anti-FLAG qui l'aurait marqué spécifiquement. Malheureusement, sans doute en raison d'une trop forte induction des activités pro-immunitaires ou pro-inflammatoires de CIRBP-201, la surexpression était létale. Une deuxième stratégie consistait à utiliser les siARN spécifiques aux isoformes, puis d'utiliser l'anticorps anti-CIRBP, en supposant que la protéine visualisée serait surtout issue de l'isoforme non-éteinte par le siARN. Cette stratégie a été mise en place par Ania Kurowska au cours de son stage et semblait prometteuse, mais la grande variabilité de l'efficacité de transfection propre aux cellules LoVo ne fait pas de cette stratégie la plus idéale. Pour résoudre ce problème, la prochaine approche serait la construction de lignées cellulaires par CRISPR-Cas9 qui n'exprimeraient que l'une ou l'autre isoforme, ce qui permettrait alors de travailler sans expression ectopique et sans la pollution des multiples autres isoformes, et donc de précisément définir les fonctions des protéines CIRBP-201 et CIRBP-210. Une autre approche consisterait en l'ajout d'un tag en position C-terminale de l'une ou l'autre isoforme, ici aussi par édition du génome. L'isoforme taguée pourra être détectée par anticorps spécifique au tag choisi plutôt que par l'anticorps non discriminatoire anti-CIRBP.

Différencier les deux protéines pourrait nous renseigner sur la variation des proportions protéiques en fonction des proportions d'isoformes ARNm, et donc renseigner sur la stabilité relative des protéines, mais cela pourrait aussi nous permettre de déterminer la localisation respective de chaque isoforme protéique. Comme mentionné précédemment, la protéine CIRBP-210 ne possède pas le résidu T169, phosphorylé par CK2 et qui participe à la relocalisation de CIRBP vers le cytoplasme en cas de stress oxydatif [329]. Au cours de l'incubation des cellules LoVo avec de la LLO, il semblerait que CIRBP soit transitoirement exporté vers le cytoplasme avant de s'accumuler à nouveau dans le noyau. Comme CIRBP n'exerce pas les mêmes fonctions entre le noyau et le cytoplasme, comme je l'ai résumé

dans [322], sa relocalisation peut donc être une stratégie de régulation de son activité. De même, j'ai aussi observé que CIRBP était présent dans le milieu extra-cellulaire lors de l'exposition à la LLO (paragraphe 4.8.4.2, figure 4.18). Il serait donc aussi intéressant de déterminer s'il y a des différences de trafic des isoformes protéiques vers le milieu extra-cellulaire.

Concernant les fonctions intracellulaires des isoformes, comme CIRBP est une RBP, alors peut-être que les protéines CIRBP-201 et CIRBP-210 ne se lient pas aux mêmes cibles et régulent donc de manière différente la progression de l'infection. En effet, même si le RRM des deux isoformes protéiques est commun, il a été montré que le domaine RGG pouvait aussi lier des ARNm de manière spécifique. Ces liaisons pourraient être perturbées par l'ablation des 4 acides aminés en position C-terminale de la protéine CIRBP-210. Pour déterminer les cibles de chaque isoforme, il faudrait alors identifier ces cibles dans des lignées cellulaires qui n'exprimeraient qu'un isoforme de CIRBP à la fois, en RIP-Seq par exemple.

En conclusion, il est serait précieux de développer un outil de différenciation des protéines pour déterminer si les isoformes protéiques se comportent différemment, et donc compléter nos connaissances sur le rôle de CIRBP dans la régulation de l'infection.

5.4 Optimiser les outils d'identification des événements d'épissage alternatif

5.4.1 Tirer le meilleur des lectures longues

Bien que la caractérisation du rôle et de la régulation de CIRBP au cours de l'infection ait occupé la majeure partie de mon temps, une autre partie de mon projet de thèse était dédié à identifier l'ensemble des événements d'épissage alternatif ayant lieu en réponse à l'infection. A partir de deux jeux de données de séquençages RNA-Seq, un en lectures longues, l'autre en lectures courtes, générés en 2017 par Vinko Besic, j'ai mis en place plusieurs stratégies pour déterminer quels gènes subissaient un épissage alternatif au cours de l'infection. Dans un premier temps, je me suis penchée sur les données en lectures longues, séquencées à l'aide d'un MinION, dans les débuts de la technologie. En effet, de par leur longueur, ces données se prêtent mieux à l'identification précise des isoformes que des données en lectures courtes, ce qui présentait un avantage pour nous puisque nous étions aussi intéressées par les différents impacts que chaque isoforme pouvait avoir sur l'infection. A la suite de nombreux écueils bio-informatique et grâce à l'aide de mon collaborateur Volker Böhm, chercheur à l'université de Köln en Allemagne, j'ai combiné deux outils, ISAR [278] et Bambu [277], disponibles dans R, qui m'ont permis, à partir des fichiers d'alignements, de détecter les gènes altérés dans leur épissage, mais aussi quels isoformes étaient impliqués dans ces changements. Pourtant, en visualisant dans IGV les lectures pour les gènes sélectionnés, je me suis rendue compte que beaucoup des gènes détectés comme cibles d'un épissage différentiel n'étaient en réalité que très peu exprimés. En effet, du fait de la faible couverture offerte à l'époque par le MinION, beaucoup d'isoformes, dont le nombre de lectures alignés étaient très faibles (<10), différaient de 1 ou 2 lectures entre les deux conditions, ce qui était suffisant pour que mon premier protocole d'analyses les détecte comme changeant d'expression et indique alors un événement d'épissage alternatif, ce qui a introduit alors de nombreux faux positifs. De même, j'ai aussi été confronté à un problème d'assignement d'isoformes, c'est-à-dire que, au cours de l'étape de comptage des lectures par isoforme, chaque lecture doit être assignées à un isoforme unique. Toutefois, en raison de la technique de préparation des bibliothèques de séquençages, l'étape de rétrotranscription et la lecture de l'ADNc au travers du pore débutant par l'extrémité 3', introduisent un biais en faveur du 3', conduisant à ce que la plupart des transcrits de plus de 1000 nucléotides soient tronqués en 5'. De ce fait, l'outil d'assignement des isoformes, Bambu, ne pouvait pas discriminer des isoformes avec une partie 3'-UTR commune mais différant dans leur position 5'. En conséquence, l'aligneur assignait une lecture à la première isoforme avec la région 3'-UTR correspondante, biaisant étonnamment les résultats vers des isoformes dont l'identifiant ENSEMBL correspondaient à des petits chiffres (par exemple, plus d'isoformes allaient être assigné à CIRBP-201 que CIRBP-214, malgré une incertitude sur la séquence en 5' du transcrit). En revanche, les quelques lectures plus complètes en 5' étaient assignées de manière plus précise à un isoforme plus ressemblant. Ceci a eu tendance diluer les résultats. Par exemple, pour CIRBP, je détectais une douzaine d'isoformes, qu'on ne pouvait pas distinguer des isoformes majoritaires sur IGV, mais qui ressemblaient suffisamment aux isoformes majoritaires pour qu'une ou deux lectures leur soient assignés. Ce phénomène a ensuite participé à affaiblir la puissance statistique de détection de changement d'isoformes, tout en biaisant l'analyse vers des gènes avec peu d'isoformes, donc peu de chances de mal assigner.

En conclusion, l'analyse des données en lecture longues ne nous a pas fourni d'informations suffisamment pertinentes pour identifier précisément les événements d'épissage alternatifs mais j'estime que ce travail de développement d'un protocole d'identification des changements d'isoformes de données en lectures longues pourrait se révéler utile dans le futur. En effet, les deux défauts principaux de la technique sont le manque de profondeur de séquençage et le biais en 5'. La technologie ONT se développe très rapidement et a déjà grandement amélioré la qualité et la longueur de ses séquençages depuis 2017, et la récente mise sur le marché du promethION® devrait pouvoir pallier ces problèmes. De même, l'optimisation du séquençage de l'ARN direct, sans étape de rétrotranscription, pourrait réduire considérablement les biais en faveur d'une des extrémités des ARN, ce qui améliorerait grandement la détection d'isoformes. Ainsi la technologie ONT offrirait la possibilité d'effectuer des mesures à la fois quantitatives et qualitatives des perturbations de l'épissage alternatif entre plusieurs conditions. Enfin, malgré l'attribution erronées de certains isoformes, les résultats de l'analyse ont tout de même permis de réduire le nombre d'isoformes à considérer et même d'en regrouper certains par caractéristiques (même 3'-UTR, même rétention d'intron, etc.), ce qui a permis en aval de caractériser par gène les spécificités des isoformes sur- et sous-réglées (paragraphe 4.2, figure 4.1).

5.4.2 Les lectures courtes à la rescousse

Comme les résultats obtenus avec les données en lectures longues n'étaient pas à la hauteur de mes besoins, j'ai décidé alors de travailler sur les mêmes données mais séquencées en lectures courtes par la technologie Illumina. J'ai d'abord utilisé l'outil DEXSeq [270] qui permet de quantifier les utilisations différentielles d'exons. Ici, je me suis trouvée confrontée à la limite habituelle de cette approche, soit l'impossibilité d'associer les exons à un isoforme donné. En effet, un exon commun à plusieurs isoformes va automatiquement être associé à l'isoforme canonique ou celui avec le plus petit numéro ENSEMBL. De même, de par la taille des lectures, souvent inférieure à la taille des exons, il est impossible pour l'algorithme de précisément associer une lecture à son identifiant correspondant, si celle-ci s'aligne avec une partie commune à plusieurs exons. Enfin, les résultats étaient « pollués » par les changements d'utilisation d'exons liés aux changements d'expression des gènes, indépendamment de l'épissage alternatifs. Dans ce cas, je me suis retrouvée avec des résultats peu significatifs, car les lectures avaient été placées dans de multiples isoformes non-pertinentes, diluant ainsi la puissance du test statistique en aval.

Finalement, grâce à la rencontre de Kristen Lynch, une chercheuse de l'université de Pennsylvanie travaillant sur les mécanismes et conséquences de l'épissage alternatif dans la réponse immunitaire humaine, j'ai découvert l'algorithme MAJIQ [274], qui permet de quantifier les jonctions exon-exon, plus précisément les variants locaux d'épissage (local splicing variant, LSV). Cet algorithme calcule alors, pour une jonction, le pourcentage de lectures y étant associées par rapport au nombre de lectures associées aux exons entourant la position (PSI, percent spliced in) pour chaque condition (figure 5.2). Par exemple, la jonction entre les exons 6 et 7 de CIRBP dans les cellules non-infectées à un PSI de 0,6, et descend à un PSI de 0,2 dans les cellules infectées. La différence de PSI de chaque condition (dPSI) reflète alors le changement d'épissage. Les avantages de cet outil sont multiples : la quantification des jonctions plutôt que des exons permet de filtrer les variations d'expression dues à un changement d'expression du gène dans son ensemble, et ciblent donc plus précisément les événements d'épissage alternatifs. De plus, chaque jonction est associée à un identifiant unique, composé des coordonnées génomiques de la jonction notamment, ce qui permet de la replacer précisément sur le génome. Grâce à l'utilisation de cet algorithme, j'ai pu identifier les événements d'épissage alternatif au cours de l'infection, comme présentés dans la figure 1 de l'article [75]. Toutefois, cette méthode présente aussi des défauts. Dans un premier temps, installer le logiciel nécessite des connaissances approfondies en bio-informatique, et c'est grâce à Morgane Thomas-Chollier et son aide précieuse que j'ai pu l'utiliser. Par la suite, certaines fonctions restent inaccessibles, comme la visualisation des résultats directement à partir d'une ligne de commande, comme préconisé par les développeurs de l'algorithme. J'ai donc dû passer par une application annexe pour avoir accès à la visualisation des résultats, dont une fonction (la redirection vers USCS permettant une meilleure identification des isoformes impliquées dans la jonction d'intérêt) ne fonctionnait pas.

La table des résultats était aussi assez inhabituelle. Au lieu d'une p -value qui refléterait la confiance que nous pourrions accorder à chaque LSV, il y est présenté une valeur de « probabilité de changement », comprise entre 0 et 1, qui est proportionnelle au dPSI. Des dPSI <10%, même si biologiquement pertinents, ne vont pas avoir une forte probabilité de changement. Si l'on s'intéresse spécifiquement aux événements d'AS en général, cette méthode d'évaluation pourrait faire perdre de l'information, mais en parallèle, si l'on s'intéresse aux conséquences de l'épissage alternatif, alors ce sont sûrement les gènes avec le plus d'écart entre les PSI qui sont le plus intéressants



Figure 5.2: Calcul du PSI Le PSI est le pourcentage d'inclusion d'une jonction exon-exon parmi tous les transcrits pouvant inclure cette jonction.

d'un point de vue biologique. Le format de la table des résultats était aussi assez peu adapté à une manipulation des données en aval, avec beaucoup d'informations dans une même colonne, ce qui a nécessité l'écriture d'un script R complexe pour nettoyer et représenter graphiquement les données. De même, plusieurs informations, comme le type d'AS, sont codées par des symboles dans la table et il n'est pas aisé de retrouver l'information de compréhension du code. Toutefois, ces défauts pourraient être levés si toutes les fonctions de MAJIQ étaient rétablies. Enfin, le défaut habituel des analyses en lectures courtes persiste : dans la plupart des cas, il est impossible d'associer précisément une jonction à un isoforme, car celle-ci peut être partagée par de nombreux transcrits. En revanche, les résultats obtenus par MAJIQ étaient tout à fait pertinents et ont permis une avancée énorme dans la caractérisation de la réponse de l'épissage alternatif à l'infection par *Lm*.

En conclusion, de nombreux outils existent pour caractériser les changements d'AS entre deux conditions, mais aujourd'hui, c'est toujours une analyse hybride entre lectures longues et lectures courtes qui permet à la fois de quantifier et qualifier les événements d'AS. Dans mon cas, l'utilisation de MAJIQ m'a permis d'identifier quels gènes étaient affectés par l'AS. En filtrant ces gènes dans les résultats obtenus par Bambu/ISAR, j'ai pu alors parvenir à une vision globale du type d'isoformes affectés par l'AS, mais leur détection reste à améliorer. *A priori*, c'est le développement de la technologie ONT et l'optimisation des outils d'analyses associés qui rendront ces analyses possibles.

Pour la suite, identifier précisément chaque isoforme impliqué dans l'épissage alternatif permettra d'affiner les résultats présentés en figure 4.1 (paragraphe 4.2). et permettra peut-être de mettre à jour des différences structurales entre les isoformes sous-régulées, sur-régulées et non-affectés par l'infection par *Lm*. De même, il serait aussi envisageable d'analyser les séquences des isoformes pour y détecter des motifs qui pourraient servir de plateforme de régulation, que ce soit par la formation de structures secondaires ou par le recrutement de RBP, qui affecteraient l'épissage. Ces perspectives permettraient alors une caractérisation plus globale du remaniement de l'épissage au cours de l'infection par *Lm*. En somme toutes, nous disposons aujourd'hui d'une méthode d'analyse de l'épissage alternatif entre deux conditions, qui permet la détection d'isoformes, la quantification des changements d'utilisation de ces derniers et l'analyse structurale des isoformes candidats, qui, au cours de l'optimisation des technologies de séquençages, pourra être appliquée à d'autres contextes que l'infection par *Lm*.

6 Conclusion générale

En conclusion, ce travail de thèse aura permis dans un premier temps de lever le voile sur un nouveau type de régulation de l'expression des gènes de l'hôte en réponse à l'infection bactérienne par *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène alimentaire répandue dans notre filière alimentaire, et qui reste encore aujourd'hui un problème de santé publique. En effet, dans notre modèle d'infection, à des temps tardifs, on observe un épissage alternatif d'un groupe de gènes, c'est-à-dire un changement dans les proportions des différentes versions de l'ARNm (isoformes) d'un même gène entre deux conditions. Le groupe de gènes affecté par ce phénomène au cours de l'infection est enrichi en facteurs de régulation du métabolisme de l'ARN, notamment les facteurs SRSF. Au cours de l'infection, ces gènes sont affectés par une hausse de l'abondance d'isoformes poisons, ce qui restreint leur expression.

Pour caractériser le mécanisme de dérégulation de l'épissage au cours de l'infection par *Lm*, je me suis concentrée sur la régulation d'un seul facteur, la protéine de réponse au stress CIRBP, qui passe de l'expression majoritaire d'un isoforme d'ARN canonique et stable à l'expression d'un isoforme comportant un EJC dans son 3'-UTR, ce qui le cible pour être dégradé par un système de surveillance des ARN, le NMD, avec pour conséquence une baisse de l'expression de la protéine. J'ai pu identifier le facteur bactérien à l'origine de ce changement d'isoforme, soit le facteur de virulence principal de *Lm*, la cytolysine listériolysine O dont l'activité de perforation de la membrane plasmique est à l'origine de la régulation de CIRBP. J'ai pu généraliser ce phénomène à d'autres cytolysines, donc potentiellement à d'autres type d'infections bactériennes. Enfin, en perturbant artificiellement le trafic des ions potassium à travers la membrane, j'ai pu retrouver le même phénotype de régulation de CIRBP, suggérant fortement que la perturbation du potentiel de membrane par la LLO est le signal de stress à l'origine de l'épissage alternatif de CIRBP.

En écho à ce qui a été décrit au préalable comme une réponse d'épissage alternatif au stress chaud, j'ai identifié CLK1 comme le coordinateur de l'épissage alternatif de CIRBP dans les cellules hôtes. CLK1 est une kinase dont l'activité est affectée par différents stress, notamment par l'inhibition de sa capacité à phosphoryler ses cibles, dont les protéines SRSF font partie. J'ai validé en condition d'incubation avec la LLO la déphosphorylation des protéines SRSF, qui entraîne alors donc le remaniement de l'épissage de nombreux transcrits dont CIRBP mais aussi CLK1. En effet, la LLO induit la reprise de l'épissage d'un isoforme à rétention d'intron de CLK1 en faveur d'un isoforme mature, ce qui est un indicateur supplémentaire de la perte d'activité de CLK1. Pour continuer à caractériser cette voie, il serait favorable d'identifier précisément par quel mécanisme l'activité kinase de CLK1 est inhibée.

Bien qu'il soit déjà décrit dans la réponse à de nombreux stress, j'ai pu aussi découvrir une nouvelle fonction de CIRBP dans la régulation des infections bactérienne. En effet, l'inhibition ciblée de chaque isoforme a un effet opposé sur le taux d'invasion de cellules, où l'isoforme canonique est pro-bactérienne. Ainsi, favoriser l'expression de l'isoforme instable en réponse à l'infection serait un moyen de défense de la cellule pour modérer la progression de l'infection. Bien qu'inhibé, CIRBP semble toujours actif dans la réponse à l'infection. Il cible en effet d'avantage de transcrits impliqués dans la réponse au stress dans des cellules infectées que non-infectées. Enfin, les fonctions de CIRBP pourraient aussi être impactées par sa localisation, notamment dans des macrophages, car CIRBP sort dans le milieu extra-cellulaire en présence de LLO. Il pourrait alors se comporter comme un DAMP et induire une forte réaction immunitaire. Au-delà d'être un modèle d'épissage alternatif, CIRBP se place aussi comme un coordinateur clé de la réponse à l'infection par *Lm*, ce qui justifierait de poursuivre son étude dans le contexte du stress infectieux.

En somme, j'ai pu tester et valider plusieurs outils d'identification de ces événements d'épissage alternatifs, qui m'ont permis de mettre à jour un mécanisme central de contrôle de l'infection par *Lm*, soulignant l'importance d'une telle régulation dans la gestion du stress cellulaire. Cette régulation est susceptible d'être pertinente dans d'autres contextes de stress biotiques et abiotiques et même mener à des applications thérapeutiques.

7 Matériels et méthodes

Table des matières

7.1	Identification d'un facteur d'origine bactérienne de régulation de CIRBP	166
7.1.1	Criblage de potentiels facteurs bactériens de régulation de CIRBP	166
7.1.2	Validation de la capacité de régulation de CIRBP de la listériolysine O	168
7.2	Surexpression des protéines et des 3'-UTR de CIRBP-201 et CIRBP-210	169
7.2.1	Clonage de CIRBP dans un vecteur de surexpression	169
7.2.2	Transfection des cellules LoVo avec les plasmides de surexpression de CIRBP	171
7.2.3	Evaluation de l'invasion bactérienne dans des cellules LoVo surexprimant CIRBP	173
7.3	Régulation de CIRBP par perturbation chimique de l'ISR	173
7.4	Etude de l'impact des deux voies de dégradation du NMD sur la stabilisation de CIRBP-210	173
7.5	Quantification des différents isoformes de CLK1 par RT-qPCR	174
7.6	Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires	175
7.6.1	Hela, A549 et Caco2	175
7.6.2	THP-1	175
7.7	Localisation de CIRBP dans des cellules non-infectées, infectées ou incubées avec de la LLO	175
7.7.1	Analyse de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées et infectées	175
7.7.2	Localisation cellulaire de la protéine dans des cellules incubées avec de la LLO	178
7.8	Caractérisation des transcrits affectés par un événement d'épissage alternatif au cours de l'infection par <i>Lm</i>	180

La majeure partie des protocoles utilisés au cours de ma thèse sont décrits dans l'article suivant [75]. Les protocoles utilisés pour réaliser les expériences complémentaires présentés dans la section "Résultats" sont détaillés ci-dessous. Les scripts R et bash utilisés pour la détection et la quantification des changements d'isoformes et des événements d'épissage alternatifs sont disponibles sur le dépositaire github.

7.1 Identification d'un facteur d'origine bactérienne de régulation de CIRBP

7.1.1 Criblage de potentiels facteurs bactériens de régulation de CIRBP

Pour identifier le ou les facteurs de *Lm* impliqué dans la régulation de CIRBP, j'ai infecté des cellules LoVo avec une souche de *Lm* déficiente pour la production de listériolysine O (LLO), son principal facteur de virulence ; et avec des souches de *Listeria innocua* une espèce non-pathogène modifiée (ou non) pour exprimer les facteurs de virulence de *Lm* qui participent à son entrée dans la cellule, les internalines A et B. Pour élargir le champ de recherche de facteurs bactériens impactant l'épissage de CIRBP à d'autres bactéries, j'ai infecté des cellules LoVo avec d'autres espèces bactériennes qui diffèrent dans leur mode de vie par de nombreux aspects, comme le mode de vie extra- ou intracellulaire, leur caractère pathogène ou non, leur sensibilité à la coloration de Gram ou l'expression d'autres types de facteurs de virulence, comme des invasives. Les caractéristiques de chaque souche bactérienne sont résumées et détaillées dans le tableau 4.1 du [paragraphe 4.3.1](#).

Des cellules LoVo ont étéensemencées 48h avant l'infection à $1,75 \times 10^5$ cellules/mL pour atteindre $\pm 3 \times 10^5$ cellules/mL le jour de l'infection. Chaque souche bactérienne a été étalée sur une boîte gélosée de milieu adapté et incubé pendant 24h à 37°C. Le milieu de culture solide de *S. flexneri* est additionné à 0,01% de Rouge Congo pour activer le système de sécrétion de type III et favoriser la sécrétion des facteurs d'invasion IpaB et IpaC [583]. Pour chaque souche, des cultures de nuit (± 16 h) ont étéensemencées avec une colonie bactérienne unique dans 3 mL de milieu de culture correspondant et incubées à 37°C, à 180 rotations par minute (rpm) en condition aérobie. La composition des milieux est fournie dans le tableau 7.1 et des précisions concernant les conditions de culture propres à chaque bactérie sont renseignées dans le tableau 7.2.

Nom complet	Acronyme	Composition	Référence
Brain Heart Infusion	BHI	Infusion de cœur de bœuf 10 g/L; Agar bactériologique 15 g/L; Dextrose 2 g/L; Disodium phosphate 2,5 g/L; Mixture de peptone 10 g/L; Chlorure de sodium 5 g/L; Infusion de cerveau de veau 7,5 g/L	Condalab #1048
Tryptic Soy Broth	TCS	Produit de digestion pancréatique de caséine 17 g/L; Produit de digestion papaique de soja; 3 g/L Dextrose; 25 g/L Chlorure de sodium; 5 g/L Phosphate dipotassique 25 g/L	Fisher Scientific #BD 211825
Luria Bertani / Lysogeny Broth	LB	Peptone 140 SELECT 10 g/L; Extrait de levure SELECT 5 g/L; Chlorure de sodium 5 g/L; Agar SELECT 12 g/L	Invitrogen #22700025

Table 7.1: Composition des milieux de cultures bactériennes.

Identifiant	Espèce	Génotype	Plasmide	Gram	Intra-cellulaire	Milieu de culture	MOI	Référence
BIRD 1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Souche LL195, sérotype 4b	/	(+)	Oui	BHI	30	[X; X]
BIRD 23	<i>Listeria innocua</i> [<i>inIA</i>]	Souche CLIP 11262	<i>pGM30-inIA(LRRs-IR-SPA)</i>	(+)	Oui	BHI + Cm (7µg/mL)	100	[X]
BIRD 24	<i>Listeria innocua</i> [<i>inIB</i>]	Souche CLIP 11262	<i>pP1-inIB(LRR-IR-SPA)</i>	(+)	Oui	BHI + Erm (5µg/mL)	100	[X]
BIRD 30	<i>Listeria innocua</i>	Souche CLIP 11262	/	(+)	Non	BHI	100	[X]
BIRD 127	<i>Listeria monocytogenes</i> Δ <i>hlyA</i>	Souche LL195 Δ <i>hlyA</i>	/	(+)	Oui	BHI	30	[X]
BIRD 65	<i>Shigella flexneri</i>	Sérotype 5a M90T	/	(-)	Oui	TCS broth 1X	5	[X,X,X]
BIRD 143	<i>Escherichia coli</i> [Inv+]	Souche K-12, sous-souche MG1655	<i>pBR325-inv</i>	(-)	Oui	LB	75	[X]
BIRD 144	<i>Escherichia coli</i>	Souche K-12, sous-souche MG1655	/	(-)	Non	LB	75	[X]
BIRD 198	<i>Enterococcus faecalis</i>	Souche V583 ATCC #700802	/	(+)	Non	BHI	100	[X]
BIRD 200	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Souche RP62A ATCC #35984	/	(+)	Non	BHI	100	[X]
BIRD 277	<i>Salmonella enterica</i>	Sérotype <i>Typhimurium</i> C5	/	(-)	Oui	LB	75	[X]

Table 7.2: Conditions de culture des différentes souches bactériennes utilisées pour identifier un facteur régulateur de CIRBP.

7.1.1.1 Infection de cellules LoVo avec *S.flexneri*

La culture de nuit, en phase latente, est diluée au 1/50ème dans 5 mL de TCS et replacée à 37°C C jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm/mL (A600nm/mL) soit comprise entre 0,25 et 0,6. Pour maximiser leur entrée dans les cellules, les bactéries sont traitées à la polylysine : 1 mL de la culture est centrifugé à 6 000 x g, 30s et les bactéries sont re-suspendues dans 1 mL de PBS auquel est ajouté 10 µg/mL de poly-lysine. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les bactéries sont lavées 3 fois au PBS puis diluée dans du milieu DMEM sans FBS pour avoir une multiplicité d'infection (Multiplicity of infection, MOI) de 5 bactéries par cellules. L'inoculum est mis en contact pendant 1 heure avec des cellules LoVo lavées une fois dans du PBS 1X. Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS + gentamycine (25 µg/mL) et remises en culture dans 1mL de DMEM + 10% FBS + gentamycine (25 µg/mL) pendant 4h avant de procéder à l'extraction d'ARN et l'étalement des bactéries intra-cellulaires pour estimer le taux d'infection des cellules.

7.1.1.2 Infection des cellules LoVo avec les autres bactéries intra-cellulaires

Pour chaque culture de nuit en phase latente, 1 mL a été prélevé et lavé deux fois dans du PBS stérile, 30s à 6000 xg, sauf *S. Thypimiri*, culotée 2min à 10000 xg. Chaque culot est resuspendu dans 1 mL de PBS. Pour chaque souche, la densité optique l'A600 nm/mL a été mesurée et les *inocula* de bactéries ont été préparés à une concentration correspondant à la MOI adaptée à chaque souche. Les cellules LoVo sont infectées comme décrit dans le paragraphe précédent à la différence que l'infection se prolonge 9h après le lavage gentamycine.

7.1.1.3 Infection des cellules LoVo avec des bactéries extracellulaires

Le protocole d'infection est identique à celui du paragraphe précédent à la différence que les *inocula* sont préparés dans du milieu avec 10% FBS et les cellules sont co-incubées avec les bactéries durant 10h.

7.1.2 Validation de la capacité de régulation de CIRBP de la listériolysine O

Pour valider les effets de la LLO sur la régulation de CIRBP, la souche BIRD 127 (*Lm LL195 ΔhlyA*), qui n'a pas démontré d'effet sur l'épissage alternatif de CIRBP, a été complétée avec un plasmide d'expression de la LLO (*Lm LL195 ΔhlyA* [pAD-*hlyA*-Myc]) pour tenter de récupérer le phénotype de régulation de CIRBP. En contrôle, la souche *Lm LL195 ΔhlyA* a été complété avec le même plasmide exprimant la protéine fluorescente verte (Green fluorescent protein, GFP) dans la souche *Lm LL195 ΔhlyA* [pAD-GFP-Myc]. Le protocole d'infection des cellules avec ces souches est le même que dans l'[article](#) de recherche [75]. Les caractéristiques de chaque souche sont résumées dans le tableau 7.3.

Identifiant	Espèce	Génotype	Plasmide	Gram	Milieu de culture	MOI
BIRD 1	<i>Listeria monocytogenes</i>	LL195	/	(+)	BHI	30
BIRD 127	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>ΔhlyA</i>	LL195	<i>ΔhlyA</i>	(+)	BHI	30
BIRD 259	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>ΔhlyA</i> [pAD-eGFP-Myc]	LL195	<i>ΔhlyA</i> [pAD-P _{HYP} ER-UTR _{hlyA} -eGFP-Myc]	(+)	BHI + Cm (7µg/mL)	30
BIRD 262	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>ΔhlyA</i> [pAD-hlyA-Myc]	LL195	<i>ΔhlyA</i> [pAD-P _{HYP} ER-UTR _{hlyA} -hlyA-Myc]	(+)	BHI + Cm (7µg/mL)	30

Table 7.3: Description des souches de *Lm* utilisées pour valider l'effet de la LLO sur la régulation de CIRBP.

7.2 Surexpression des protéines et des 3'-UTR de CIRBP-201 et CIRBP-210

Pour valider les effets de l'inhibition de l'expression des isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210 sur la colonisation des cellules par les bactéries, j'ai voulu surexprimer chaque isoforme dans des cellules LoVo.

7.2.1 Clonage de CIRBP dans un vecteur de surexpression

7.2.1.1 Purification et digestion du plasmide pcDNA3

Pour chaque clonage, j'ai utilisé un plasmide pcDNA3 (5546 bp) portant une cassette de résistance à l'ampicilline et j'ai inséré les différents fragments de CIRBP dans son site de clonage multiple en aval du promoteur CMV (figure 7.1). Le plasmide pcDNA3 a été purifié à partir de 5 mL de culture à saturation de la souche *E. coli* Pro5a-[pcDNA3] (BIRD 73) à l'aide du kit « Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System » (Promega # A7510). Pour la digestion, 1 µg de plasmide a été digéré avec 1 µL d'enzyme de restriction *Bam*HI (ThermoFisher #FD0054) et 1 µL d'enzyme de restriction *Hind*III (ThermoFisher #FD0504) dans du tampon "Fast Digest®", pendant 1h à 37°C. Les enzymes de restriction ont été inactivées 5min à 65°C et l'efficacité de digestion a été vérifiée en séparant 1 µL de produit de digestion sur un gel d'électrophorèse à 1% d'agarose (TAE 1X) pendant 25min à 100V. Le plasmide digéré a été purifié avec le kit " PCR Wizard® SV gel & PCR clean-up System" pour éliminer le petit produit de digestion (Promega # A9285).

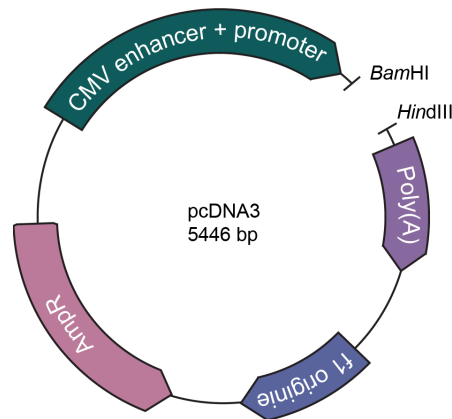


Figure 7.1: Carte du plasmide pcDNA3. En vert est représenté le promoteur CMV et sa séquence régulatrice (enhancer). Ce segment est suivi du site de clonage multiple pour lequel sont représentés les sites de restrictions de *Bam*HI et *Hind*III, utilisés comme site d'insertion pour les clonages. En aval du site d'insertion, en violet se trouve la séquence signal de polyadénylation (Poly(A)), suivie de l'origine de réplication bactérienne (f1 origine). Enfin, en rose est représentée la cassette de résistance à l'ampicilline.

7.2.1.2 Amplification des fragments de CIRBP à surexprimer

Pour pouvoir distinguer le rôle de chaque région de CIRBP spécifiquement, j'ai réalisé plusieurs constructions, présentée dans le tableau 7.4 :

- L'expression des ORF+3'-UTR pour CIRBP-201 et CIRBP-210 respectivement permettrait de confirmer l'impact différentiel de chaque transcrits sur l'infection.
- L'expression des cadres de lectures ouverts seuls (ORF) discriminent le rôle des protéines sur l'infection non seulement entre elles (protéine CIRBP-201 versus protéine CIRBP-210) mais aussi du rôle des 3'-UTR.
- L'expression des 3'-UTR seuls discriminent leur rôle sur l'infection non seulement entre eux (3'-UTR CIRBP-201 versus 3'-UTR CIRBP-210) mais aussi du rôle des protéines.
- L'expression de CIRBP-210 ORF + 3'-UTR ayant conservé son intron (intron 7) permettrait d'investiguer l'importance de l'épissage sur le contrôle de l'infection.

- L'expression de l'ORF CIRBP-201 combiné au 3'-UTR de CIRBP-210 et de l'ORF CIRBP-210 combiné au 3'-UTR de CIRBP-201 permettrait de valider la ou les régions de CIRBP impliqué dans le contrôle de l'infection.

Référence	Description	Résistance
BIRD 278	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-201 ORF]	Ap 100
BIRD 279	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-210 ORF]	Ap 100
BIRD 280	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-201 ORF + 3'UTR]	Ap 100
BIRD 281	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-210 ORF + 3'UTR]	Ap 100
BIRD 299	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-201 ORF + CIRBP-210 3'-UTR]	Ap 100
BIRD 300	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-210 ORF + CIRBP-201 3'-UTR]	Ap 100
BIRD 303	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-210 ORF + 3'-UTR + Int7]	Ap 100
BIRD 304	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-201 3'-UTR]	Ap 50
BIRD 305	<i>E. coli</i> NEB5a [pcDNA3-CIRBP-210 3'-UTR]	Ap 50

Table 7.4: Description des constructions réalisées pour la surexpression transitoire des différentes parties CIRBP.

L'amplification des inserts s'est faite à partir d'ADNc extraits de cellules infectées comme décrit dans l'article [75], à l'exception de BIRD 303 pour lequel la région ayant conservé l'intron 7 de CIRBP a été amplifiée à partir d'ADN génomique. Pour BIRD 278, 279, 280, 281, 282, 280, 284, 285, 304 et 305, un seul couple d'amorces, construites avec une queue flottante d'homologie à pcDNA3, a été utilisé pour l'amplification. Pour BIRD 299 et 300 les régions ORF et 3'-UTR ont été amplifiées individuellement avec deux couples d'amorces, construites avec deux queues flottantes d'homologie à pcDNA3 et au 3'-UTR ou à l'ORF respectivement. Pour BIRD 304, les régions allant de l'exon 1 à 7bis de CIRBP-210, puis de l'intron 7 à la fin de l'exon 8 de CIRBP-210 ont été amplifiées avec deux couples d'amorces, construites avec deux queues flottantes d'homologie à pcDNA3 et à l'autre région respectivement. Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le tableau 7.5.

Chaque région a été amplifié par réaction de polymérase en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR). Le mélange de PCR se compose de:

- 5 ng de matrice d'ADN
- des dNTP (200 μ M)
- des amorces sens et antisens (0,5 μ g chacune)
- du tampon de réaction Q5® Reaction Buffer Pack à 1X
- d'eau de qualité moléculaire
- d'ADN polymérase Q5® (Thermofisher, #M0491L) (0,02 U/ μ L).

Le programme d'amplification comporte les étapes suivantes :

- 1 cycle de dénaturation initiale et d'activation de la polymérase: 30s à 98°C
- 8 cycles d'amplification de l'insert seul :
 - Dénaturation: 7s à 98°C
 - Amorçage: 20s à 60°C
 - Elongation: 25s à 72°C
- 27 cycles d'amplification de l'insert et de la queue d'homologie:

- Dénaturation: 7s à 98°C
- Amorçage + Elongation: 45s à 72°C
- 1 cycle d'extension finale: 2min à 72°C

L'amplification de chaque produit de PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (TAE 1X + 1% d'agarose). Les produits de PCR ont ensuite été purifiés avec le même kit que le plasmide pcDNA3.

7.2.1.3 Insertion des produits de PCR dans pcDNA3 et transformation de bactéries chimio-compétentes

Pour insérer chaque produit de PCR dans le vecteur pcDNA3 digéré, j'ai utilisé la technologie Gibson Assembly®. Pour BIRD 278, 279, 280, 281, 282, 280, 284, 285, 304 et 305, j'ai assemblé le produit PCR complet dans le vecteur et pour BIRD 299, 300 et 304, j'ai assemblé le vecteur et les deux produits PCR en une seule réaction. J'ai utilisé 75 ng de vecteur avec un ratio insert:vecteur de 2:1 (2x plus d'unités d'inserts que d'unités de plasmides) et ai suivi le protocole fourni avec le NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB #E2621X). Pour chaque réaction, le produit d'assemblage a directement été transformé dans des bactéries chimio-compétentes *E. coli* NEB5 α (NEB #C2987H) selon le protocole "High Efficiency Transformation Protocol". Les bactéries transformées ont été étalées sur du LB-Ap 100 μ g/mL et incubées sur la nuit à 37°C. Le lendemain, j'ai testé des colonies sélectionnées aléatoirement en cPCR (colony PCR) pour l'intégration du plasmide recombinant. Par réaction, une colonie est étalée sur une boîte de pétri LB + Ap 100 et placée dans le mélange PCR suivant :

- dNTPs (200 μ M)
- Amorces sens et antisens (0,5 μ g chacune) (tableau 7.6)
- Tampon de réaction Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega #M7911) à 1X
- Eau de grade moléculaire
- ADN polymérase GoTaq® (Promega #M300A) (0,025 U/ μ L).

Chaque réaction est ensuite amplifiée selon le programme suivant :

- 1 cycle de dénaturation initiale et d'activation de la polymérase : 2min à 95°C
- 35 cycles d'amplification de l'insert seul:
 - Dénaturation: 7s à 95°C
 - Amorçage: 45s à 51°C
 - Elongation: 1min à 72°C
- 1 cycle d'extension finale : 5min à 72°C

Après vérification de l'amplification par électrophorèse sur gel (TAE 1X, Agarose 1%, 25min à 100V), les produits de PCR correspondant à la taille attendue de l'insert sont purifiés et envoyés en séquençage avec les mêmes amorces que pour la PCR (tableau 7.6). Si le séquençage ne présente pas de mutation dans l'insert, les plasmides sont purifiés comme décrits précédemment à partir d'une culture de nuit du clone positif et conservés à -20°C.

7.2.2 Transfection des cellules LoVo avec les plasmides de surexpression de CIRBP

Les cellules ont été transfectées avec de la "Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent" (Invitrogen #15338100) en suivant le protocole du fabricant, que j'ai adapté au format 12-puits. Pour chaque condition, 2 μ g de plasmide ont été mélangés avec 2 μ L de PLUS™ Reagent et 100 μ L d'OptiMEM™ (Gibco #15392402), et 10 μ L de Lipofectamine™ LTX reagent ont été mélangés avec 100 μ L d'OptiMEM™. Les deux mélanges ont été combinés et 100 μ L ont été répartis sur 2×10^5 cellules préalablement ensemencées dans une plaque 12-puits. Pour vérifier la surexpression de CIRBP dans chaque condition, j'ai extrait les ARN et réalisé une RT-qPCR sur les isoformes de CIRBP comme décrit dans l'article [75], et avec le couple d'amorces permettant la détection des ORF (tableau 7.6). J'ai aussi extrait les protéines dans du tampon SB 1X (tableau 7.7) avec 125U de benzonase et je les ai ensuite dénaturées 5min à 95°C. La vérification de la surexpression des protéines s'est faite par immunodétection comme décrit dans l'article [75] avec un anticorps anti-CIRBP et un anticorps anti-tubuline comme témoin de charge (tableau 7.14).

Produit	Amorce sens	Amorce antisens
pcDNA3-CIRBP-201 ORF	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCTTACTCGTTG TGTGTAGCGTAACTGT-3'
pcDNA3-CIRBP-210 ORF	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCTCAACCGTAA CTGTCATAACTGTCTCTG-3'
pcDNA3-CIRBP-201 ORF + 3'-UTR	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCTTCATTTAC ACGGTCTTTTAATCGGCT-3'
pcDNA3-CIRBP-210 ORF + 3'-UTR	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCCCGAGGTCC GCAGGC-3'
pcDNA3-CIRBP-201 ORF + CIRBP-210 3'- UTR	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-GTCCTGGCCGGGCCCTTACTCGTTGTG TAGCG-3'
	5'-CGCTACACACAACGAGTAAAGGGGCCCGGC CAGGACTC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCCCGAGGTCCG CAGGC-3'
pcDNA3-CIRBP-210 ORF + CIRBP-201 3'- UTR	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-GATCTTGAGCAGGAAGGGTTTTCAACCGTAA CTGTCATAACTGTCTCTG-3'
	5'-GTTATGACAGTTACGGTTGAAAACCTTC CTGCTCAAGATCGTCCTTCC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCTTCATTTAC ACGGTCTTTTAATCGGCT-3'
pcDNA3-CIRBP-210 FL + Int7	5'-TCACTATAGGGAGACCCAAGCTTATGGCAT CAGATGAAGGCAAAC-3'	5'-CCGAAAGCACTTACAGGGGACAAGCCT-3'
	5'-GAGGCTTGTCCCCTGTAAGTGCTTTC-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCCCGAGGTCCG CAGGC-3'
pcDNA3-CIRBP-201 3'-UTR	5'-AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA GCTTAAACCCTTCTGCTCAAGATCGT-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCTTCATTTCA CACGGTCTTTTAATCGGCT-3'
pcDNA3-CIRBP-210 3'-UTR	5'-AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCA AGCTTAGGGGCCCGCCA-3'	5'-CGGCCGTTACTAGTGGATCCCCGAGGTCCG CAGGC-3'

Table 7.5: Amorces utilisées pour le clonage des différentes parties de CIRBP.

Produit	Amorce sens	Amorce antisens
Site de clonage	TAATACGACTCACTATAGGG	GCATTTAGGTGACACTATAG
CIRBP total	CTCAAAGTACGGACAGATCTC	TCGTCAATGTTCTCAAAGGTG

Table 7.6: Amorces utilisées pour valider les clonages des parties de CIRBP dans pcDNA3 et leur surexpression.

Réactif	Concentration
Tris pH 6,8	0,05M
Glycerol	10%
Bleu de Bromophénol	0,1mg/mL
DTT	50nM
SDS	4%
H ₂ O	/

Table 7.7: Composition du tampon SB 1X.

7.2.3 Evaluation de l'invasion bactérienne dans des cellules LoVo surexprimant CIRBP

L'impact des différentes constructions de CIRBP sur l'invasion des cellules par *Lm* a été quantifié comme décrit dans l'article [75], à la différence que l'infection a été interrompue après 5h et non 10h.

7.3 Régulation de CIRBP par perturbation chimique de l'ISR

Comme précédemment démontré [110], la voie de réponse au stress intégrée (Integrated stress response, ISR) est activée par l'infection *Lm*. Pour déterminer si cette réponse au stress pourrait être à l'origine de la régulation de CIRBP, j'ai mis les cellules en différentes conditions d'induction de l'ISR. Des cellules LoVo ont donc étéensemencées à $1,75 \times 10^5$ cellules/mL pour atteindre 80-90% de confluence 48h plus tard. Les cellules ont ensuite été lavées 3x au PBS 1X et mises en condition de stress métabolique pendant 5h. Pour induire un stress métabolique, j'ai ajouté aux cellules 1mL de milieu DMEM/F12 (Gibco #21331046) sans glutamine. Pour induire l'ISR via l'activation de la réponse aux protéines non-plies (Unfolded protein response, UPR), j'ai utilisé un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines, la tunicamycine, diluée dans du DMSO à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La thapsigargine active l'ISR par la voie du stress de l'ER stress en perturbant les influx de calcium dans le lumen du réticulum endoplasmique. J'ai donc incubé des cellules avec 1 μM de thapsigargine (Enzolifescience #BML_PE180_0001) diluée dans du DMSO. Le changement d'isoforme de CIRBP a ensuite été validé par extraction d'ARN et RT-qPCR comme décrit dans l'article [75].

7.4 Etude de l'impact des deux voies de dégradation du NMD sur la stabilisation de CIRBP-210

En aval de son activation par UPF1, le NMD peut faire intervenir deux voies de dégradation de ces ARN cibles, respectivement gouvernées par SMG6 et le complexe SMG5/7 [175]. Pour vérifier si ces deux voies pourraient avoir des effets différents sur la régulation de CIRBP et donc sur l'infection, et plus de l'inhibition générale du NMD par KD de UPF1 détaillée dans l'article [75], j'ai inhibé SMG5, SMG6 et SMG7, seules ou en combinaison avec une des deux autres, à l'aide de petits ARN interférents (siARN, tableau 7.8) [175]. Les siARN ont été produits par Eurofins Genomics. La vérification de l'inhibition des SMG et le changement d'isoforme de CIRBP ont été vérifiés par extraction d'ARN et RT-qPCR, et l'impact de l'inhibition des SMG sur le nombre de bactéries par cellule ont été réalisés comme décrit dans l'article [75]. La mesure du taux de protéine CIRBP en cas d'inhibition du NMD a été quantifiée par immunodétection avec un anticorps anti-CIRBP comme décrit dans l'article [75].

ARN cibles	Source	Séquence
SMG5	Eurofins	5'-GAAGGAAAUUGGUUGAUACdTdG-3'
SMG6	Eurofins	5'-GGGUCACAGUGCUGAAGUAdTdT-3'
SMG7	Eurofins	5'-CGAUUUUGGAAUACGCUUUAdGdA-3'

Table 7.8: Séquences des siARN utilisés pour l'inhibition partielle du NMD.

7.5 Quantification des différents isoformes de CLK1 par RT-qPCR

Pour quantifier le taux d'épissage de l'isoforme avec rétention d'introns (RI) de CLK1 vers sa forme mature (Mature) au cours de l'incubation de cellules avec de la LLO, l'ARN a été extrait et rétro-transcrit [75]. Le taux de jonctions exon-exon correspondant à chaque isoforme a été quantifié par qPCR à l'aide deux couples d'amorces spécifiques (tableau 7.9) comme détaillé dans la figure 7.2.

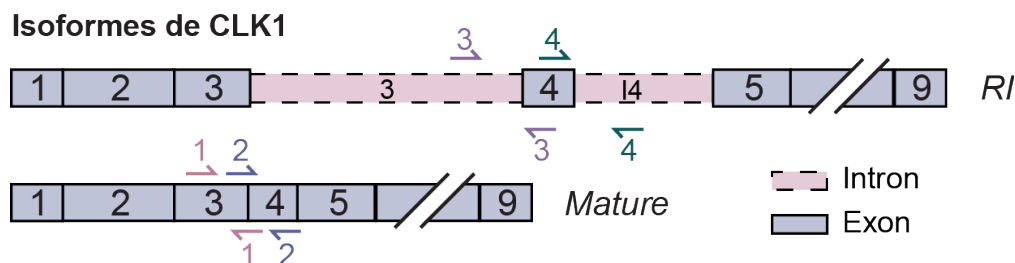


Figure 7.2: Amplification des isoformes de CLK1. Les couples d'amorces 1 (rose) et 2 (bleu) permettent d'amplifier les jonctions entre les exons E3 et E4, et E4 et E5 respectivement, et de détecter l'isoforme mature. Les couples d'amorces 3 (violet) et 4 (vert) permettent d'amplifier la présence des introns I3 et I4 respectivement, et de détecter l'isoforme RI.

Produit	Amorce sens	Amorce antisens
CLK1 Mature 1	5'-GAAAGCCGGTATCAGAACCATAG-3'	5'-TCGGTGACTCTTCCCATGT-3'
CLK1 Mature 2	5'-CATGGGAAGAGTCACCGAAGG-3'	5'-TACGTCTCCACTCTGACAGATCA-3'
CLK1 RI 3	5'-CGGGTATATTGATTGGCTGGA-3'	5'-CCCTCCTCATCATCCTCTACA-3'
CLK1 RI 4	5'-GGAGTGTAGAGGATGATGAGGA-3'	5'-AAGATTTCCAATCCCTGAAAGC-3'

Table 7.9: Amorces utilisées pour la détection des isoformes de CLK1 en qPCR.

7.6 Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires

7.6.1 Hela, A549 et Caco2

Des cellules Hela (ATCC #CCL2, origine utérine), A549 (ATCC #CCL-185, origine pulmonaire) et Caco2 (ATCC #HTB-37, origine colorectale), toutes cultivées comme les cellules LoVo, ont étéensemencées à $1,6 \times 10^5$ cellules/mL 48h avant l'infection. L'infection se fait identiquement à celle des LoVo [75] et a été interrompue à 5h et 10h post-infection. La validation du changement d'isoforme de CIRBP se fait par extraction d'ARN total et RT-qPCR [75].

7.6.2 THP-1

Des cellules THP-1 (ATCC #TIB-202, origine monocytaire), cultivées en RPMI (Gibco #11530586) + 10% FBS ont étéensemencées à 1×10^6 cellules/mL et différenciées avec 100 ng/mL de PMA (Phorbol myristate acetate, Sigma #P8139) dilué dans du DMSO. Après 48h, les cellules THP-1 ont été rincées une fois et incubées avec de LLO à 4,5 nM pendant 1h dans du RPMI sans FBS. La validation du changement d'isoforme de CIRBP s'est fait par extraction d'ARN et RT-qPCR [75].

7.7 Localisation de CIRBP dans des cellules non-infectées, infectées ou incubées avec de la LLO

7.7.1 Analyse de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées et infectées

Pour étudier l'état de phosphorylation de CIRBP, plus précisément de la thréonine 169 (Thr169) [329], 2×10^6 cellules LoVo ont étéensemencées dans une boîte de culture de 10cm de diamètre, 48h avant l'infection. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 10h avec *Lm* à MOI 30, lavées de 2x fois avec du PBS 1X froid, puis lysées avec 500 μ L de tampon de lyse (tableau 7.10). Les tapis de lyse ont été décollés doucement de la boîte avec un racloir, puis transférés dans un tube de 2 mL avant d'être incubés sur glace pendant 30 min et vortexés régulièrement. Les lysats sont ensuite clarifiés 10 min à $16\,000 \times g$ à 4°C et le surnageant est divisé en 2 fractions : 10% du surnageant (environ 35 μ L) va être utilisé comme input (fraction totale) et mélangé à 12 μ L de tampon SB 4X (tableau 7.7), dénaturé à 95°C pendant 5min, puis conservés à -20°C jusqu'à la fin de l'immunoprécipitation; et le reste du surnageant va être incubé avec 30 μ L de billes (Dynabeads™ Protein G, Invitrogen, ref:10004D) conjuguées à un anticorps anti-CIRBP (tableau 7.14). Les billes ont été préparées au préalable de la manière suivante : le contenant est vortexé pendant 30s avant de prélever 30 μ L de billes par échantillon, qui sont placées dans un tube de 1,5 mL sur un portoir magnétique préalablement refroidi. Le surnageant des billes est aspiré et elles sont resuspendues dans 7,5 μ L d'anticorps anti-CIRBP dilués dans 100 μ L de PBS à 0.1% de Tween-20® (Sigma, P1379) (PBS-T). Les billes sont alors incubées sur roue à 4°C pendant 90 min, le surnageant est ensuite aspiré et les billes sont lavées 15min avec 130 μ L de PBS-T, aspiré aussi avant d'ajouter les lysats. Le mélange billes + lysat est incubé sur la nuit sur roue à 4°C. Le lendemain, le milieu est aspiré et les billes sont lavées 2x avec 250 μ L de tampon de lavage IP (tableau 7.11) sur roue à 4°C pendant 5min et placées dans 200 μ L de tampon de lavage IP dans un nouveau tube pour un dernier lavage. Les billes sont ensuite resuspendues dans 20 μ L de tampon SB 4X et dénaturées 5 min à 95°C. Les tubes sont de nouveau posés sur le portoir magnétique et les protéines sont séparées des billes et transférées dans un nouveau tube.

Les expériences de SDS-PAGE et d'immunodétection sont ensuite réalisées comme décrit dans l'article [75] sur les fractions Inputs et immunoprécipitées, à la différence que le transfert des protéines se fait sur une membrane de PVDF activée 5min avec de l'éthanol 100%. Les protéines comportant une thréonine phosphorylée sont détectées par un anticorps anti-phospho-thréonine, et un anticorps anti-tubuline sert de témoin de charge (tableau 7.14).

*Le DTT, les inhibiteurs de protéase et de phosphatase sont à ajouter juste avant la lyse ou le lavage respectivement.

Réactif	Concentration
Tris-HCl pH 4	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
Igepal®	0,5%
DTT	1 mM
Inhibiteurs de protéases 50X	1X
Inhibiteurs de phosphatase 100X	1X
H ₂ O	/

Table 7.10: Composition du tampon de lyse pour immunoprécipitation.

Réactif	Concentration
Tris-HCl pH 4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
Igepal®	0,05%
Inhibiteurs de protéases 50X	1X
Inhibiteurs de phosphatase 100X	1X
H ₂ O	/

Table 7.11: Composition du tampon de lavage pour immunoprécipitation.

7.7.1.1 Localisation des ARN CIRBP-201 et CIRBP-210

7.7.1.1.1 Préparation des échantillons sm-FISH et acquisition des images

Pour localiser les ARN de CIRBP-201 et CIRBP-210 respectivement, j'ai utilisé la technique de l'hybridation fluorescente *in situ* de molécule unique (single molecule Fluorescent *in situ* hybridization, sm-FISH). Des cellules LoVo ont été ensemencées à $1,5 \times 10^5$ cellules/mL dans une plaque de culture format 12-puits avec des lamelles de 18mm de diamètre stériles et 48h plus tard, infectées comme décrit dans l'article [75] pendant 10h. Deux sets de sondes fluorescentes (24 sondes à fluorophore Quasar® 670 et 25 sondes à fluorophore Quasar® 670) ont été éditées à l'aide du logiciel "Stellaris® Probe Designer". Le premier set cible spécifiquement le 3'-UTR de CIRBP-201 et le second set est réparti sur le CDS commun aux deux isoformes et sur le 3'-UTR de CIRBP-210 (CIRBP-CDS). La combinaison de ces deux sets de sondes permettrait de discriminer les isoformes tout en gardant l'information sur la quantité totale de CIRBP (figure 7.3). L'expérience de sm-FISH a été préparé en suivant le protocole fourni par le fabricant de sonde ("Stellaris® RNA FISH, protocol for adherent cells"), à la différence que les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% au lieu d'une solution de formaldéhyde à 3,7% et que le montage des lames s'est fait avec du Fluoromount-G™ (FP-483331) plutôt que du Vectashield™. Les noyaux ont été marqués avec 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 ng/mL) et le cytoplasme avec du Acti-stain 488 phalloïdin (Cytoskeleton #PHDG1-A, 70 nM). Les préparations ont été observées avec un microscope à épifluorescence Nikon® Ti, connecté à une caméra digitale CMOS (Orca® Flash 4.0, Hamamatsu). L'illumination s'est faite avec un SOLA-SE 365 source (Lumencor) et le set de filtres dichroïques d'excitation/d'émission suivant : DAPI, 377(50)/447(60)/FF409-Di03; Acti-Stain 488, 472(30)/520(35)/FF495-Di03, CIRBP-201, 630(30)/684(24)/dic FF655-Di01; and Cy3 or CIRBP Total + 210, 543(22)/586(20)/4FF562-TRITC. Les images ont été acquises avec l'objectif Nikon apochromat 60X (NA 1.4) et traitées avec le logiciel MicroManager (1.4.22). Toutes les images ont été acquises avec des valeurs uniformes d'exposition.

Sondes FISH pour CIRBP-Total et 210

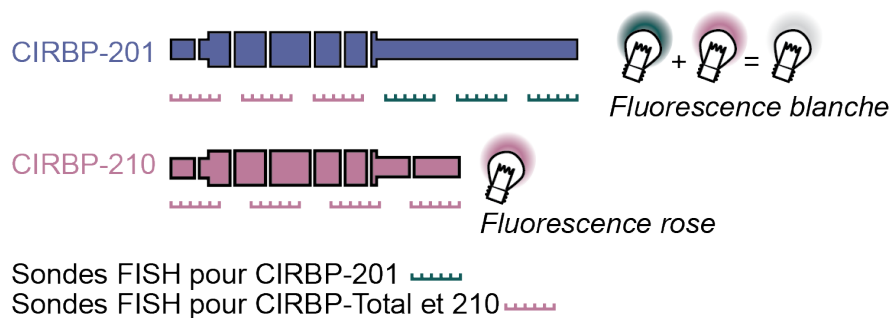


Figure 7.3: Localisation des sondes FISH sur les transcrits de CIRBP. Le jeu de sondes représenté en rose va se lier au 5'-UTR et à l'ORF commun à CIRBP-201 et CIRBP-210 et au 3'-UTR de CIRBP-210. Les ARNm de CIRBP-210 vont être marqués en rose exclusivement. Le jeu de sondes représenté en vert va lier exclusivement le 3'-UTR de CIRBP-201. Les ARNm de CIRBP-201 vont être marqués en rose et en vert, et l'addition des signaux émet un signal blanc.

7.7.1.1.2 Analyses des images de sm-FISH

Avec Fiji (1.53v), chaque image a été séparée en 8 images (une par canal pour les régions nucléaire et cytoplasmique respectivement) à l'aide de macros "Nuc.ijm" et "cyto.ijm" (Disponibles sur le [dépositaire github](#)). Pour compter le nombre de points fluorescents correspondant à CIRBP-201 (addition de la fluorescence des deux sets de sonde) et à CIRBP-210 (fluorescence d'un set de sonde seulement) respectivement, j'ai utilisé le logiciel CellProfiler (4.2.0). L'ensemble de fonctions rassemblées sous "FISH_CIRBP_Nuc.ccpj" (Disponible sur le [dépositaire github](#)) avec le canal DAPI comme critère de contrôle (rule criteria), c'est-à-dire que l'intensité de chaque foyer sera normalisée par rapport à celle du DAPI, permettant ainsi de ne prendre en compte que les foyers vrais. Cette macro a été utilisé pour quantifier les isoformes dans le noyau. L'ensemble de fonctions rassemblées sous "FISH_CIRBP_cyto.ccpj" (Disponible sur le [dépositaire github](#)) avec le canal phalloïdine comme critère de contrôle a été utilisé pour quantifier les isoformes dans le cytoplasme. Le nombre de foyers 201 correspond au nombre de foyers comptés dans le canal CIRBP-201 et le nombre de foyers CIRBP-210 correspond au nombre de foyers CIRBP-CDS moins les foyers CIRBP-201 (CIRBP-210 = CIRBP-CDS - CIRBP-201). Les nombres de foyers de CIRBP-201 et CIRBP-210 ont ensuite été divisés par le nombre de noyau par image pour avoir un nombre moyen de foyer par cellule pour chaque image.

7.7.1.2 Localisation cellulaire des protéines CIRBP-201 et CIRBP-210 dans des cellules infectées

Travail réalisé par **Anna Kurowska** de février à juin 2021*

7.7.1.3 Préparation des échantillons d'immunofluorescence

Des cellules LoVo ont été ensemencées à $1,5 \times 10^5$ cellules/mL dans une plaque de culture format 24-puits avec des lamelles de 12 mm et transfectées avec les siARN décrits dans l'article [75] inhibant l'expression de CIRBP dans son ensemble ou de manière isoforme-spécifique. Les protocoles de transfections ont été décrit plus haut dans le chapitre. Les cellules infectées 48h plus tard avec Lm pour 10h [75]. Avant le marquage par immunofluorescence des protéines d'intérêt, les cellules ont été perméabilisées dans les puits pendant 5min avec du PBS - 0,5% Triton X-100 (Euromedex #200-B) et bloquées pendant 30min à température ambiante dans du PBS - 0,05% Tween - 5% BSA. L'anticorps primaire anti-CIRBP a été dilué au 1000^e dans du PBS - 5% BSA et chaque lamelle a été incubée avec $30 \mu\text{L}$ d'anticorps pendant 1h à température ambiante dans une chambre humidifiée. Les lamelles ont ensuite été rincées 3x dans du PBS, séchées par capillarité sur un papier absorbant, puis incubées avec l'anticorps secondaire conjuguée à une sonde fluorescente "anti-rabbit Cy3 (H+L)" (Jackson ImmuneResearch cat#111-165-144, dilution au 500^e), de l'ActiStain 670 Phalloïdine (PHDNI, Cytoskeleton, dilution au 200^e) et du DAPI (dilution au 500^e) pendant 40min à température ambiante en chambre noire humidifiée. Les lamelles ont été ensuite lavées deux fois

avec du PBS 1X, une fois avec de l'eau à grade moléculaire et asséchées sur un papier absorbant. Le montage final des lamelles sur des lames s'est fait avec 7 μ L du Fluoromount-G™. Les références des anticorps sont disponibles dans le tableau 7.14.

7.7.1.4 Traitement des images d'immunofluorescence

Les images ont été acquises en un seul plan et trois canaux (DAPI, actine et CIRBP), et l'intensité et le contraste des images ont été uniformisés, selon le protocole déposé sur sa page [github](#). Les intensités des signaux nucléaire et cytoplasmique ont été mesurés avec l'outil "Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm" (RRID:SCR_018573) dans le logiciel Fiji avec les paramètres par défaut et en utilisant le DAPI comme marquage de référence. L'outil "Select Area manager" a été utilisé pour restreindre les mesures à 100-150 cellules par condition, qui respectaient des critères d'intégrité, d'infection et de distinction claire des noyaux. Les intensités nucléaires et cytoplasmiques ont été normalisées pour chaque image par le nombre de cellules par image et par la valeur de l'intensité totale de β -tubuline.

7.7.2 Localisation cellulaire de la protéine dans des cellules incubées avec de la LLO

7.7.2.1 Répartition de CIRBP entre le cytoplasme et le noyau

7.7.2.1.1 Localisation de la protéine CIRBP par immunofluorescence

*Immunofluorescences réalisées par Anouk Viry d'octobre à décembre 2022, analyse des images réalisées par Anouk Viry et Morgane Corre**

Des cellules LoVo ont étéensemencées à $1,5 \times 10^5$ cellules/mL dans une plaque de culture format 24-puits avec des lamelles de 12mm et incubées 48h plus tard avec de LLO à 4,5 nM pendant 15, 30, 45 et 60min. Le protocole d'immunofluorescence et d'acquisition des images décrit ci-dessus a été appliqué pour chaque échantillon. Les images ont été traitées sous Fiji. Chaque image est en un seul plan et possède 3 canaux (CIRBP, le DAPI et la phalloïdine). Chaque image est séparée par canaux. Pour récupérer l'intensité de CIRBP dans le noyau, les commandes suivantes sont appliquées :

- Sur l'image du canal DAPI:
 - Image > Adjust threshold > Default / Red / Dark Background et ajuster le seuil pour couvrir au mieux la surface des noyaux
 - Process > Binary > Make binary, pour avoir une image en noir et blanc
 - Edit > Selection > Create selection, pour avoir le contour des noyaux
- Sur l'image du canal CIRBP:
 - Edit > Selection > Restore selection, pour restaurer les contours des noyaux
 - Analyze > Set Measurement > Mean Gray Value / Integrated density / Area, pour récupérer les valeurs d'intensité de CIRBP dans les noyaux
 - Analyze > Set Scale > Distance in pixels = 9,2592 pour 1 μ M
 - Analyze > Measure
- Sur le canal phalloïdine :
 - Edit > Selection > Restore selection, pour restaurer les contours des noyaux
 - Edit > Clear, pour soustraire les noyaux aux surfaces des cytoplasmes
 - Image > Adjust threshold > Default / Red / Dark Background et ajuster le seuil pour couvrir au mieux la surface des cytoplasmes
 - Process > Binary < Make binary, pour avoir une image en noir et blanc
 - Edit > Selection > Create selection, pour avoir le contour des cytoplasmes
- Sur l'image du canal CIRBP:
 - Répéter les actions précédemment exécutées sur ce même canal.

Les tables de valeurs d'intensité dans le cytoplasme et dans le noyau de CIRBP en condition d'incubation à différents temps avec la LLO a ensuite été traitée sous R.

7.7.2.1.2 Fractionnement cellulaire et immunodétection

Le protocole suivant se réalise sur glace pour préserver l'intégrité des échantillons. Des cellules LoVo incubées 30 ou 60min dans de la LLO à 4,5nM dans des boîtes de culture de 10cm de diamètre sont incubées 5min avec 1mL de trypsine pour être décollées, re-suspendues dans 1 mL de DMEM et culotées 5min à 300 xg. Le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées une fois avec 1mL de PBS froid et re-suspendues dans 280 μ L de tampon hypotonique (tableau 7.12). Après 4min d'incubation sur glace, de l'Igepal® préalablement dilué dans du tampon hypotonique est ajouté à 0,3% et les échantillons sont incubés 3min sur glace avant d'être lysés en passant 15x dans une seringue de 1mL avec une aiguille de gauge 26 et vortexés. Les fractions nucléaires et cytosolique sont ensuite séparées en centrifugeant les échantillons 5min à 15000 xg à 4°C. Le surnageant, soit la fraction **cytosolique**, est transvasé dans un nouveau tube de 1,5 mL et clarifié 5min à 15000 xg à 4°C. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et la concentration de chaque échantillon est déterminée par dosage colorimétrique de Bradford. Les noyaux sont re-suspendus dans 300 μ L de tampon isotonique (tableau 7.12) à 0,2% d'Igepal® pendant 10min avec des étapes de vortex régulières. Les **noyaux** sont ensuite culotés 4min à 1000 xg à 4°C puis re-suspendus dans 100 μ L de RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) (tableau 7.13) et incubés pendant 20min, en vortexant de temps en temps. Les lysats sont ensuite passés une dizaine de fois à travers une seringue de 1mL à gauge de 26 et leur concentration est mesurée par dosage colorimétrique de Bradford. Pour les fractions cytosoliques et nucléaires, 40 ng de protéines sont re-suspendues dans du SB 1X à un volume ajusté de 35 μ L. La détection de CIRBP dans les différentes fractions se fait par immunodétection avec un anticorps anti-CIRBP, un témoin de charge cytosolique, un anticorps anti- β -tubuline et un témoin de charge nucléaire, un anticorps anti-fibrillarine (tableau 7.14). Après acquisition des images, les intensités des bandes correspondants à CIRBP et aux marqueurs ont été quantifiées dans le logiciel Fiji et normalisées par rapport au bruit de fond de la région d'intérêt. La valeur d'intensité pour CIRBP a été normalisée par celle du témoin de charge correspondant pour obtenir l'intensité normalisée de chaque bande.

Réactif	Tampon hypotonique (concentration finale)	Tampon isotonique (concentration finale)
Tris-HCl pH 7,4	20 mM	20 mM
KCl	10 mM	150 mM
MgCl ₂	2 mM	2 mM
EGTA	1 mM	1 mM
PMSF	0,5mM	0,5mM
DTT	0,5 mM	0,5 mM
Cocktail d'inhibiteurs de protéase	1X	1X
H ₂ O		

Table 7.12: Composition des tampons hypotonique et isotonique.

7.7.2.2 Détection de CIRBP dans le surnageant des cellules

Le protocole suivant se réalise sur glace pour préserver l'intégrité des échantillons. Le surnageant de cellules LoVo ou THP-1 incubées pendant 30 et 60min avec 4,5nM de LLO dans une boîte de culture de 10cm de diamètre ou plus est récupéré dans un tube de 15mL et clarifié 1min à 16000 xg à 4°C. Le surnageant est filtré avec un filtre de 0.2 μ m, additionné de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) à 0,5 mM et du sodium déoxycholate à 0.2mg/mL. Les échantillons sont incubés 30min sur glace, additionnés avec de l'acide trichloracétique à 12,5% et incubés sur roue en chambre froide à 4°C. Le lendemain, les protéines précipitées sont culotées 15 min à 16000 xg à 4°C, lavées 2 fois avec 500 μ L d'acétone glaciale et transvasées dans un tube à faible adhésion moléculaire "protein lobind (Eppendorf #0030108116)" de 1,5 mL lors du premier lavage. Après le deuxième lavage, le plus d'acétone possible est retiré à la pipette et les échantillons sont brièvement séchés sous hotte aspirante, puis re-suspendus dans 200 μ L de tampon SB 1,5X (tableau 7.7) et incubés au moins 2h sur roue à température ambiante. Les protéines sont ensuite dénaturées 5min à 95°C. Pour l'immunoblot, 2x 35 μ L sont déposés sur un gel d'acrylamide à 12% et

Reagent	Final concentration
NaCl	150 mM
Igepal®	1%
SDS 20%	0,1%
Sodium deoxycholate	1%
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
PMSF	1 mM
Cocktail d'inhibiteurs de protéase	1X
Benzonase	1X
H ₂ O	/

Table 7.13: Composition du RIPA.

le reste de l'expérience est décrit dans l'article [75], à la différence que la coloration de la membrane au rouge ponceau après le transfert fait office de témoin de charge.

Antigène	Espèce	Source	Référence	MW (kDa)	Dilution
Phospho-Threonine	Rabbit	Cell signaling	9386	/	1/1000
Fibrillarine	Rabbit	Abcam	ab5821-100	34	1/2000
GAPDH	Rabbit	Cell signaling	2118	37	1/1000
β -Tubulin	Mouse	BioLegend	BLE903401	55	1/2000
CIRBP	Rabbit	Proteintech	10209-2-AP	19	1/500

Table 7.14: Anticorps utilisées pour les immunodétections et immunofluorescences.

7.8 Caractérisation des transcrits affectés par un événement d'épissage alternatif au cours de l'infection par *Lm*

Pour déterminer des caractéristiques communes entre les isoformes affectés par un événement d'épissage alternatif au cours de l'infection, j'ai récupéré les identifiants des gènes associés à ces événements (paragraphe 8.3 en annexes). A partir de la table de résultats des analyses de changements d'isoformes des données séquencées en lecture longue, j'ai récupéré les identifiants des isoformes correspondant aux gènes affectés et je les ai ordonnés en fonction de leur sens de régulation (surexprimé ou sous-exprimé). Pour le groupe contrôle, j'ai généré une liste aléatoire d'un nombre égal de noms de gènes non-affectés par des événements d'épissage alternatifs et j'ai récupéré les isoformes associés comme décrit ci-dessus. Grâce à l'outil BiomaRt [584], [585], j'ai récupéré les informations nécessaires pour chaque isoforme et j'ai comparé pour chaque valeur, les moyennes de chaque groupe (surexprimé, sous-exprimé, contrôle) avec un test statistique One-way ANOVA suivi d'une analyse post-hoc suivant le test de Tukey (paragraphe 4.3, figures 4.1 et 4.2). Le code et les listes de gènes sont disponibles sur le [dépositaire github](#). En annexe, [paragraphe 8.3](#) se trouve la liste des gènes subissant un événement d'épissage alternatif statistiquement significatif.

8 Annexes

Table des matières

8.1	Table de description des cytolysines bactériennes	182
8.2	Table de description des différents types de transcrits	184
8.3	Table de caractérisation des transcrits épissés alternativement au cours de l'infection et des transcrits contrôles	186
8.4	Gels originaux d'estimation de la surexpression de la protéine CIRBP par immunodétection	195
8.5	Quantification de l'inhibition des protéines SMG en RT-qPCR	196
8.6	Gels originaux d'estimation de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules infectées par immunodétection	197
8.7	Gels originaux de quantification de la protéine CIRBP dans le noyau et le cytoplasme par immunodétection	198
8.8	Gels originaux d'estimation de la quantité de protéine CIRBP en cas d'inhibition du NMD par immunodétection	199
8.9	Gels originaux de quantification de la protéine CIRBP dans des cellules infectées et non-infectées	200
8.10	Gels originaux de quantification de la phosphorylation des protéines SRSF dans des cellules incubées avec de la LLO par immunodétection	201
8.11	Inhibition de CIRBP par siARN	202
8.11.1	Résultats de RT-qPCR	202
8.11.2	Gels originaux d'immunodétection de CIRBP en condition d'inhibition de son expression	203

En annexes sont présentés des résultats non-nécessaires à la compréhension du projet mais qui offrent des informations complémentaires aux concepts exposés dans le chapitre résultat. Dans les deux premières sections sont contenus des tableaux récapitulatifs des différents types de cytolysines et des différents types de transcrits]. Ensuite sont présentés les gènes subissant un épissage alternatif statistiquement significatif au cours de l'infection. Les sections suivantes présentent les versions non-coupées des gels d'immunodétection présentés dans le chapitre Résultats, ainsi que la quantification et la validation de l'efficacité des siARN à inhiber l'expression des protéines SMG en RT-qPCR. Enfin, la dernière section valide et quantifie l'efficacité des siARN à inhiber l'expression de CIRBP et de ses isoformes, tant en RT-qPCR qu'en immunodétection.

8.1 Table de description des cytolysines bactériennes

Bactérie	Cytolysine	Récepteur	Taille du pore (nm)	MW (kDa)	Type	Classe
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenylate cyclase-hemolysin toxin (CyaA)	-	-	233	α	RTX
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aerolysin	Protéines GPI-ancrées	2–3	54	β	Aérolysine
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax toxin (PA moiety)	TEM8/CMG2	1–2	86	β	-
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrolysin O (ALO)	Cholestérol	250–350	57	β	CDC
<i>Bordetella pertussis</i>	Bifunctional haemolysin–adenylyl cyclase toxin (CyaA)	-	-	200	$\alpha?$	RTX
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulinolysin	Cholestérol	250–350	58	β	CDC
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Bth-MACPF (BT 3439)	-	-	124	β	MACPF
<i>Mobiluncus curtisii</i>	CAMP	Protéines GPI-ancrées	-	25	α	CAMP
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CAMP	Protéines GPI-ancrées	-	24	α	CAMP
<i>Escherichia coli</i>	Colicin A	Membranes bactériennes	-	44	α	Colicine
<i>Escherichia coli</i>	Colicin B	Membranes bactériennes	-	55	α	Colicine
<i>Escherichia coli</i>	Colicin E1	Membranes bactériennes	-	57	α	Colicine
<i>Escherichia coli</i>	Colicin Ia	Cir	2	67	α	Colicine
<i>Escherichia coli</i>	Colicin N	Membranes bactériennes	-	35	α	Colicine
<i>E. coli, S. enterica, S. flexneri</i>	Cytolysin A (ClyA)	Cholestérol	-	70	α	Cytolysine A
<i>Clostridium perfringens</i>	Enterotoxin (CPE)	Claudine	-	36	β	Aérolysine
<i>Bacillus cereus</i>	Haemolysin BL (Hbl)	Cholestérol	-	52	α	Cytolysine A
<i>Escherichia coli</i>	HlyA	β Intégrine 2	-	65	$\alpha?$	RTX
<i>Chlorohydra viridissima</i>	Hydralysin-1	-	1–2	26	β	Aérolysine
<i>Streptococcus intermedius</i>	Intermedilysin (ILY)	CD59/Cholestérol	250–350	58	β	CDC
<i>Streptococcus intermedius</i>	Intermedilysin (ILY)	Cholestérol, CD59	-	104	β	CDC
<i>Listeria ivanovii</i>	Ivanolysin	Cholestérol	250–350	59	β	CDC
<i>Streptococcus mitis</i>	Lectinolysin (LLY)	Cholestérol, CD59	-	33	β	CDC
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leukocidins	Récepteurs de chemokines	-	33	β	Hémolysine
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolysin O (LLO)	Cholestérol	250–350	59	β	CDC
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MARTX	-	-	450	$\alpha?$	RTX
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Monalysin	-	-	30	β	Aérolysine
<i>Clostridium perfringens</i>	Necrotic enteritis toxin B (NetB)	Cholestérol	-	34	β	Hémolysine

Bactérie	Cytolysine	Récepteur	Taille du pore (nm)	MW (kDa)	Type	Classe
<i>Bacillus cereus</i>	Non-haemolytic tripartite enterotoxin (Nhe)	Cholestérol	-	37	α	Cytolysine A
<i>Clostridium perfringens</i>	Perfringolysin O (PFO)	Cholestérol	25–35	56	β	CDC
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Plu-MACPF	-	-	57	β	MACPF
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumolysin (PLY)	Cholestérol	25–35	53	β	CDC
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Pyolysin	Cholestérol	25–35	62	β	CDC
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Streptolysin O (SLO)	Cholestérol	25–30	64	β	CDC
<i>Streptococcus suis</i>	Suilysin (SLY)	Cholestérol	-	54	β	CDC
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanolysin	Cholestérol	25–35	59	β	CDC
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> cytolysin (VCC)	Glycoconjugués	-	80	β	Hémolysine
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i> haemolysin (VVH)	Sucres complexes et glycosphingolipides	-	51	β	Hémolysine
<i>Helicobacter pylori</i>	Vacuolating cytotoxin (VacA)	Mutliples	6–10	140	β	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Vaginolysin	CD59/Cholestérol	250–350	57	β	CDC
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	XaxAB	-	-	1118	α	Cytolysine A
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YaxAB	-	-	851	α	Cytolysine A
<i>Staphylococcus aureus</i>	α -haemolysin (Hla)	PC/ADAM10/disintégrine	2–3	36	β	Hémolysine
<i>Clostridium perfringens</i>	α -toxin	Protéines GPI-ancrées	-	33	β	Aérolysine
<i>Staphylococcus aureus</i>	γ -haemolysin (Hlg)	Récepteurs de chemokines	-	273	β	Hémolysine
<i>Clostridium perfringens</i>	δ -toxin	Ganglioside monosialique 2 (GM2)	-	26	β	Hémolysine
<i>Clostridium perfringens</i>	σ -toxin	HAVCR1, MAL	-	33	β	Aérolysine

Table 8.1: Tableau inspiré de Li *et al.* [50], Peraro *et al.* [51] et Hamon *et al.* [54] .

8.2 Table de description des différents types de transcrits

Groupe	Type	Nom complet	Définition
Cible de dégradation	NMD	Nonsense-mediated Decay	Transcrit avec un codon stop prématuré potentiellement dégradé par le NMD
Cible de dégradation	NSD	Nonstop-mediated Decay	Transcrit sans codon stop potentiellement dégradé par le NSD
ARNInc	3' overlapping ncRNA	3' Overlapping non-coding RNA	Long transcrit chevauchant le 3'-UTR d'un transcrit codant sur le même locus
ARNInc	Antisense	/	Transcrit chevauchant un transcrit codant sur le brin opposé
ARNInc	Macro lncRNA	Macro long non-coding RNA	ARNInc non-épissé de plusieurs kb
ARNInc	Non coding	/	Transcrit décrit dans la littérature comme non-codant
ARNInc	Retained intron	/	Transcrit ayant retenu une séquence intronique par rapport aux transcrits codants du même gène
ARNInc	Sense intronic	/	Long transcrit dans l'intron d'un transcrit codant sur le même brin
ARNInc	Sense overlapping	/	Long transcrit contenant un transcrit codant dans un de ses introns sur le même brin
ARNInc	lincRNA	long intergenic ncRNA	ARNInc dans une région intergénique
ARN non-codants	miRNA	MicroRNA	Petit ARN (+/- 22bp) inhibant l'expression d'un ARN cible
ARN non-codants	miscRNA	Miscellaneous RNA	ARN non-codant non classifiable
ARN non-codants	piRNA	Piwi-interacting RNA	ARN interagissant avec les protéines piwi dans l'inhibition de l'expression des gènes
ARN non-codants	rRNA	Ribosomal RNA	ARN composant des ribosomes
ARN non-codants	siRNA	Small interfering RNA	Petit ARN (20-25 bp) inhibant l'expression d'un ARN cible par la voie ARN interférence
ARN non-codants	snRNA	Small nuclear RNA	Petit ARN nucléaire impliqué dans la maturation des ARNm
ARN non-codants	snoRNA	Small nucleolar RNA	Petit ARN nucléolaire impliqué dans la modification post-transcriptionnelle d'autres ARN
ARN non-codants	tRNA	Transfer RNA	ARN impliqué dans la traduction des ARNm
ARN non-codants	vaultRNA	/	petit ARN composant le complexe ribonucléique "Vault"
Codant	Protein coding	/	Transcrit contenant un ORF
Codant	Protein coding CDS not defined	/	Transcrit alternatif d'un transcrit codant pour lequel aucun ORF n'a été identifié
Pseudogène	Polymorphic pseudogene	/	Transcrit non-codant en raison d'un SNP ou indel mais codant dans d'autres individus
Pseudogène	Processed pseudogene	/	Transcrit sans intron originant de la reverse transcription d'un ARNm avant sa réinsertion dans le génome

Type	Type	Nom complet	Définition
Pseudogène	Transcribed pseudogene	/	Transcrit dont l'homologie protéique ou la structure génomique indique un pseudogène mais la présence de transcrits locus spécifiques indique de l'expression
Pseudogène	Translated pseudogene	/	Pseudogène dont des données de spectrométrie de masse indiquent qu'il est traduit
Pseudogène	Unitary pseudogene	/	Pseudogène spécifique de l'espèce sans gène parent mais avec un orthologue actif dans d'autres espèces
Pseudogène	Unprocessed pseudogene	/	Pseudogène avec un intron originant d'une duplication de gène
Readthrough	Readthrough	/	Transcrit avec des exons chevauchant au moins deux autres loci
Readthrough	Stop codon readthrough	/	Séquence codant dont la traduction se poursuit après le codon stop
TEC	TEC	To be experimentally confirmed	Région présentant les caractéristiques d'un transcrit mais qui doit être validée expérimentalement

Table 8.2: Tableau descriptif des différents types de transcrits.

8.3 Table de caractérisation des transcrits épissés alternativement au cours de l'infection et des transcrits contrôles

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
ABI1	ENSG00000136754	0.3517	0.9825	26751783-26759062	chr10
ABI1	ENSG00000136754	-0.3517	0.9825	26755741-26759062	chr10
ADGRL1	ENSG00000072071	0.3138	0.9744	14160297-14161312	chr19
ADGRL1	ENSG00000072071	-0.3138	0.9744	14160297-14160593	chr19
ADIRF	ENSG00000148671	0.3196	0.9701	86968606-86970199	chr10
AK2	ENSG00000004455	0.2052	0.9648	33012358-33013043	chr1
AK2	ENSG00000004455	-0.2069	0.9689	33010833-33013207	chr1
AK2	ENSG00000004455	0.1926	0.9567	33010834-33011447	chr1
AKR1A1	ENSG00000117448	-0.2345	0.974	45551155-45552436	chr1
ANKRD10	ENSG00000088448	0.2784	0.987	110893263-110906033	chr13
ANKRD10	ENSG00000088448	-0.2309	0.982	110893263-110894109	chr13
ANKRD11	ENSG00000167522	0.2388	0.954	89291183-89305206	chr16
ARHGAP28	ENSG00000088756	0.1854	0.954	6873775-6882137	chr18
ARHGAP28	ENSG00000088756	-0.1854	0.954	6876208-6882137	chr18
ARHGEF2	ENSG00000116584	-0.2223	0.9855	155966480-155966819	chr1
ARHGEF2	ENSG00000116584	0.1976	0.9588	155966479-155966820	chr1
ARHGEF2	ENSG00000116584	-0.2841	0.981	155969300-155978365	chr1
ARMC6	ENSG00000105676	0.2346	0.9547	19034013-19042711	chr19
ARPP19	ENSG00000128989	-0.1219	0.9726	52557222-52564190	chr15
ARSJ	ENSG00000180801	0.225	0.9811	113903675-113978437	chr4
ASPH	ENSG00000198363	-0.1818	0.97	61643433-61643945	chr8
ASPH	ENSG00000198363	0.1818	0.97	61643433-61644600	chr8
ATL2	ENSG00000119787	0.1429	0.9583	38343512-38377143	chr2
ATP6V1G2	ENSG00000254870	0.2867	0.9997	31532912-31535366	chr6
ATP6V1G2	ENSG00000254870	-0.2867	0.9997	31532911-31535367	chr6
B3GALNT2	ENSG00000162885	-0.2494	0.9831	235484515-235489168	chr1
B3GALNT2	ENSG00000162885	-0.2388	0.9542	235489268-235494681	chr1
B3GALNT2	ENSG00000162885	0.2388	0.9542	235484515-235494681	chr1
BAG1	ENSG00000107262	-0.2096	0.9895	33261169-33262702	chr9
BAG1	ENSG00000107262	0.2096	0.9895	33261169-33262105	chr9
BCAP29	ENSG00000075790	-0.1965	0.953	107620479-107621629	chr7
BCAP29	ENSG00000075790	0.1965	0.953	107613432-107621630	chr7
BCL2L12	ENSG00000126453	-0.4571	1	49669115-49670216	chr19
BCL2L12	ENSG00000126453	0.371	0.9995	49669115-49673698	chr19
BCL2L12	ENSG00000126453	0.3652	0.9762	49669115-49673698	chr19
BCL2L12	ENSG00000126453	-0.3548	0.9668	49670488-49673698	chr19
BCL2L13	ENSG00000099968	-0.2224	0.9847	17689142-17696141	chr22
BRD9	ENSG00000028310	0.3016	0.9991	889766-891155	chr5
BRD9	ENSG00000028310	-0.2706	0.9948	889647-891155	chr5
BTBD2	ENSG00000133243	0.225	0.9804	1997463-2013547	chr19
BTBD2	ENSG00000133243	-0.2248	0.9797	1997463-2015297	chr19
C11orf24	ENSG00000171067	-0.3397	0.9692	68261725-68262731	chr11
C11orf24	ENSG00000171067	0.3336	0.9666	68261803-68262462	chr11
C1orf52	ENSG00000162642	0.3041	0.9567	85258722-85258935	chr1
C1orf52	ENSG00000162642	-0.3041	0.9567	85258722-85259358	chr1

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
CALD1	ENSG00000122786	-0.1725	0.9809	134933390-134935688	chr7
CALM2	ENSG00000143933	0.1712	0.9859	47170764-47176441	chr2
CALM2	ENSG00000143933	-0.169	0.9888	47170764-47172414	chr2
CCNQ	ENSG00000262919	0.2215	0.9623	153588454-153592506	chrX
CD46	ENSG00000117335	-0.2035	0.9675	207767195-207767779	chr1
CD46	ENSG00000117335	0.2274	0.9838	207767195-207770321	chr1
CD46	ENSG00000117335	0.2764	0.9997	207767195-207770321	chr1
CD46	ENSG00000117335	-0.2948	0.9999	207767823-207770321	chr1
CDC42BPA	ENSG00000143776	0.1835	0.9506	227048010-227069777	chr1
CDK10	ENSG00000185324	0.3184	0.957	89694041-89694172	chr16
CDK10	ENSG00000185324	-0.3184	0.957	89693467-89694173	chr16
CIRBP	ENSG00000099622	0.3413	1	1272051-1274307	chr19
CIRBP	ENSG00000099622	-0.3415	1	1272051-1272427	chr19
CLASP1	ENSG00000074054	0.2367	0.9967	121407715-121410866	chr2
CLASP1	ENSG00000074054	0.1862	0.9535	121407715-121410866	chr2
CLASP1	ENSG00000074054	-0.2367	0.9967	121409047-121410866	chr2
CLN6	ENSG00000128973	0.2336	0.9567	68211318-68211556	chr15
CMC2	ENSG00000103121	-0.3615	0.9915	80981877-80997314	chr16
CMC2	ENSG00000103121	0.4112	0.9977	80976179-80997314	chr16
CPNE1	ENSG00000214078	-0.1683	0.9574	35659014-35664760	chr20
CSNK2A1	ENSG00000101266	-0.2581	0.9911	508660-527933	chr20
CUTC	ENSG00000119929	-0.6257	0.9999	99747390-99750369	chr10
CUTC	ENSG00000119929	0.6257	0.9999	99747390-99754529	chr10
CUTC	ENSG00000119929	0.6934	1	99747390-99754529	chr10
CUTC	ENSG00000119929	-0.6934	1	99750396-99754529	chr10
DAZAP1	ENSG00000071626	0.1146	0.9503	1422396-1428842	chr19
DCAF6	ENSG00000143164	0.2698	0.9635	168004793-168043025	chr1
DCUN1D3	ENSG00000188215	0.2411	0.9784	20862643-20900204	chr16
DCUN1D3	ENSG00000188215	-0.2435	0.9817	20862643-20896308	chr16
DDX19B	ENSG00000157349	0.2939	0.9991	70299354-70314902	chr16
DDX19B	ENSG00000157349	-0.3218	0.9968	70299354-70312609	chr16
DDX19B	ENSG00000157349	-0.2943	0.999	70312657-70314902	chr16
DDX19B	ENSG00000157349	0.211	0.9792	70299354-70314902	chr16
DDX39B	ENSG00000198563	0.2328	0.9933	31532912-31534485	chr6
DDX39B	ENSG00000198563	-0.2599	0.9985	31532911-31535367	chr6
DDX39B	ENSG00000198563	-0.3383	1	31532911-31535367	chr6
DDX39B	ENSG00000198563	0.3383	1	31534512-31535366	chr6
DGLUCY	ENSG00000133943	-0.2407	0.9757	91147858-91157639	chr14
DGLUCY	ENSG00000133943	0.233	0.9981	91114994-91157639	chr14
DLG5	ENSG00000151208	0.2124	0.9637	77848327-77853354	chr10
DLG5	ENSG00000151208	-0.2121	0.9619	77843706-77853354	chr10
DMKN	ENSG00000161249	0.205	0.9854	35497538-35498598	chr19
DMKN	ENSG00000161249	0.195	0.9788	35497538-35498598	chr19
DNAJC17	ENSG00000104129	0.2496	0.992	40770290-40773726	chr15
DNAJC17	ENSG00000104129	-0.2496	0.992	40768062-40773727	chr15
DOCK5	ENSG00000147459	0.2214	0.96	25268885-25275386	chr8
DOCK5	ENSG00000147459	-0.2214	0.96	25268885-25270790	chr8
DUSP12	ENSG00000081721	-0.298	0.9887	161750145-161751668	chr1
DUSP12	ENSG00000081721	0.2969	0.9885	161750145-161751655	chr1
DUSP12	ENSG00000081721	0.2969	0.9885	161750145-161751655	chr1
DUSP12	ENSG00000081721	-0.298	0.9887	161750145-161751668	chr1
DYNLRB1	ENSG00000125971	-0.274	0.9666	34519498-34526268	chr20
EEF1B2	ENSG00000114942	-0.1053	0.978	206160710-206161346	chr2

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
EFHD2	ENSG00000142634	-0.2114	0.9744	15427284-15428593	chr1
EFHD2	ENSG00000142634	-0.3568	0.9989	15426018-15427150	chr1
EFHD2	ENSG00000142634	0.2164	0.9802	15426018-15428593	chr1
EFHD2	ENSG00000142634	0.3568	0.9989	15426018-15428593	chr1
EIF4A2	ENSG00000156976	0.1824	0.9724	186784696-186785883	chr3
EIF4A2	ENSG00000156976	-0.1824	0.9724	186784696-186784962	chr3
EMC9	ENSG00000100908	-0.4042	0.9778	24139614-24140889	chr14
EMC9	ENSG00000100908	0.3484	0.9549	24139789-24140889	chr14
ENSG00000288000	ENSG00000288000	0.1944	0.9559	43458510-43459770	chr20
ENSG00000288000	ENSG00000288000	-0.1944	0.9559	43458509-43459771	chr20
ERP29	ENSG00000089248	0.2471	0.999	112013609-112022150	chr12
ERP29	ENSG00000089248	-0.2502	0.9991	112013609-112019756	chr12
ERP29	ENSG00000089248	0.2003	0.9913	112013609-112022150	chr12
ERP29	ENSG00000089248	-0.2003	0.9913	112019894-112022150	chr12
EXOC7	ENSG00000182473	0.3467	0.9905	76089320-76094414	chr17
EXOC7	ENSG00000182473	-0.4521	0.9945	76090397-76091143	chr17
EXOC7	ENSG00000182473	-0.3264	0.9857	76091235-76094414	chr17
EXOC7	ENSG00000182473	-0.4092	0.9998	76089320-76090329	chr17
EXOC7	ENSG00000182473	0.362	0.9668	76089320-76091143	chr17
EXOC7	ENSG00000182473	0.2597	0.9901	76089320-76094414	chr17
FADS3	ENSG00000221968	-0.2393	0.9736	61876455-61876866	chr11
FADS3	ENSG00000221968	-0.1783	0.9854	61876963-61877511	chr11
FBXO31	ENSG00000103264	-0.2224	0.9705	87360366-87383405	chr16
FBXO31	ENSG00000103264	0.221	0.9795	87360366-87367373	chr16
FBXO44	ENSG00000132879	0.2991	0.9712	11658364-11658736	chr1
FBXO44	ENSG00000132879	-0.2991	0.9712	11658628-11658736	chr1
FIS1	ENSG00000214253	-0.1933	0.9781	101244139-101244960	chr7
FRMD8	ENSG00000126391	-0.4479	0.9721	65393674-65394041	chr11
FRMD8	ENSG00000126391	0.4479	0.9721	65389528-65394041	chr11
GPBP1	ENSG00000062194	0.2219	0.9796	57236032-57246300	chr5
GPBP1	ENSG00000062194	-0.2219	0.9796	57236032-57237113	chr5
GPBP1	ENSG00000062194	-0.2048	0.9595	57237172-57246300	chr5
GPBP1	ENSG00000062194	0.2048	0.9595	57236032-57246300	chr5
GPBP1L1	ENSG00000159592	0.2298	0.9929	45661225-45686412	chr1
HMGB2	ENSG00000164104	-0.1509	0.9901	173333669-173334246	chr4
HMGB2	ENSG00000164104	0.1501	0.9895	173333669-173334272	chr4
HMGNA4	ENSG00000182952	0.1535	0.9517	26538501-26545127	chr6
HMGNA4	ENSG00000182952	-0.1535	0.9517	26540026-26545127	chr6
HMOX2	ENSG00000103415	0.2301	0.9567	4476487-4505484	chr16
HNRNPDL	ENSG00000152795	-0.1908	0.9961	82424883-82426037	chr4
HNRNPDL	ENSG00000152795	0.1901	0.9927	82425667-82426037	chr4
HNRNPDL	ENSG00000152795	0.1515	0.9654	82424883-82425563	chr4
HNRNPDL	ENSG00000152795	-0.2362	0.9987	82424883-82426037	chr4
HNRNPDI	ENSG00000169045	0.1457	0.9679	179616218-179617021	chr5
HNRNPDI	ENSG00000169045	-0.1616	0.9568	179616958-179617051	chr5
HOXB-AS3	ENSG00000233101	-0.1946	0.9507	48600545-48602075	chr17
HSF1	ENSG00000185122	0.2659	0.9635	144312244-144313511	chr8
HSF1	ENSG00000185122	-0.2659	0.9635	144312711-144313511	chr8
ILF3	ENSG00000129351	0.1304	0.9599	10677310-10679097	chr19
ILF3	ENSG00000129351	-0.1304	0.9599	10678704-10679097	chr19
ILF3	ENSG00000129351	-0.1369	0.9745	10677310-10678613	chr19
ILF3	ENSG00000129351	0.1369	0.9745	10677310-10679097	chr19
ISOC2	ENSG00000063241	-0.2843	0.9998	55455845-55456349	chr19

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
ISOC2	ENSG00000063241	0.1995	0.9711	55455330-55456349	chr19
KANSL3	ENSG00000114982	-0.3258	0.963	96631482-96636921	chr2
KANSL3	ENSG00000114982	-0.3234	0.9655	96631482-96636921	chr2
KANSL3	ENSG00000114982	0.2147	0.9781	96601776-96602753	chr2
KANSL3	ENSG00000114982	-0.3169	0.9929	96602338-96602753	chr2
KANSL3	ENSG00000114982	0.3169	0.9929	96601776-96602753	chr2
KANSL3	ENSG00000114982	-0.2978	0.9993	96601776-96602116	chr2
KIFC3	ENSG00000140859	0.2371	0.9908	57772288-57794999	chr16
KIFC3	ENSG00000140859	0.195	0.972	57772288-57794999	chr16
KIFC3	ENSG00000140859	-0.1682	0.9549	57772288-57785464	chr16
KLC1	ENSG00000126214	-0.2298	0.9826	103679545-103684986	chr14
KLHL12	ENSG00000117153	0.1973	0.9804	202893425-202894184	chr1
KLHL12	ENSG00000117153	-0.1973	0.9804	202892659-202894184	chr1
KLHL12	ENSG00000117153	0.17	0.9572	202892659-202893239	chr1
KLHL12	ENSG00000117153	-0.17	0.9572	202892659-202894184	chr1
KRT13	ENSG00000171401	-0.3047	0.9987	41505236-41505446	chr17
KRT13	ENSG00000171401	0.2935	0.9882	41501745-41501801	chr17
KRT13	ENSG00000171401	0.2984	0.9981	41505235-41505447	chr17
KRT13	ENSG00000171401	-0.2935	0.9882	41501744-41502374	chr17
KTN1	ENSG00000126777	0.2024	0.9591	55661612-55667241	chr14
KTN1	ENSG00000126777	-0.1907	0.9692	55661612-55663955	chr14
KTN1	ENSG00000126777	0.1891	0.972	55661612-55667241	chr14
KTN1	ENSG00000126777	-0.2024	0.9591	55664041-55667241	chr14
LARP6	ENSG00000166173	0.3382	0.9969	70836505-70853889	chr15
LARP6	ENSG00000166173	-0.3321	0.9978	70851720-70853889	chr15
LRRC42	ENSG00000116212	-0.2276	0.9719	53946549-53947788	chr1
LUC7L3	ENSG00000108848	0.4275	0.9668	50751618-50752199	chr17
LUC7L3	ENSG00000108848	-0.4765	0.9941	50750694-50752200	chr17
MAPK12	ENSG00000188130	-0.2583	0.9819	50256646-50256935	chr22
MAPKAP1	ENSG00000119487	0.3039	0.9839	125484583-125543059	chr9
MAPKAP1	ENSG00000119487	-0.3039	0.9839	125484583-125506310	chr9
MARCHF9	ENSG00000139266	-0.2363	0.967	57757084-57757291	chr12
MARCHF9	ENSG00000139266	0.2363	0.967	57757084-57758108	chr12
MARK2	ENSG00000072518	-0.2999	0.9604	63905043-63908260	chr11
MARK2	ENSG00000072518	0.4254	0.9999	63905043-63908877	chr11
MARK2	ENSG00000072518	0.3749	0.9963	63905043-63908877	chr11
MARK2	ENSG00000072518	-0.413	0.9994	63908304-63908877	chr11
METTL1	ENSG00000037897	-0.4122	0.994	57771257-57771974	chr12
METTL1	ENSG00000037897	0.4116	0.9941	57771605-57771974	chr12
MISP	ENSG00000099812	-0.1393	0.9654	761663-763501	chr19
MISP	ENSG00000099812	0.1336	0.9515	760039-763501	chr19
MKNK2	ENSG00000099875	-0.2138	0.9692	2039856-2040134	chr19
MKNK2	ENSG00000099875	0.2138	0.9692	2037829-2040134	chr19
MKNK2	ENSG00000099875	-0.2059	0.9878	2037830-2038247	chr19
MKNK2	ENSG00000099875	-0.2322	0.9983	2046468-2046604	chr19
MKNK2	ENSG00000099875	0.2061	0.9943	2046469-2046521	chr19
MKNK2	ENSG00000099875	0.204	0.9878	2037829-2040134	chr19
MLLT10	ENSG00000078403	0.3576	0.9614	21681376-21713772	chr10
MLLT10	ENSG00000078403	-0.3576	0.9614	21681376-21682225	chr10
MORF4L2	ENSG00000123562	-0.2165	0.9885	103684729-103685171	chrX
NADK	ENSG00000008130	0.1947	0.9714	1753060-1754284	chr1
NADK	ENSG00000008130	-0.2827	0.9825	1754208-1754284	chr1
NEDD4L	ENSG00000049759	0.2574	0.9799	58221757-58245427	chr18

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
NF1	ENSG00000196712	-0.2896	0.9874	31249119-31252938	chr17
NF1	ENSG00000196712	0.3839	0.9997	31249119-31258344	chr17
NF1	ENSG00000196712	0.2971	0.972	31249119-31258344	chr17
NF1	ENSG00000196712	-0.2942	0.9706	31253000-31258344	chr17
NR2C2AP	ENSG00000184162	0.2013	0.9723	19202398-19202470	chr19
NR2C2AP	ENSG00000184162	-0.2013	0.9723	19202398-19202791	chr19
NRIP1	ENSG00000180530	-0.258	0.9557	14968526-15014344	chr21
NRIP1	ENSG00000180530	0.2542	0.9524	14968526-15043495	chr21
NUP58	ENSG00000139496	-0.1637	0.9947	25307948-25309247	chr13
NUP58	ENSG00000139496	0.1637	0.9947	25307948-25312883	chr13
NUP58	ENSG00000139496	0.2158	0.9963	25307948-25312883	chr13
NUP58	ENSG00000139496	-0.2346	0.9977	25309282-25312883	chr13
OGDH	ENSG00000105953	-0.5068	0.9951	44618934-44624317	chr7
OGDH	ENSG00000105953	0.4977	0.9938	44606653-44624317	chr7
OGT	ENSG00000147162	-0.4275	0.9994	71544635-71547907	chrX
OGT	ENSG00000147162	0.4275	0.9994	71546281-71547906	chrX
OGT	ENSG00000147162	0.4052	0.9984	71544636-71546210	chrX
OGT	ENSG00000147162	-0.4088	0.9985	71544635-71547907	chrX
PABPC4	ENSG00000090621	-0.198	0.9941	39570002-39571234	chr1
PABPC4	ENSG00000090621	0.198	0.9941	39571196-39571233	chr1
PACRGL	ENSG00000163138	0.2648	0.9661	20704814-20713432	chr4
PACRGL	ENSG00000163138	-0.3004	0.9657	20709773-20712788	chr4
PACRGL	ENSG00000163138	-0.2648	0.9661	20712922-20713432	chr4
PACRGL	ENSG00000163138	-0.452	0.9999	20704814-20707803	chr4
PADI1	ENSG00000142623	-0.2498	0.9513	17237458-17238616	chr1
PADI1	ENSG00000142623	0.2663	0.9997	17222471-17223486	chr1
PADI1	ENSG00000142623	-0.2663	0.9997	17222470-17223621	chr1
PALB2	ENSG00000083093	-0.1656	0.952	23638592-23641110	chr16
PARD3	ENSG00000148498	-0.2307	0.9782	34360259-34372498	chr10
PARD3	ENSG00000148498	0.2307	0.9782	34360259-34374874	chr10
PDLIM2	ENSG00000120913	-0.2526	0.9735	22585399-22589298	chr8
PDLIM2	ENSG00000120913	0.2378	0.9621	22585399-22589596	chr8
PHYKPL	ENSG00000175309	0.4089	0.9924	178208915-178211890	chr5
PHYKPL	ENSG00000175309	-0.4148	0.9933	178208916-178210967	chr5
PICALM	ENSG00000073921	0.2015	0.9864	85959060-85981129	chr11
PICALM	ENSG00000073921	0.1848	0.9557	85959060-85981129	chr11
PICALM	ENSG00000073921	-0.2233	0.9618	85976682-85981129	chr11
PICALM	ENSG00000073921	-0.194	0.9786	85959060-85974708	chr11
PIGQ	ENSG00000007541	-0.2709	0.9891	580972-582248	chr16
PIGQ	ENSG00000007541	0.3217	0.9954	580972-582883	chr16
PIKFYVE	ENSG00000115020	0.3689	0.9915	208304318-208312236	chr2
PIKFYVE	ENSG00000115020	-0.3689	0.9915	208304318-208304846	chr2
PISD	ENSG00000241878	-0.2769	0.977	31621885-31623684	chr22
PISD	ENSG00000241878	0.2454	0.9524	31621885-31648101	chr22
PLEKHM2	ENSG00000116786	-0.1531	0.9605	15731257-15731889	chr1
POM121	ENSG00000196313	0.1978	0.9505	72891110-72926262	chr7
PPP1CB	ENSG00000213639	0.1862	0.9972	28783978-28788658	chr2
PPP1CB	ENSG00000213639	-0.1862	0.9972	28783978-28799199	chr2
PPP1CB	ENSG00000213639	-0.2464	0.9906	28783978-28799199	chr2
PPP1CB	ENSG00000213639	0.2464	0.9906	28793997-28799199	chr2
PRC1	ENSG00000198901	-0.2198	0.954	90967202-90969079	chr15
PRMT1	ENSG00000126457	-0.2575	0.9622	49679925-49680487	chr19

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
PSEN2	ENSG00000143801	-0.4235	0.9892	226890133-226891278	chr1
PSEN2	ENSG00000143801	0.4235	0.9892	226890133-226890656	chr1
PSPC1	ENSG00000121390	0.475	0.9978	19677823-19730239	chr13
PSPC1	ENSG00000121390	-0.4703	0.9969	19709599-19730239	chr13
PVT1	ENSG00000249859	-0.2216	0.9614	127890998-127932465	chr8
RAB12	ENSG00000206418	0.4147	1	8625994-8633189	chr18
RAB12	ENSG00000206418	-0.4147	1	8624998-8633189	chr18
RAB4A	ENSG00000168118	0.2008	0.965	229295910-229297520	chr1
RAB4A	ENSG00000168118	-0.2008	0.965	229295910-229297482	chr1
RAB9A	ENSG00000123595	0.3197	0.9679	13689288-13708721	chrX
RAB9A	ENSG00000123595	-0.3197	0.9679	13703902-13708721	chrX
RABGGTB	ENSG00000137955	0.1904	0.9704	75790057-75790152	chr1
RABGGTB	ENSG00000137955	-0.1904	0.9704	75790057-75791285	chr1
RBMX	ENSG00000147274	0.3334	0.9507	136872345-136875086	chrX
RCC1	ENSG00000180198	-0.2558	0.9558	28518308-28529858	chr1
RCC1	ENSG00000180198	0.202	0.9894	28529939-28531803	chr1
RCC1	ENSG00000180198	-0.202	0.9894	28529939-28530523	chr1
RCC1	ENSG00000180198	0.255	0.9545	28516867-28529858	chr1
RHBDD2	ENSG00000005486	-0.2164	0.971	75879260-75881829	chr7
RHBDD2	ENSG00000005486	0.2062	0.9624	75881486-75881829	chr7
RHOQ	ENSG00000119729	-0.1765	0.968	46543188-46543754	chr2
RHOQ	ENSG00000119729	-0.1908	0.9793	46543812-46576087	chr2
RHOQ	ENSG00000119729	0.1765	0.968	46543188-46576087	chr2
RHOQ	ENSG00000119729	0.1647	0.9533	46543188-46576087	chr2
RIF1	ENSG00000080345	-0.3189	0.9842	151468146-151468474	chr2
RIF1	ENSG00000080345	0.3189	0.9842	151468146-151468641	chr2
RIMKLB	ENSG00000166532	-0.3392	0.9746	8698297-8713811	chr12
RIMKLB	ENSG00000166532	0.3762	0.9805	8681818-8713811	chr12
RNF126	ENSG00000070423	-0.2995	0.9964	648975-649679	chr19
RNF126	ENSG00000070423	0.2412	0.9973	649052-649679	chr19
RPL10A	ENSG00000198755	-0.1593	1	35469027-35469381	chr6
RPL10A	ENSG00000198755	0.1025	0.9811	35469285-35469381	chr6
RPL17	ENSG00000265681	0.1476	0.9631	49491587-49491625	chr18
RPL7A	ENSG00000148303	0.258	0.9897	133348246-133348922	chr9
RPL7A	ENSG00000148303	-0.2275	0.9611	133348388-133348922	chr9
RPS7	ENSG00000171863	0.2078	0.963	3575350-3575592	chr2
RPS7	ENSG00000171863	-0.2218	0.975	3575448-3575592	chr2
RPS9	ENSG00000170889	0.1402	0.9967	54206724-54207398	chr19
RPSA	ENSG00000168028	0.1723	0.9528	39408724-39410756	chr3
RSU1	ENSG00000148484	0.2608	0.9504	16782084-16817315	chr10
RSU1	ENSG00000148484	-0.2639	0.9521	16817084-16817315	chr10
RWDD1	ENSG00000111832	-0.2399	0.9579	116574171-116580295	chr6
RWDD1	ENSG00000111832	0.2912	0.9844	116571655-116580295	chr6
SAP130	ENSG00000136715	-0.3738	0.9786	127978089-127986785	chr2
SAP130	ENSG00000136715	0.3738	0.9786	127955344-127986785	chr2
SBDSP1	ENSG00000225648	0.231	0.9821	72829783-72830692	chr7
SBDSP1	ENSG00000225648	-0.2501	0.9874	72829783-72831602	chr7
SEC24B	ENSG00000138802	0.3002	0.9693	109473186-109491327	chr4
SEC24B	ENSG00000138802	-0.3002	0.9693	109481781-109491327	chr4
SECISBP2L	ENSG00000138593	-0.4813	0.9959	49017628-49019418	chr15
SECISBP2L	ENSG00000138593	0.4813	0.9959	49017628-49027365	chr15
SETX	ENSG00000107290	0.2366	0.9508	132264985-132269615	chr9
SETX	ENSG00000107290	-0.2395	0.9569	132269489-132269615	chr9

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
SF1	ENSG00000168066	-0.1666	0.9722	64773505-64776498	chr11
SFPQ	ENSG00000116560	-0.166	0.9837	35184593-35187001	chr1
SFPQ	ENSG00000116560	0.1704	0.9975	35178036-35187001	chr1
SMG1P3	ENSG00000180747	-0.2695	0.9726	21487616-21519828	chr16
SMG1P3	ENSG00000180747	0.2604	0.9689	21484535-21519828	chr16
SMIM19	ENSG00000176209	-0.2763	0.9595	42541705-42546469	chr8
SMIM29	ENSG00000186577	-0.2755	0.9729	34247864-34248979	chr6
SNHG12	ENSG00000197989	-0.4646	1	28579588-28579843	chr1
SNHG12	ENSG00000197989	0.1814	0.9901	28579587-28579942	chr1
SNHG12	ENSG00000197989	0.2719	0.9958	28579587-28579912	chr1
SNHG15	ENSG00000232956	0.1714	0.9871	44984426-44986021	chr7
SNHG16	ENSG00000163597	0.184	0.9983	76557857-76558374	chr17
SNX25	ENSG00000109762	0.2169	0.967	185332713-185339379	chr4
SNX25	ENSG00000109762	-0.2169	0.967	185332759-185339379	chr4
SPDYA	ENSG00000163806	0.2464	0.9906	28793997-28799199	chr2
SPDYA	ENSG00000163806	-0.1862	0.9972	28783978-28799199	chr2
SPDYA	ENSG00000163806	-0.2464	0.9906	28783978-28799199	chr2
SPDYA	ENSG00000163806	0.1862	0.9972	28783978-28788658	chr2
SPOP	ENSG00000121067	0.3353	0.9701	49622876-49677933	chr17
SRSF2	ENSG00000161547	0.1625	0.9844	76736009-76736153	chr17
SRSF2	ENSG00000161547	-0.1905	0.9962	76735158-76736154	chr17
SRSF2	ENSG00000161547	-0.1783	0.9869	76735158-76736154	chr17
SRSF3	ENSG00000112081	0.194	0.9998	36600276-36601152	chr6
SRSF3	ENSG00000112081	-0.194	0.9998	36598983-36601152	chr6
SRSF3	ENSG00000112081	0.237	1	36598983-36599821	chr6
SRSF3	ENSG00000112081	-0.237	1	36598983-36601152	chr6
SRSF5	ENSG00000100650	0.2196	0.9828	69767380-69768138	chr14
SRSF6	ENSG00000124193	0.2469	0.9972	43458509-43459153	chr20
SRSF6	ENSG00000124193	0.3082	0.9886	43459420-43459771	chr20
SRSF6	ENSG00000124193	-0.3082	0.9886	43458509-43459771	chr20
SRSF6	ENSG00000124193	-0.2469	0.9972	43458509-43459771	chr20
STARD3NL	ENSG00000010270	0.2569	0.9613	38178420-38207447	chr7
STARD3NL	ENSG00000010270	-0.2011	0.9521	38179145-38207447	chr7
STRN3	ENSG00000196792	-0.2479	0.9763	30913657-30918966	chr14
STRN3	ENSG00000196792	0.2698	0.9634	30913657-30935163	chr14
SYNJ2	ENSG00000078269	0.3554	0.9991	158029026-158033455	chr6
SYNJ2	ENSG00000078269	-0.3554	0.9991	158029026-158030408	chr6
SZRD1	ENSG00000055070	-0.2877	0.9893	16391424-16393228	chr1
TBC1D24	ENSG00000162065	-0.2635	0.9554	2498396-2499357	chr16
TBC1D24	ENSG00000162065	0.2635	0.9554	2498396-2499835	chr16
TEX30	ENSG00000151287	0.3993	0.9777	102767478-102768260	chr13
TEX30	ENSG00000151287	-0.3993	0.9777	102766580-102768260	chr13
TFE3	ENSG00000068323	-0.2582	0.9868	49039345-49040455	chrX
TFE3	ENSG00000068323	0.2591	0.9864	49039410-49040455	chrX
TLK2	ENSG00000146872	-0.1853	0.9743	62524331-62536170	chr17
TMEM192	ENSG00000170088	0.2064	0.9659	165103096-165112747	chr4
TMEM192	ENSG00000170088	-0.2869	0.9892	165103096-165111649	chr4
TMEM192	ENSG00000170088	-0.2064	0.9659	165111679-165112747	chr4
TMEM192	ENSG00000170088	0.2841	0.9877	165103096-165112747	chr4
TMPO	ENSG00000120802	-0.2515	0.9979	98545061-98546359	chr12
TMPO	ENSG00000120802	0.2515	0.9979	98537572-98546359	chr12
TMPO	ENSG00000120802	0.2971	0.9973	98537572-98546359	chr12
TMPO	ENSG00000120802	-0.2727	0.9851	98537572-98544230	chr12

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
TMX2	ENSG00000213593	0.1284	0.9518	57737668-57737836	chr11
TMX3	ENSG00000166479	0.3012	0.9925	68698031-68710021	chr18
TMX3	ENSG00000166479	-0.3754	0.9786	68698031-68700405	chr18
TOMM20	ENSG00000173726	0.1756	0.9557	235119406-235119818	chr1
TOMM20	ENSG00000173726	-0.1756	0.9557	235113910-235119818	chr1
TRA2A	ENSG00000164548	-0.4763	0.9983	23521840-23531789	chr7
TRA2A	ENSG00000164548	0.4837	0.9994	23522432-23531789	chr7
TRA2B	ENSG00000136527	0.2724	0.9979	185931852-185937825	chr3
TRA2B	ENSG00000136527	-0.2463	0.9876	185926734-185937825	chr3
TRAPPC10	ENSG00000160218	-0.2039	0.981	44084263-44086802	chr21
TRAPPC10	ENSG00000160218	0.2039	0.981	44083302-44086802	chr21
TRAPPC10	ENSG00000160218	-0.2713	0.988	44083302-44084122	chr21
TRAPPC10	ENSG00000160218	0.2713	0.988	44083302-44086802	chr21
TRIM25	ENSG00000121060	0.1729	0.9833	56908563-56908747	chr17
TRIM25	ENSG00000121060	-0.1786	0.9679	56908563-56913392	chr17
TRIM33	ENSG00000197323	0.395	0.9902	114410316-114421436	chr1
TRIM33	ENSG00000197323	-0.395	0.9902	114420451-114421436	chr1
TRIOBP	ENSG00000100106	-0.3189	0.9971	37746420-37751772	chr22
TRIOBP	ENSG00000100106	0.3133	0.9973	37746812-37751772	chr22
TRIOBP	ENSG00000100106	0.2609	0.9943	37746812-37751772	chr22
UBAP2L	ENSG00000143569	0.2335	0.9571	154241797-154243217	chr1
UBAP2L	ENSG00000143569	-0.2335	0.9571	154241565-154243217	chr1
UBE2Q2	ENSG00000140367	-0.2137	0.9646	75883424-75890435	chr15
UFD1	ENSG00000070010	0.1944	0.9619	19475100-19475496	chr22
UFD1	ENSG00000070010	-0.196	0.9631	19475100-19475470	chr22
USP47	ENSG00000170242	0.22	0.954	11842224-11884467	chr11
USP47	ENSG00000170242	-0.22	0.954	11880380-11884467	chr11
USP8	ENSG00000138592	-0.2984	0.9812	50484361-50489801	chr15
USP8	ENSG00000138592	0.2984	0.9812	50482065-50489801	chr15
USP8	ENSG00000138592	-0.2331	0.954	50482065-50484275	chr15
USP8	ENSG00000138592	0.2331	0.954	50482065-50489801	chr15
VMP1	ENSG00000062716	0.4534	1	59838213-59838294	chr17
VMP1	ENSG00000062716	0.205	0.9974	59838398-59839767	chr17
VMP1	ENSG00000062716	-0.4233	1	59817773-59838295	chr17
VMP1	ENSG00000062716	-0.205	0.9974	59838397-59839768	chr17
WAC	ENSG00000095787	0.2187	0.962	28533620-28533998	chr10
WAC	ENSG00000095787	-0.2241	0.9705	28533007-28533998	chr10
WDR4	ENSG00000160193	-0.4598	0.9629	42863596-42873551	chr21
WDR4	ENSG00000160193	0.4598	0.9629	42863596-42873603	chr21
YDJC	ENSG00000161179	0.2941	0.9997	21629408-21629542	chr22
ZC3H11A	ENSG00000058673	0.1965	0.9716	203796789-203798845	chr1
ZDHHC16	ENSG00000171307	0.2668	0.9544	97453663-97454714	chr10
ZDHHC16	ENSG00000171307	-0.2668	0.9544	97453846-97454714	chr10
ZFAND1	ENSG00000104231	0.3487	0.9986	81718224-81732199	chr8
ZFAND1	ENSG00000104231	-0.2432	0.9812	81715114-81717249	chr8
ZFAND1	ENSG00000104231	0.2551	0.9807	81715114-81718182	chr8
ZFAND1	ENSG00000104231	-0.2551	0.9807	81717288-81718182	chr8
ZFAND1	ENSG00000104231	-0.3653	0.9994	81718224-81721227	chr8
ZNF195	ENSG00000005801	-0.2689	0.9545	3371703-3373577	chr11
ZNF195	ENSG00000005801	0.3643	0.9977	3371703-3379038	chr11

Gène	Identifiant	dPSI moyen	Probabilité de changement	Coordonnées de la jonction	Chromosome
ZNF33B	ENSG00000196693	-0.3749	0.9923	42614358-42631929	chr10
ZNF33B	ENSG00000196693	0.3749	0.9923	42594699-42631929	chr10
ZNF655	ENSG00000197343	0.2683	0.9788	99560695-99572245	chr7
ZNF720	ENSG00000197302	-0.2124	0.9801	31713448-31722626	chr16
ZNF720	ENSG00000197302	-0.2941	0.9906	31713448-31722626	chr16

Table 8.3: Évènements d'épissage alternatifs au cours de l'infection par Lm. Gènes comportant au moins une jonction exon-exon différenciellement utilisée entre des cellules infectées et non-infectées, avec un dPSI > 0,1 et une probabilité de changement > 0,95.

8.4 Gels originaux d'estimation de la surexpression de la protéine CIRBP par immunodétection

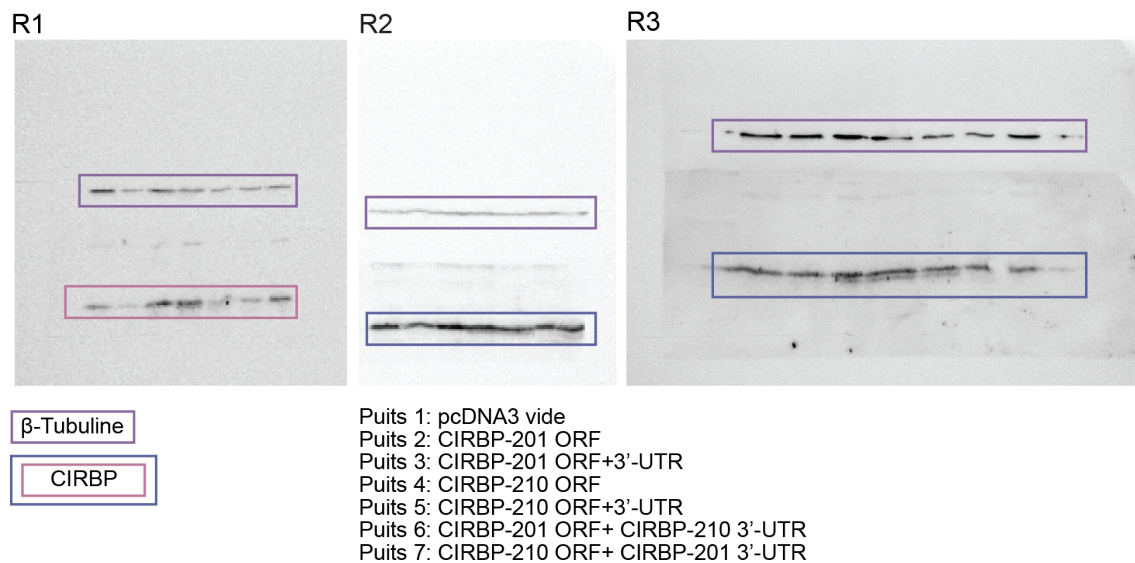


Figure 8.1: Détection de la protéine CIRBP dans des cellules transfectées avec les plasmides de surexpression. Des cellules LoVo ont été transfectées avec un plasmide pcDNA3 avec ou sans insert d'une région de CIRBP-201 ou -210. Après 24h, les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir estimer la surexpression de la protéine CIRBP par immunodétection. Les bandes de témoin de charge (β -tubuline) sont encadrées en violet et celles de CIRBP en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit en bas de la figure. n=3.

8.5 Quantification de l'inhibition des protéines SMG en RT-qPCR

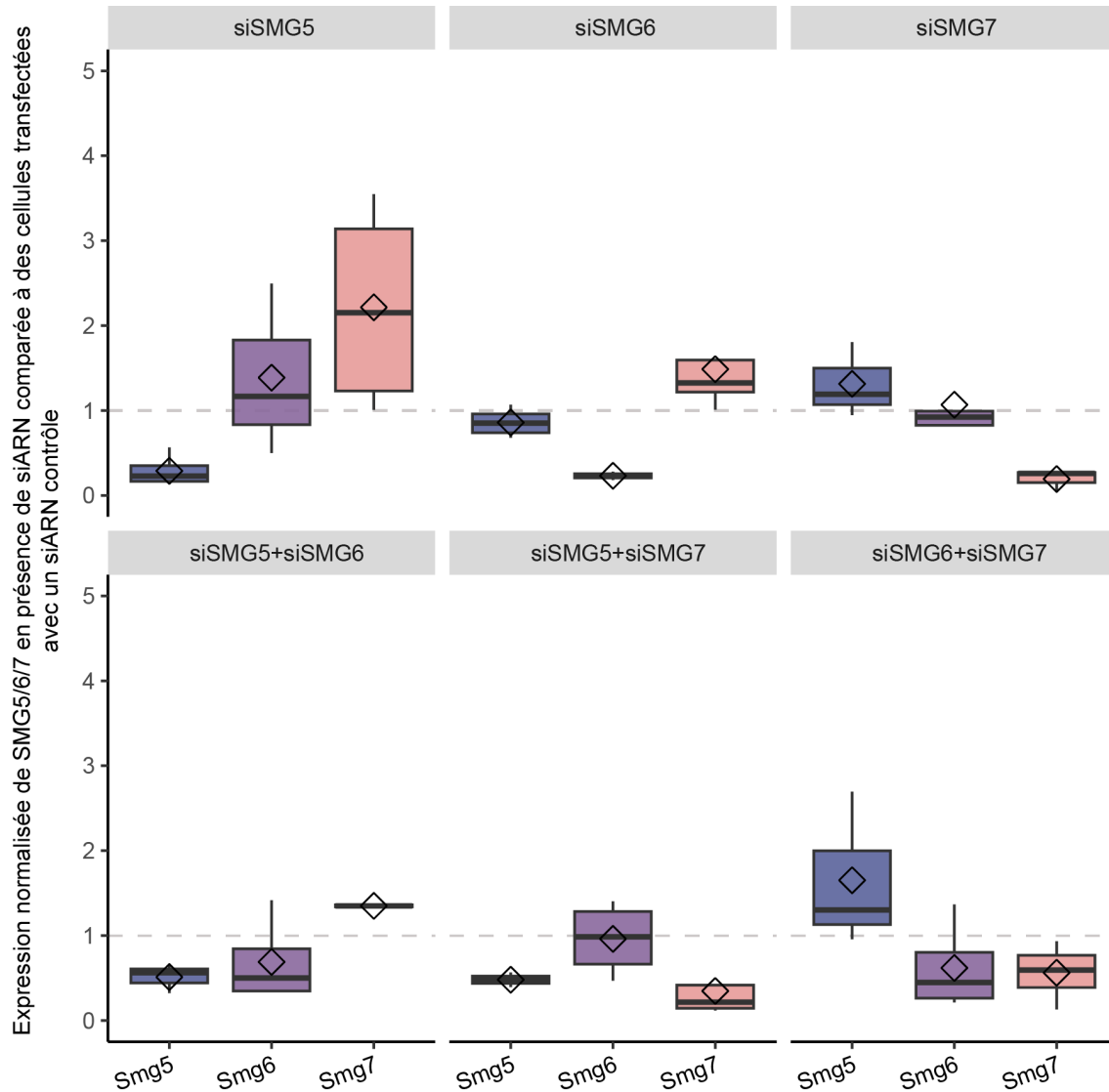


Figure 8.2: Quantification de l'inhibition de l'expression de SMG5/6/7 par siARN en RT-qPCR. Des cellules LoVo ont été transfectées avec des siARN contre les protéines SMG5, SMG6 et SMG7. L'inhibition de ces protéines a été vérifiée par extraction d'ARN suivie d'une RT-qPCR. L'expression de chaque transcrite a été normalisée par rapport à celle d'un gène de ménage (GAPDH) et rapportée à l'expression du transcrite dans des cellules transfectées avec un siARN contrôle.

8.6 Gels originaux d'estimation de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules infectées par immunodétection

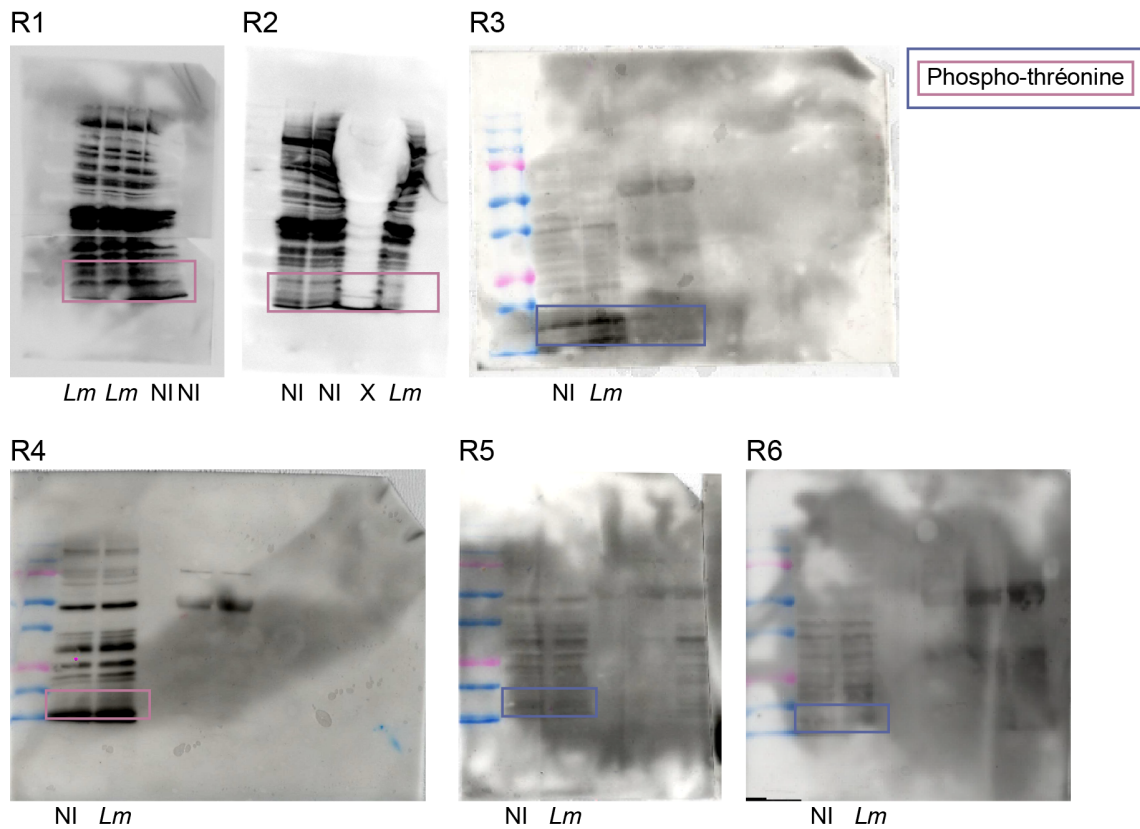


Figure 8.3: Immuno-détection de la phosphorylation de CIRBP. Des cellules LoVo ont été infectées ou non avec *Lm* pour 10h. Les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir estimer la phosphorylation de la protéine CIRBP par immunodétection avec un anti-cors anti-phospho-thréonine. Les bandes de signal correspondant à la taille de CIRBP sont encadrées en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit sous chaque gel.

8.7 Gels originaux de quantification de la protéine CIRBP dans le noyau et le cytoplasme par immunodétection

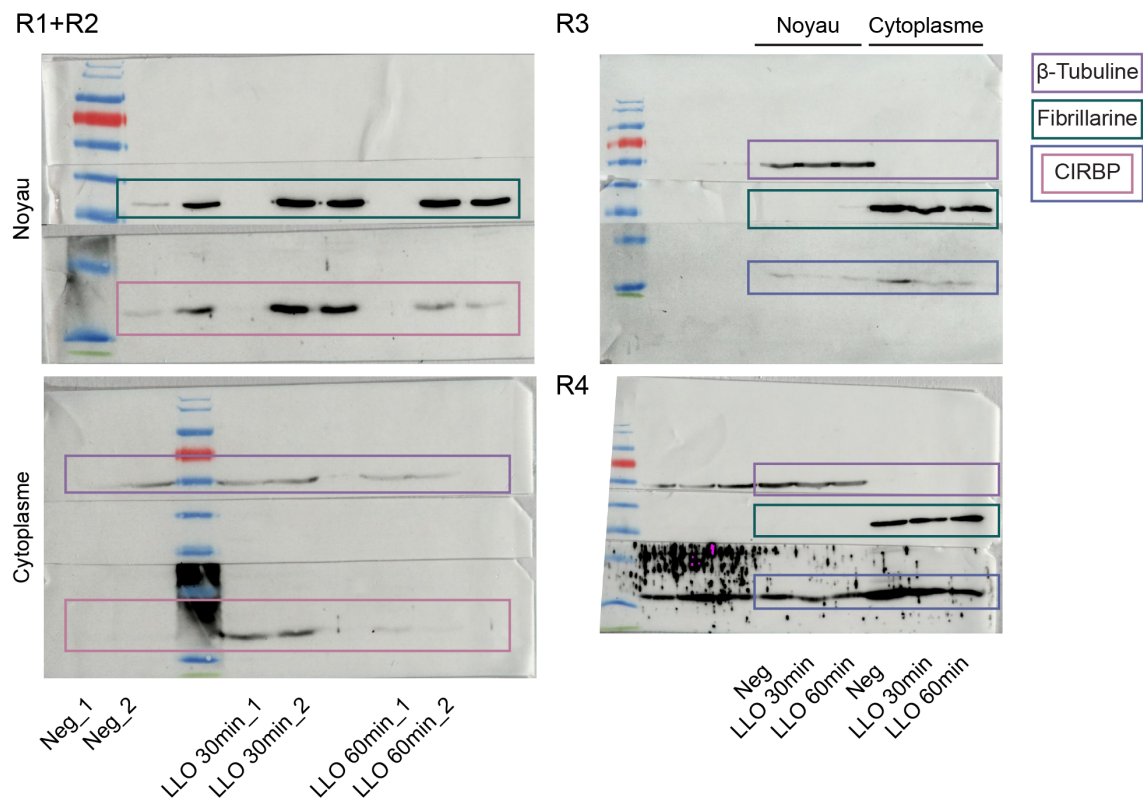


Figure 8.4: Détection de CIRBP dans le noyau et le cytoplasme de cellules incubées avec de la LLO. Des cellules LoVo ont été incubées 30 min ou 1h avec de la LLO à 4,5nM. Les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir quantifier la protéine CIRBP par immunodétection dans le noyau et dans le cytoplasme. Les bandes de témoin de charge (β -tubuline et fibrillarine) sont encadrées en violet et vert respectivement. Les bandes de signal correspondant à CIRBP sont encadrées en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit sous chaque gel.

8.8 Gels originaux d'estimation de la quantité de protéine CIRBP en cas d'inhibition du NMD par immunodétection

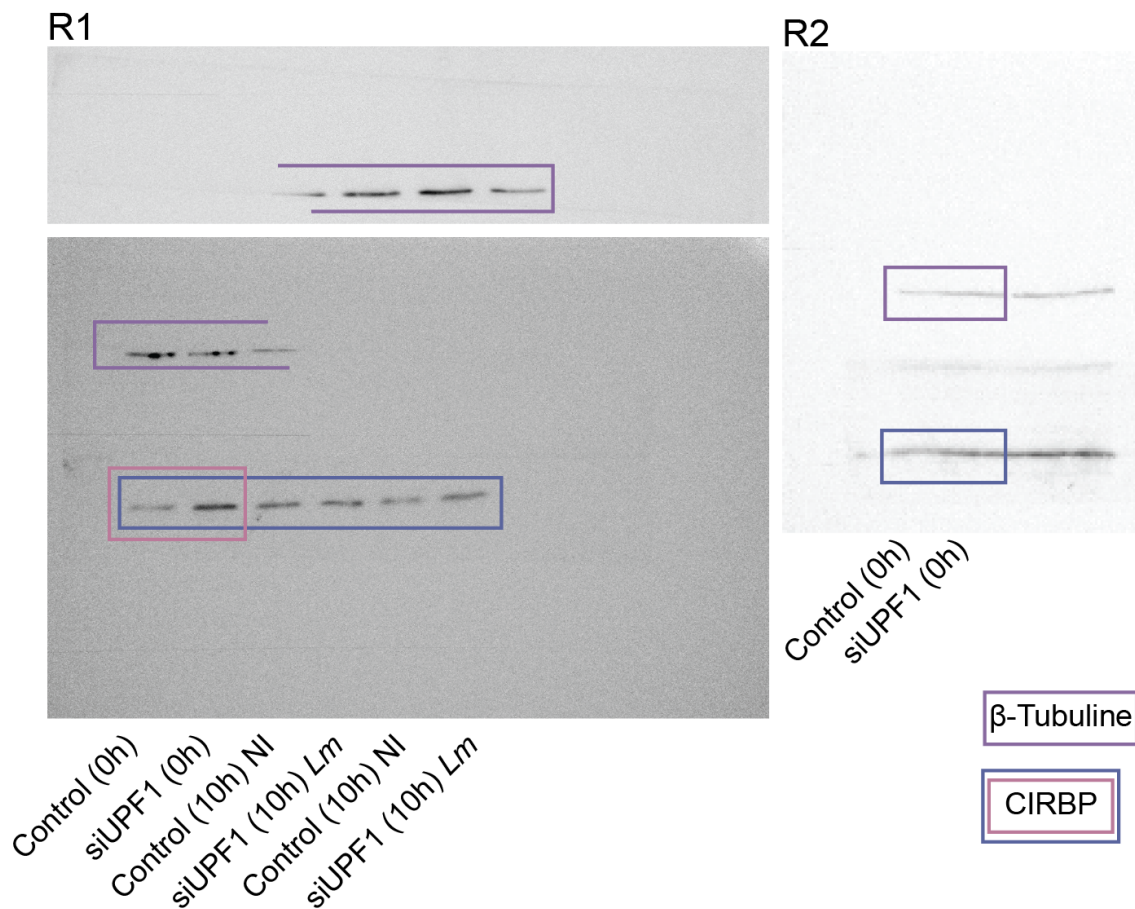


Figure 8.5: Détection de CIRBP dans des cellules inhibées pour le NMD. Des cellules LoVo ont été transfectées avec un siARN contre l'hélicase UPF1, un facteur clé du NMD. Après 48h, les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir quantifier la protéine CIRBP par immunodétection. Les bandes de témoin de charge (β -tubuline) sont encadrées en violet (mais séparées en raison d'une mauvaise coupe). Les bandes de signal correspondant à CIRBP sont encadrées en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit sous chaque gel.

8.9 Gels originaux de quantification de la protéine CIRBP dans des cellules infectées et non-infectées

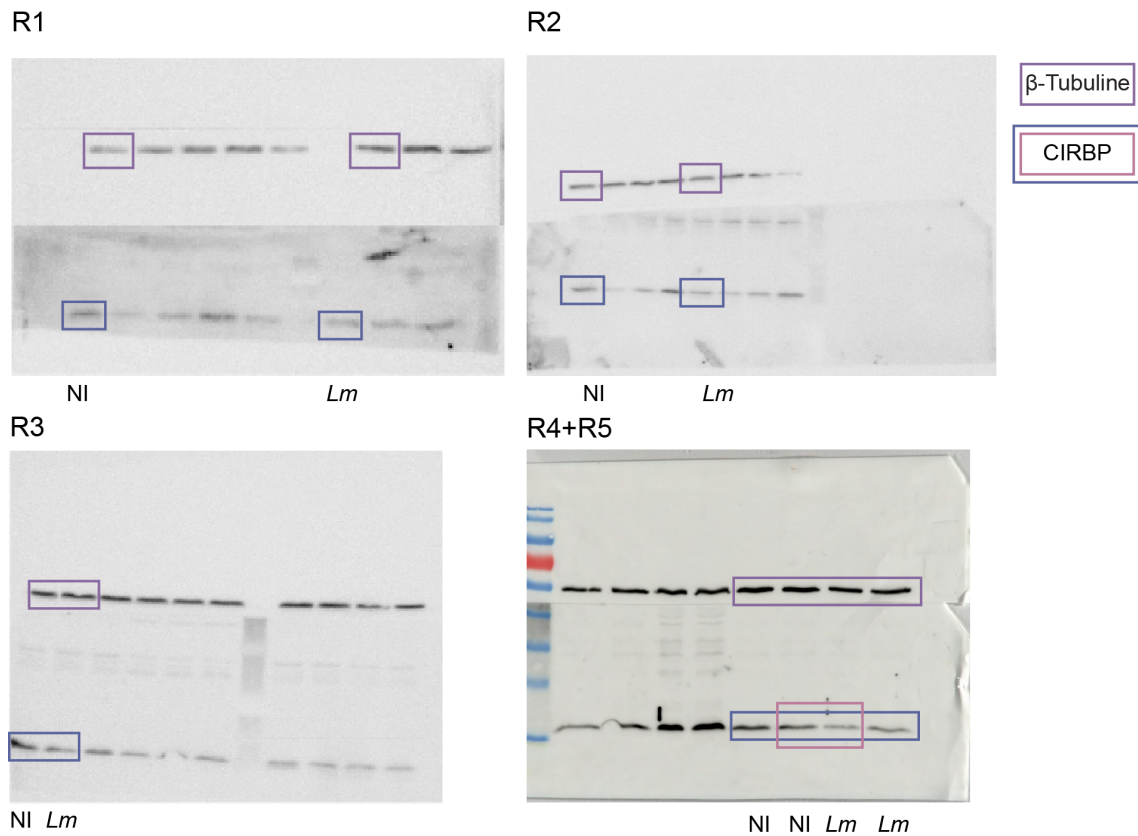


Figure 8.6: Détection de CIRBP dans des cellules infectées par *Lm*. Des cellules LoVo ont été infectées pendant 10h avec *Lm* ou non. Les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir quantifier la protéine CIRBP par immunodétection. Les bandes de témoin de charge (β -tubuline) sont encadrées en violet. Les bandes de signal correspondant à CIRBP sont encadrées en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit sous chaque gel.

8.10 Gels originaux de quantification de la phosphorylation des protéines SRSF dans des cellules incubées avec de la LLO par immunodétection

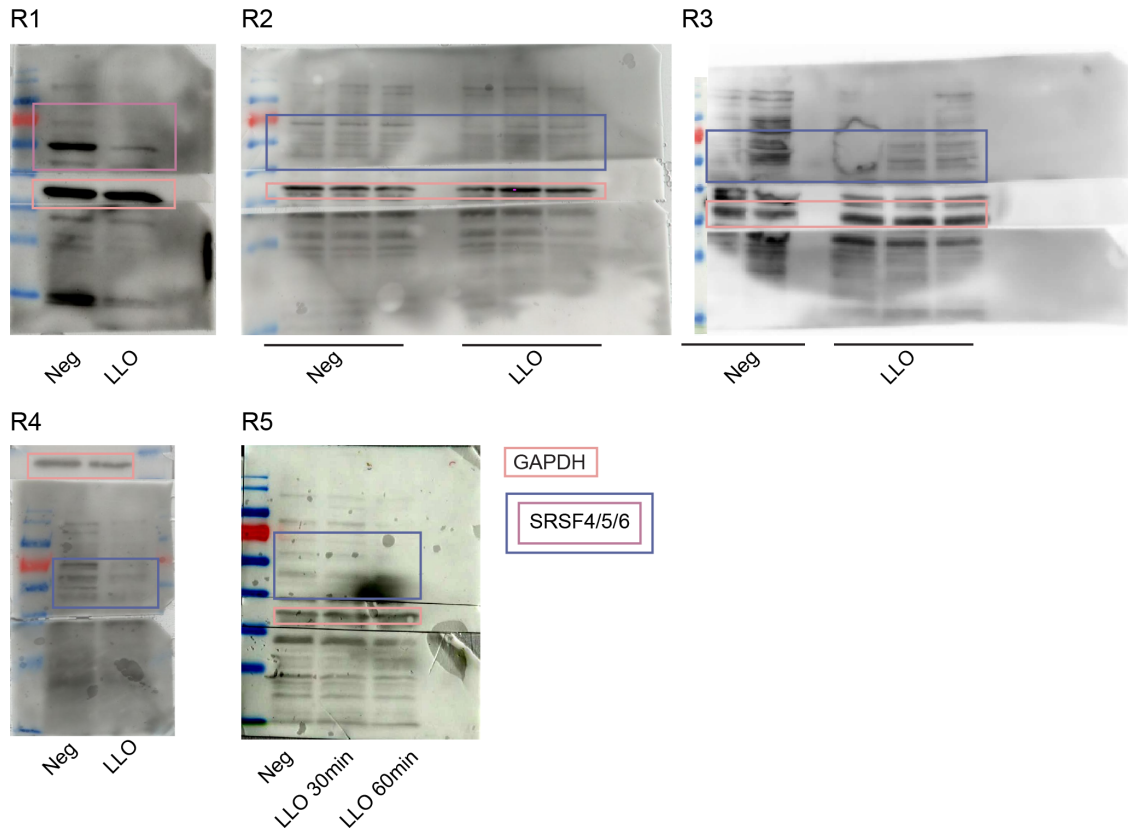


Figure 8.7: Détection de la phosphorylation des protéines SRSF dans des cellules incubées avec de la LLO. Des cellules LoVo ont été incubées avec de la LLO à 4,5nm pour 30 ou 60 min. Les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir estimer la phosphorylation des protéines SRSF par immunodétection avec un anticorps anti-phospho-SRSF. Les bandes de témoin de charge (GAPDH) sont encadrées en orange. Les bandes de signal correspondant à SRSF4, SRSF5 et SRSF6 sont encadrées en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit sous chaque gel.

8.11 Inhibition de CIRBP par siARN

8.11.1 Résultats de RT-qPCR

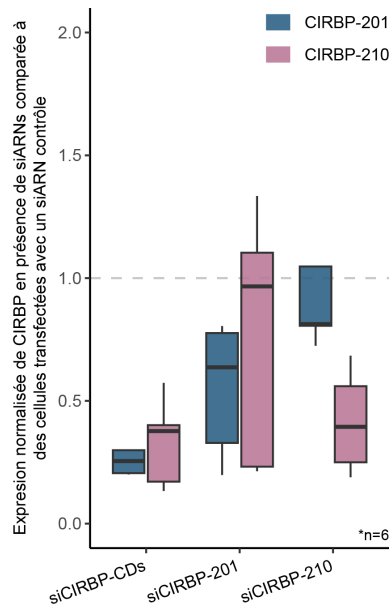


Figure 8.8: Quantification par RT-qPCR de l'inhibition de CIRBP et ses isoformes. Des cellules LoVo ont été transfectées avec des siARN contre la région codante de CIRBP (siCIRBP-CDS), contre le 3'-UTR de CIRBP-201 (siCIRBP-201) et contre le 3'-UTR de CIRBP-210 (siCIRBP-210). 48h plus tard, les ARN ont été extraits et CIRBP ainsi que ses isoformes ont été quantifiés par RT-qPCR.

8.11.2 Gels originaux d'immunodétection de CIRBP en condition d'inhibition de son expression

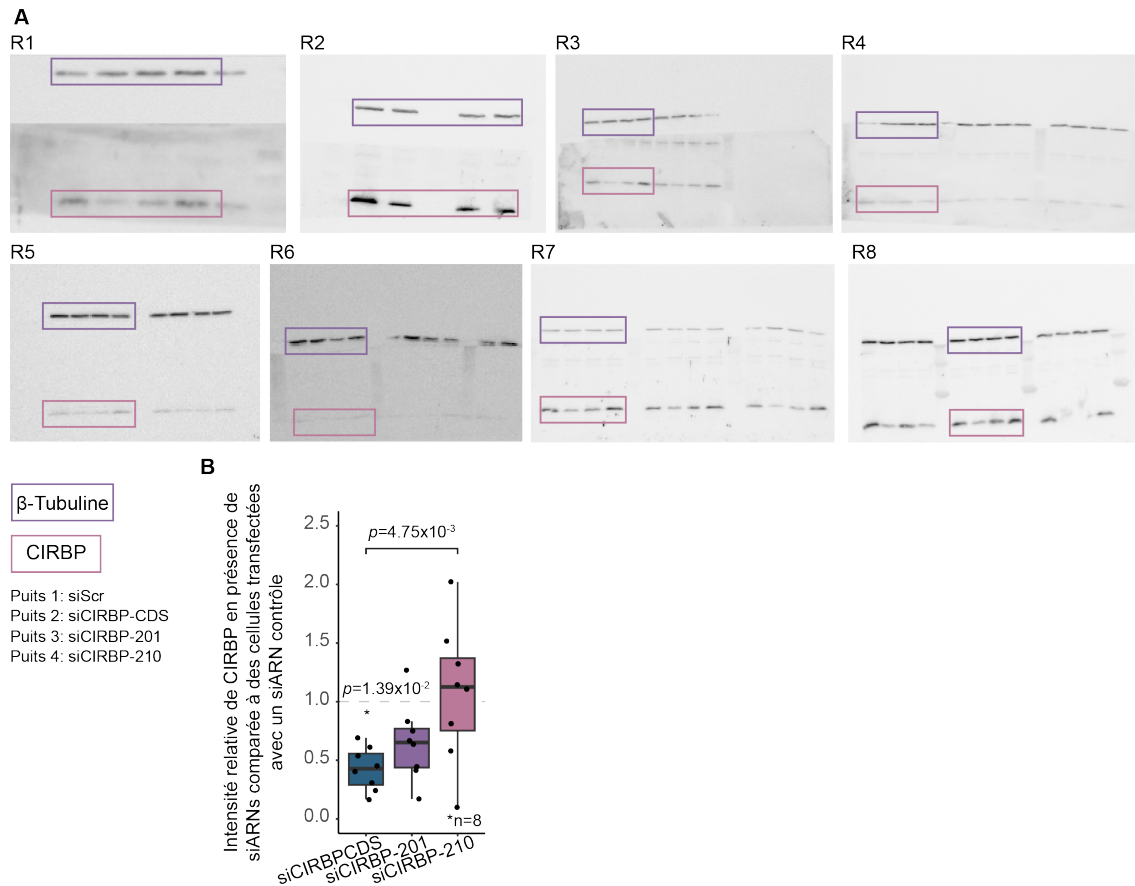


Figure 8.9: Vérification de l'inhibition de la protéine CIRBP par siARN. Des cellules LoVo ont été transfectées avec des siARN contre la région codante de CIRBP (siCIRBP-CDS), contre le 3'-UTR de CIRBP-201 (siCIRBP-201) et contre le 3'-UTR de CIRBP-210 (siCIRBP-210). 48h plus tard, les protéines ont été extraites et séparées par SDS-PAGE pour pouvoir quantifier la protéine CIRBP par immunodétection (A). Les bandes de témoin de charge (β -tubuline) sont encadrées en violet. Les bandes de signal correspondant à CIRBP sont encadrées en rose (présent dans les résultats) ou bleu. Le contenu de chaque puits est décrit sous la figure. Le taux d'inhibition a été quantifié à partir des bandes de CIRBP normalisées par la bande de β -tubuline correspondante et par le bruit de fond. L'intensité de relative des bandes contrôles a été calculée à partir de l'intensité de CIRBP dans des cellules transfectées avec un siARN contrôle. Les moyennes d'intensités relatives normalisées ont été comparées à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

9 Références bibliographiques

- [1] C.J.L. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, G.R. Aguilar, A. Gray, C. Han, C. Bisignano, P. Rao, E. Wool, S.C. Johnson, A.J. Browne, M.G. Chipeta, F. Fell, S. Hackett, G. Haines-Woodhouse, B.H.K. Hamadani, E.A.P. Kumaran, B. McManigal, S. Achalapong, R. Agarwal, S. Akech, S. Albertson, J. Amuasi, J. Andrews, A. Aravkin, E. Ashley, F.-X. Babin, F. Bailey, S. Baker, B. Basnyat, A. Bekker, R. Bender, J.A. Berkley, A. Bethou, J. Bielicki, S. Boonkasidecha, J. Bukosia, C. Carvalheiro, C. Castañeda-Orjuela, V. Chansamouth, S. Chaurasia, S. Chiurchiù, F. Chowdhury, R.C. Donatien, A.J. Cook, B. Cooper, T.R. Cressey, E. Criollo-Mora, M. Cunningham, S. Darboe, N.P.J. Day, M.D. Luca, K. Dokova, A. Dramowski, S.J. Dunachie, T.D. Bich, T. Eckmanns, D. Eibach, A. Emami, N. Feasey, N. Fisher-Pearson, K. Forrest, C. Garcia, D. Garrett, P. Gastmeier, A.Z. Giref, R.C. Greer, V. Gupta, S. Haller, A. Haselbeck, S.I. Hay, M. Holm, S. Hopkins, Y. Hsia, K.C. Iregbu, J. Jacobs, D. Jarovsky, F. Javanmardi, A.W.J. Jenney, M. Khorana, S. Khusuwan, N. Kissoon, E. Kobeissi, T. Kostyaney, F. Krapp, R. Krumkamp, A. Kumar, H.H. Kyu, C. Lim, K. Lim, D. Limmathurotsakul, M.J. Loftus, M. Lunn, J. Ma, A. Manoharan, F. Marks, J. May, M. Mayxay, N. Mturi, T. Munera-Huertas, P. Musicha, L.A. Musila, M.M. Mussi-Pinhata, R.N. Naidu, T. Nakamura, R. Nanavati, S. Nangia, P. Newton, C. Ngoun, A. Novotney, D. Nwakanma, C.W. Obiero, T.J. Ochoa, A. Olivas-Martinez, P. Olliaro, E. Ooko, E. Ortiz-Brizuela, P. Ounchanum, G.D. Pak, J.L. Paredes, A.Y. Peleg, C. Perrone, T. Phe, K. Phommason, N. Plakkal, A. Ponce-de-Leon, M. Raad, T. Ramdin, S. Rattanavong, A. Riddell, T. Roberts, J.V. Robotham, A. Roca, V.D. Rosenthal, K.E. Rudd, N. Russell, H.S. Sader, W. Saengchan, J. Schnall, J.A.G. Scott, S. Seekaew, M. Sharland, M. Shivamallappa, J. Sifuentes-Osornio, A.J. Simpson, N. Steenkeste, A.J. Stewardson, T. Stoeva, N. Tasak, A. Thaiprakong, G. Thwaites, C. Tigoi, C. Turner, P. Turner, H.R. van Doorn, S. Velaphi, A. Vongpradith, M. Vongsouvath, H. Vu, T. Walsh, J.L. Walson, S. Waner, T. Wangrangsimakul, P. Wannapinij, T. Wozniak, T.E.M.W.Y. Sharma, K.C. Yu, P. Zheng, B. Sartorius, A.D. Lopez, A. Stergachis, C. Moore, C. Dolecek, M. Naghavi, Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis, *The Lancet*. 399 (2022) 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [2] J. O'Neill, *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*, Government of the United Kingdom, 2016.
- [3] J.E. Belizário, M. Napolitano, Human Microbiomes and Their Roles in Dysbiosis, Common Diseases, and Novel Therapeutic Approaches, *Frontiers in Microbiology*. 6 (2015).
- [4] Y. Belkaid, S. Naik, Compartmentalized and Systemic Control of Tissue Immunity by Commensals, *Nature immunology*. 14 (2013) 10.1038/ni.2604. <https://doi.org/10.1038/ni.2604>.
- [5] J. Manos, The Human Microbiome in Disease and Pathology, *Apmis*. 130 (2022) 690-705. <https://doi.org/10.1111/apm.13225>.
- [6] Y. Bi, Immunology of Yersinia Pestis Infection, in: R. Yang, A. Anisimov (Éd.), *Yersinia Pestis: Retrospective and Perspective*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2016: p. 273-292. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0890-4_10.
- [7] L. Radoshevich, P. Cossart, *Listeria Monocytogenes* : Towards a Complete Picture of Its Physiology and Pathogenesis, *Nature Reviews Microbiology*. 16 (2018) 32-46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>.
- [8] S. Kim, A. Covington, E.G. Pamer, The Intestinal Microbiota: Antibiotics, Colonization Resistance, and Enteric Pathogens, *Immunological reviews*. 279 (2017) 90-105. <https://doi.org/10.1111/imr.12563>.
- [9] Q.R. Ducarmon, R.D. Zwitter, B.V.H. Hornung, W. van Schaik, V.B. Young, E.J. Kuijper, Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 83 (2019) e00007-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-19>.
- [10] D.J. Schwartz, A.E. Langdon, G. Dantas, Understanding the Impact of Antibiotic Perturbation on the Human Microbiome, *Genome Medicine*. 12 (2020) 82. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00782-x>.

- [11] M.H. Kollef, A. Torres, A.F. Shorr, I. Martin-Loeches, S.T. Micek, Nosocomial Infection, *Critical Care Medicine*. 49 (2021) 169. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004783>.
- [12] D.H. Stones, A.M. Krachler, Against the Tide: The Role of Bacterial Adhesion in Host Colonization, *Biochemical Society Transactions*. 44 (2016) 1571-1580. <https://doi.org/10.1042/BST20160186>.
- [13] J. Pizarro-Cerdá, P. Cossart, Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells, *Cell*. 124 (2006) 715-727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>.
- [14] M. Otto, Physical Stress and Bacterial Colonization, *FEMS microbiology reviews*. 38 (2014) 1250-1270. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12088>.
- [15] C. Solano, M. Echeverz, I. Lasa, Biofilm Dispersion and Quorum Sensing, *Current Opinion in Microbiology*. 18 (2014) 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>.
- [16] K.S. Ikuta, L.R. Swetschinski, G.R. Aguilar, F. Sharara, T. Mestrovic, A.P. Gray, N.D. Weaver, E.E. Wool, C. Han, A.G. Hayoon, A. Aali, S.M. Abate, M. Abbasi-Kangevari, Z. Abbasi-Kangevari, S. Abd-Elsalam, G. Abebe, A. Abedi, A.P. Abhari, H. Abidi, R.G. Aboagye, A. Absalan, H.A. Ali, J.M. Acuna, T.D. Adane, I.Y. Addo, O.A. Adegboye, M. Adnan, Q.E.S. Adnani, M.S. Afzal, S. Afzal, Z.B. Aghdam, B.O. Ahinkorah, A. Ahmad, A.R. Ahmad, R. Ahmad, S. Ahmad, S. Ahmadi, A. Ahmed, H. Ahmed, J.Q. Ahmed, T.A. Rashid, M. Ajami, B. Aji, M. Akbarzadeh-Khiavi, C.J. Akunna, H.A. Hamad, F. Alahdab, Z. Al-Aly, M.A. Aldeyab, A.V. Aleman, F.A.N. Alhalaiqa, R.K. Alhassan, B.A. Ali, L. Ali, S.S. Ali, Y. Alimohamadi, V. Alipour, A. Alizadeh, S.M. Aljunid, K. Allel, S. Almustanyir, E.K. Ameyaw, A.M.L. Amit, N. Anandavelane, R. Ancuceanu, C.L. Andrei, T. Andrei, D. Anggraini, A. Ansar, A.E. Anyasodor, J. Arabloo, A.Y. Aravkin, D. Areda, T. Aripov, A.A. Artamonov, J. Arulappan, R.T. Aruleba, M. Asaduzzaman, T. Ashraf, S.S. Athari, D. Atlaw, S. Attia, M. Ausloos, T. Awoke, B.P.A. Quintanilla, T.M. Ayana, S. Azadnajafabad, A.A. Jafari, D.B. B. M. Badar, A.D. Badiye, N. Baghchehghi, S. Bagherieh, A.A. Baig, I. Banerjee, A. Barac, M. Bardhan, F. Barone-Adesi, H.J. Barqawi, A. Barrow, P. Baskaran, S. Basu, A.-M.M. Batiha, N. Bedi, M.A. Belete, U.I. Belgaumi, R.G. Bender, B. Bhandari, D. Bhandari, P. Bhardwaj, S. Bhaskar, K. Bhattacharyya, S. Bhattarai, S. Bitaraf, D. Buonsenso, Z.A. Butt, F.L.C. dos Santos, F. Cai, D. Calina, P. Camargos, L.A. Cámara, R. Cárdenas, M. Cevik, J. Chadwick, J. Charan, A. Chaurasia, P.R. Ching, S.G. Choudhari, E.K. Chowdhury, F.R. Chowdhury, D.-T. Chu, I.S. Chukwu, O. Dadrás, F.T. Dagnaw, X. Dai, S. Das, A. Dastiridou, S.A. Debela, F.W. Demisse, S. Demissie, D. Dereje, M. Derese, H.D. Desai, F.N. Dessalegn, S.A.A. Dessalegni, B. Desye, K. Dhaduk, M. Dhimal, S. Dhingra, N. Diao, D. Diaz, S. Djalalinia, M. Dodangeh, D. Dongarwar, B.T. Dora, F. Dorostkar, H.L. Dsouza, E. Dubljanin, S.J. Dunachie, O.C. Durojaiye, H.A. Edinur, H.B. Ejigu, M. Ekholuenetale, T.C. Ekundayo, H. El-Abid, M. Elhadi, M.A. Elmonem, A. Emami, L.E. Bain, D.B. Enyew, R. Erkhembayar, B. Eshрати, F. Etaee, A.F. Fagbamigbe, S. Falahi, A. Fallahzadeh, Faraon MANY OTHERS, S. Salahi, H. Salari, S. Salehi, H.S. Kafil, A.M. Samy, N. Sanadgol, S. Sankaraman, F. Sanmarchi, B. Sathian, M. Sawhney, G.K. Saya, S. Senthilkumaran, A. Seylani, P.A. Shah, M.A. Shaikh, E. Shaker, M.Z. Shakhmardanov, M.M. Sharew, A. Sharifi-Razavi, P. Sharma, R.A. Sheikhi, A. Sheikhy, P.H. Shetty, M. Shigematsu, J.I. Shin, H. Shirzad-Aski, K.M. Shivakumar, P. Shobeiri, S.A. Shorofi, S. Shrestha, M.M. Sibhat, N.B. Sidemo, M.K. Sikder, L.M.L.R. Silva, J.A. Singh, P. Singh, S. Singh, M.S. Siraj, S.S. Siwal, V.Y. Skryabin, A.A. Skryabina, B. Socea, D.D. Solomon, Y. Song, C.T. Sreeramareddy, M. Suleman, R.S. Abdulkader, S. Sultana, M. Szócska, S.-A. Tabatabaeizadeh, M. Tabish, M. Taheri, E. Taki, K.-K. Tan, S. Tandukar, N.Y. Tat, V.Y. Tat, B.N. Tefera, Y.M. Tefera, G. Temesgen, M.-H. Tamsah, S. Tharwat, A. Thiyagarajan, I.I. Tleyjeh, C.E. Troeger, K.K. Umaphathi, E. Upadhyay, S.V. Tahbaz, P.R. Valdez, J.V. den Eynde, H.R. van Doorn, S. Vaziri, G.-I. Verras, H. Viswanathan, B. Vo, A. Waris, G.T. Wassie, N.D. Wickramasinghe, S. Yaghoubi, G.A.T.Y. Yahya, S.H.Y. Jabbari, A. Yigit, V. Yiğit, D.K. Yon, N. Yonemoto, M. Zahir, B.A. Zaman, S.B. Zaman, M. Zangiabadian, I. Zare, M.S. Zastrozhin, Z.-J. Zhang, P. Zheng, C. Zhong, M. Zoladl, A. Zumla, S.I. Hay, C. Dolecek, B. Sartorius, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet*. 400 (2022) 2221-2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7).
- [17] M. Diard, W.-D. Hardt, Evolution of Bacterial Virulence, *FEMS Microbiology Reviews*. 41 (2017) 679-697. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux023>.
- [18] L. Pirofski, A. Casadevall, Q and A What Is a Pathogen? A Question That Begs the Point, *BMC Biology*. 10 (2012) 6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-6>.

- [19] L. Chen, J. Yang, J. Yu, Z. Yao, L. Sun, Y. Shen, Q. Jin, VFDB: A Reference Database for Bacterial Virulence Factors, *Nucleic Acids Research*. 33 (2005) D325-D328. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>.
- [20] J.J. Quereda, P. Cossart, Regulating Bacterial Virulence with RNA, *Annual Review of Microbiology*. 71 (2017) 263-280. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020335>.
- [21] W.F. Schlech, P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, C.V. Broome, Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food, *New England Journal of Medicine*. 308 (1983) 203-206. <https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>.
- [22] C.M. de Noordhout, B. Devleeschauwer, F.J. Angulo, G. Verbeke, J. Haagsma, M. Kirk, A. Havelaar, N. Speybroeck, The Global Burden of Listeriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis, *The Lancet. Infectious diseases*. 14 (2014) 1073-1082. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70870-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70870-9).
- [23] H. Kammoun, M. Kim, L. Hafner, J. Gaillard, O. Disson, M. Lecuit, Listeriosis, a Model Infection to Study Host-Pathogen Interactions in Vivo, *Current Opinion in Microbiology*. 66 (2022) 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.015>.
- [24] J. McLauchlin, Human Listeriosis in Britain, 1967–85, a Summary of 722 Cases: 1. Listeriosis during Pregnancy and in the Newborn, *Epidemiology and Infection*. 104 (1990) 181-189. <https://doi.org/10.1017/S0950268800059343>.
- [25] J. McLauchlin, Human Listeriosis in Britain, 1967–85, a Summary of 722 Cases: 2. Listeriosis in Non-Pregnant Individuals, a Changing Pattern of Infection and Seasonal Incidence, *Epidemiology and Infection*. 104 (1990) 191-201. <https://doi.org/10.1017/S0950268800059355>.
- [26] P. Ghosh, E.M. Halvorsen, D.A. Ammendolia, N. Mor-Vaknin, M.X.D. O’Riordan, J.H. Brumell, D.M. Markovitz, D.E. Higgins, Invasion of the Brain by *Listeria Monocytogenes* Is Mediated by InlF and Host Cell Vimentin, *mBio*. 9 (2018) 10.1128/mbio.00160-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00160-18>.
- [27] A.I. Bakardjiev, J.A. Theriot, D.A. Portnoy, *Listeria Monocytogenes* Traffics from Maternal Organs to the Placenta and Back, *PLoS Pathogens*. 2 (2006) e66. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020066>.
- [28] M.M. Koopmans, M.C. Brouwer, J.A. Vázquez-Boland, D. van de Beek, Human Listeriosis, *Clinical Microbiology Reviews*. 36 (2022) e00060-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00060-19>.
- [29] M. Lecuit, *Listeria Monocytogenes*, a Model in Infection Biology, *Cellular Microbiology*. 22 (2020) e13186. <https://doi.org/10.1111/cmi.13186>.
- [30] P. Cossart, A. Lebreton, A Trip in the « New Microbiology » with the Bacterial Pathogen *Listeria Monocytogenes*, *FEBS Letters*. 588 (2014) 2437-2445. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.051>.
- [31] K. Ireton, B. Payraastre, P. Cossart, The *Listeria Monocytogenes* Protein InlB Is an Agonist of Mammalian Phosphoinositide 3-Kinase*, *Journal of Biological Chemistry*. 274 (1999) 17025-17032. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17025>.
- [32] C.L. Birmingham, V. Canadien, N.A. Kaniuk, B.E. Steinberg, D.E. Higgins, J.H. Brumell, Listeriolysin O Allows *Listeria Monocytogenes* Replication in Macrophage Vacuoles, *Nature*. 451 (2008) 350-354. <https://doi.org/10.1038/nature06479>.
- [33] C. Peron-Cane, J.-C. Fernandez, J. Leblanc, L. Wingertsmann, A. Gautier, N. Desprat, A. Lebreton, Fluorescent Secreted Bacterial Effectors Reveal Active Intravacuolar Proliferation of *Listeria Monocytogenes* in Epithelial Cells, *PLoS Pathogens*. 16 (2020) e1009001. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009001>.
- [34] A. Lebreton, F. Stavru, P. Cossart, Organelle Targeting during Bacterial Infection: Insights from *Listeria*, *Trends in Cell Biology*. 25 (2015) 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.003>.
- [35] M.M. King, B.B. Kayastha, M.A. Patrauchan, M.J. Franklin, Calcium Regulation of Bacterial Virulence, *Advances in experimental medicine and biology*. 1131 (2020) 827-855. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_33.
- [36] J. Hacker, G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, H. Tschäpe, Pathogenicity Islands of Virulent Bacteria: Structure, Function and Impact on Microbial Evolution, *Molecular Microbiology*. 23 (1997) 1089-1097. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x>.
- [37] N.E. Freitag, G.C. Port, M.D. Miner, *Listeria Monocytogenes* — from Saprophyte to Intracellular Pathogen, *Nature Reviews Microbiology*. 7 (2009) 623-628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2171>.

- [38] A. Lebreton, P. Cossart, RNA- and Protein-Mediated Control of *Listeria Monocytogenes* Virulence Gene Expression, *RNA Biology*. 14 (2016) 460-470. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1189069>.
- [39] J. Johansson, N.E. Freitag, Regulation of *Listeria Monocytogenes* Virulence, *Microbiology Spectrum*. 7 (2019) 10.1128/microbiolspec.gpp3-0064-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0064-2019>.
- [40] S.E. Osborne, J.H. Brummell, Listeriolysin O: From Bazooka to Swiss Army Knife, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 372 (2017). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0222>.
- [41] J. Johansson, P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer, P. Cossart, An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria Monocytogenes*, *Cell*. 110 (2002) 551-561. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00905-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00905-4).
- [42] M.L. Reniere, A.T. Whiteley, K.L. Hamilton, S.M. John, P. Lauer, R.G. Brennan, D.A. Portnoy, Glutathione Activates Virulence Gene Expression of an Intracellular Pathogen, *Nature*. 517 (2015) 170-173. <https://doi.org/10.1038/nature14029>.
- [43] E. Milohanic, P. Glaser, J.-Y. Coppée, L. Frangeul, Y. Vega, J.A. Vázquez-Boland, F. Kunst, P. Cossart, C. Buchrieser, Transcriptome Analysis of *Listeria Monocytogenes* Identifies Three Groups of Genes Differently Regulated by PrfA, *Molecular Microbiology*. 47 (2003) 1613-1625. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03413.x>.
- [44] M.M. Maury, Y.-H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E.P.C. Rocha, S. Brisse, M. Lecuit, Uncovering *Listeria Monocytogenes* Hypervirulence by Harnessing Its Biodiversity, *Nature Genetics*. 48 (2016) 308-313. <https://doi.org/10.1038/ng.3501>.
- [45] J.J. Quereda, O. Dussurget, M.-A. Nahori, A. Ghazlane, S. Volant, M.-A. Dillies, B. Regnault, S. Kennedy, S. Mondot, B. Villoing, P. Cossart, J. Pizarro-Cerda, Bacteriocin from Epidemic *Listeria* Strains Alters the Host Intestinal Microbiota to Favor Infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113 (2016) 5706-5711. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523899113>.
- [46] S.V. Pais, E. Kim, S. Wagner, Virulence-Associated Type III Secretion Systems in Gram-negative Bacteria, *Microbiology (Reading, England)*. 169 (2023). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001328>.
- [47] M. Desvaux, M. Hébraud, The Protein Secretion Systems in *Listeria*: Inside out Bacterial Virulence, *FEMS Microbiology Reviews*. 30 (2006) 774-805. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00035.x>.
- [48] A. Tsigotaki, J. De Geyter, N. Šoštarić, A. Economou, S. Karamanou, Protein Export through the Bacterial Sec Pathway, *Nature Reviews Microbiology*. 15 (2017) 21-36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.161>.
- [49] J. Pizarro-Cerdá, A. Charbit, J. Enninga, F. Lafont, P. Cossart, Manipulation of Host Membranes by the Bacterial Pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*, *Seminars in cell & developmental biology*. 60 (2016) 155-167. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.019>.
- [50] Y. Li, Y. Li, H.M. Mengist, C. Shi, C. Zhang, B. Wang, T. Li, Y. Huang, Y. Xu, T. Jin, Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction, *Toxins*. 13 (2021) 128. <https://doi.org/10.3390/toxins13020128>.
- [51] M.D. Peraro, F.G. van der Goot, Pore-Forming Toxins: Ancient, but Never Really out of Fashion, *Nature Reviews Microbiology*. 14 (2016) 77-92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>.
- [52] M. Bischofberger, I. Iacovache, F. Gisou van der Goot, Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response, *Cell Host & Microbe*. 12 (2012) 266-275. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.005>.
- [53] E. Margheritis, S. Kappelhoff, K. Cosentino, Pore-Forming Proteins: From Pore Assembly to Structure by Quantitative Single-Molecule Imaging, *International Journal of Molecular Sciences*. 24 (2023) 4528. <https://doi.org/10.3390/ijms24054528>.
- [54] M.A. Hamon, D. Ribet, F. Stavru, P. Cossart, Listeriolysin O: The Swiss Army Knife of *Listeria*, *Trends in Microbiology*. 20 (2012) 360-368. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.006>.
- [55] A.P. Heuck, P.C. Moe, B.B. Johnson, The Cholesterol-Dependent Cytolysin Family of Gram-Positive Bacterial Toxins, in: J.R. Harris (Éd.), *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Structure and Function in Health and Disease*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2010: p. 551-577. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_20.

- [56] B.A. Johnstone, R. Joseph, M.P. Christie, C.J. Morton, C. McGuiness, J.C. Walsh, T. Böcking, R.K. Tweten, M.W. Parker, Cholesterol-Dependent Cytolysins: The Outstanding Questions, *IUBMB Life*. 74 (2022) 1169-1179. <https://doi.org/10.1002/iub.2661>.
- [57] K.S. Giddings, J. Zhao, P.J. Sims, R.K. Tweten, Human CD59 Is a Receptor for the Cholesterol-Dependent Cytolysin Intermedilysin, *Nature Structural & Molecular Biology*. 11 (2004) 1173-1178. <https://doi.org/10.1038/nsmb862>.
- [58] M.R. Gonzalez, M. Bischofberger, B. Frêche, S. Ho, R.G. Parton, F.G. van der Goot, Pore-Forming Toxins Induce Multiple Cellular Responses Promoting Survival, *Cellular Microbiology*. 13 (2011) 1026-1043. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01600.x>.
- [59] P. Verma, S. Gandhi, K. Lata, K. Chattopadhyay, Pore-Forming Toxins in Infection and Immunity, *Biochemical Society Transactions*. 49 (2021) 455-465. <https://doi.org/10.1042/BST20200836>.
- [60] J. Mengaud, M.F. Vicente, J. Chenevert, J.M. Pereira, C. Geoffroy, B. Gicquel-Sanze, F. Baquero, J.C. Perez-Diaz, P. Cossart, Expression in Escherichia Coli and Sequence Analysis of the Listeriolysin O Determinant of Listeria Monocytogenes., *Infection and Immunity*. 56 (1988) 766-772.
- [61] S. Köster, K. van Pee, M. Hudel, M. Leustik, D. Rhinow, W. Kühlbrandt, T. Chakraborty, Ö. Yildiz, Crystal Structure of Listeriolysin O Reveals Molecular Details of Oligomerization and Pore Formation, *Nature Communications*. 5 (2014) 3690. <https://doi.org/10.1038/ncomms4690>.
- [62] N. Petrišič, M. Kozorog, S. Aden, M. Podobnik, G. Anderluh, The Molecular Mechanisms of Listeriolysin O-induced Lipid Membrane Damage, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1863 (2021) 183604. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183604>.
- [63] S. Cabezas, S. Ho, U. Ros, M.E. Lanio, C. Alvarez, F.G. van der Goot, Damage of Eukaryotic Cells by the Pore-Forming Toxin Sticholysin II: Consequences of the Potassium Efflux, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1859 (2017) 982-992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.001>.
- [64] T. Chakraborty, M. Leimeister-Wächter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, S. Notermans, Coordinate Regulation of Virulence Genes in Listeria Monocytogenes Requires the Product of the prfA Gene., *Journal of Bacteriology*. 174 (1992) 568-574.
- [65] A. Renzoni, P. Cossart, S. Dramsi, PrfA, the Transcriptional Activator of Virulence Genes, Is Upregulated during Interaction of Listeria Monocytogenes with Mammalian Cells and in Eukaryotic Cell Extracts, *Molecular Microbiology*. 34 (1999) 552-561. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01621.x>.
- [66] T. Burg-Golani, Y. Pozniak, L. Rabinovich, N. Sigal, R. Nir Paz, A.A. Herskovits, Membrane Chaperone SecDF Plays a Role in the Secretion of Listeria Monocytogenes Major Virulence Factors, *Journal of Bacteriology*. 195 (2013) 5262-5272. <https://doi.org/10.1128/JB.00697-13>.
- [67] R. Singh, A. Jamieson, P. Cresswell, GILT Is a Critical Host Factor for Listeria Monocytogenes Infection, *Nature*. 455 (2008) 1244-1247. <https://doi.org/10.1038/nature07344>.
- [68] A.L. Radtke, K.L. Anderson, M.J. Davis, M.J. DiMagno, J.A. Swanson, M.X. O'Riordan, Listeria Monocytogenes Exploits Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) to Escape the Phagosome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (2011) 1633-1638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013262108>.
- [69] D.W. Schuerch, E.M. Wilson-Kubalek, R.K. Tweten, Molecular Basis of Listeriolysin O pH Dependence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005) 12537-12542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500558102>.
- [70] S. Vadia, E. Arnett, A.-C. Haghghat, E.M. Wilson-Kubalek, R.K. Tweten, S. Seveau, The Pore-Forming Toxin Listeriolysin O Mediates a Novel Entry Pathway of L. Monocytogenes into Human Hepatocytes, *PLoS Pathogens*. 7 (2011) e1002356. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002356>.
- [71] E. Carrasco-Marín, F. Madrazo-Toca, J.R. de los Toyos, E. Cacho-Alonso, R. Tobes, E. Pareja, A. Paradela, J.P. Albar, W. Chen, M.T. Gomez-Lopez, C. Alvarez-Dominguez, The Innate Immunity Role of Cathepsin-D Is Linked to Trp-491 and Trp-492 Residues of Listeriolysin O, *Molecular Microbiology*. 72 (2009) 668-682. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06673.x>.

- [72] E. Arnett, S. Vadia, C.C. Nackerman, S. Oghumu, A.R. Satoskar, K.R. McLeish, S.M. Uriarte, S. Seveau, The Pore-Forming Toxin Listeriolysin O Is Degraded by Neutrophil Metalloproteinase-8 and Fails To Mediate *Listeria Monocytogenes* Intracellular Survival in Neutrophils, *The Journal of Immunology Author Choice*. 192 (2014) 234-244. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301302>.
- [73] P. Schnupf, D.A. Portnoy, A.L. Decatur, Phosphorylation, Ubiquitination and Degradation of Listeriolysin O in Mammalian Cells: Role of the PEST-like Sequence, *Cellular Microbiology*. 8 (2006) 353-364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00631.x>.
- [74] P. Schnupf, J. Zhou, A. Varshavsky, D.A. Portnoy, Listeriolysin O Secreted by *Listeria Monocytogenes* into the Host Cell Cytosol Is Degraded by the N-End Rule Pathway, *Infection and Immunity*. 75 (2007) 5135-5147. <https://doi.org/10.1128/IAI.00164-07>.
- [75] M. Corre, V. Boehm, V. Besic, A. Kurowska, A. Viry, A. Mohammad, C. Semanaut-Beaufort, M. Thomas-Chollier, A. Lebreton, Alternative Splicing of the Stress-Sensitive Regulator CIRBP Sharpens the Cellular Response to Bacterial Infection, *bioRxiv*. (2023). <https://doi.org/10.1101/2023.01.18.524578>.
- [76] D. Ribet, P. Cossart, Post-Translational Modifications in Host Cells during Bacterial Infection, *FEBS Letters*. 584 (2010) 2748-2758. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.012>.
- [77] I. Tattoli, M.T. Sorbara, C. Yang, S.A. Tooze, D.J. Philpott, S.E. Girardin, *Listeria* Phospholipases Subvert Host Autophagic Defenses by Stalling Pre-Autophagosomal Structures, *The EMBO Journal*. 32 (2013) 3066-3078. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.234>.
- [78] S. Vadia, S. Seveau, Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ Are Required for the Listeriolysin O-Dependent Internalization Pathway of *Listeria Monocytogenes*, *Infection and Immunity*. 82 (2014) 1084-1091. <https://doi.org/10.1128/IAI.01067-13>.
- [79] H. Repp, Z. Pamukçi, A. Koschinski, E. Domann, A. Darji, J. Birringer, D. Brockmeier, T. Chakraborty, F. Dreyer, Listeriolysin of *Listeria Monocytogenes* Forms Ca²⁺-Permeable Pores Leading to Intracellular Ca²⁺ Oscillations, *Cellular Microbiology*. 4 (2002) 483-491. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00207.x>.
- [80] N.O. Gekara, L. Groebe, N. Viegas, S. Weiss, *Listeria Monocytogenes* Desensitizes Immune Cells to Subsequent Ca²⁺ Signaling via Listeriolysin O-Induced Depletion of Intracellular Ca²⁺ Stores, *Infection and Immunity*. 76 (2008) 857-862. <https://doi.org/10.1128/IAI.00622-07>.
- [81] M.A. Hamon, P. Cossart, K⁺ Efflux Is Required for Histone H3 Dephosphorylation by *Listeria Monocytogenes* Listeriolysin O and Other Pore-Forming Toxins ∇ , *Infection and Immunity*. 79 (2011) 2839-2846. <https://doi.org/10.1128/IAI.01243-10>.
- [82] G.T. Van Nieu, C. Clair, G. Grompone, P. Sansonetti, Calcium Signalling during Cell Interactions with Bacterial Pathogens, *Biology of the Cell*. 96 (2004) 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.10.006>.
- [83] C.G.M. Gahan, C. Hill, *Listeria Monocytogenes*: Survival and Adaptation in the Gastrointestinal Tract, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4 (2014) 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00009>.
- [84] M.A. Williams, R.L. Schmidt, L.L. Lenz, Early Events Regulating Immunity and Pathogenesis during *Listeria Monocytogenes* Infection, *Trends in immunology*. 33 (2012) 488-495. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.04.007>.
- [85] S.E.F. D'Orazio, Innate and Adaptive Immune Responses during *Listeria Monocytogenes* Infection, *Microbiology Spectrum*. 7 (2019) 10.1128/microbiolspec.gpp3-0065-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0065-2019>.
- [86] T. Kawai, S. Akira, The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors, *Nature Immunology*. 11 (2010) 373-384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- [87] M. O'Riordan, C.H. Yi, R. Gonzales, K.-D. Lee, D.A. Portnoy, Innate Recognition of Bacteria by a Macrophage Cytosolic Surveillance Pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (2002) 13861-13866. <https://doi.org/10.1073/pnas.202476699>.
- [88] P.K. Anand, S.W.G. Tait, M. Lamkanfi, A.O. Amer, G. Nunez, G. Pagès, J. Pouyssegur, M.A. McGargill, D.R. Green, T.-D. Kanneganti, TLR2 and RIP2 Pathways Mediate Autophagy of *Listeria Monocytogenes* via Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Activation, *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (2011) 42981-42991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310599>.

- [89] V. Deretic, Autophagy in Immunity and Cell-Autonomous Defense Against Intracellular Microbes, *Immunological reviews*. 240 (2011) 92-104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00995.x>.
- [90] E. Theisen, J.-D. Sauer, *Listeria Monocytogenes* and the Inflammasome: From Cytosolic Bacteriolysis to Tumor Immunotherapy, *Current topics in microbiology and immunology*. 397 (2016) 133-160. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41171-2_7.
- [91] A. Pagliuso, T.N. Tham, E. Allemand, S. Robertin, B. Dupuy, Q. Bertrand, C. Bécavin, M. Koutero, V. Najburg, M.-A. Nahori, F. Tangy, F. Stavru, S. Bessonov, A. Dessen, C. Muchardt, A. Lebreton, A.V. Komarova, P. Cossart, An RNA-Binding Protein Secreted by a Bacterial Pathogen Modulates RIG-I Signaling, *Cell Host & Microbe*. 26 (2019) 823-835.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.004>.
- [92] O. Dussurget, H. Bierne, P. Cossart, The Bacterial Pathogen *Listeria Monocytogenes* and the Interferon Family: Type I, Type II and Type III Interferons, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4 (2014).
- [93] K. Hansen, T. Prabakaran, A. Laustsen, S.E. Jørgensen, S.H. Rahbæk, S.B. Jensen, R. Nielsen, J.H. Leber, T. Decker, K.A. Horan, M.R. Jakobsen, S.R. Paludan, *Listeria Monocytogenes* Induces IFN β Expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent Pathway, *The EMBO Journal*. 33 (2014) 1654-1666. <https://doi.org/10.15252/embj.201488029>.
- [94] Z. Abdullah, M. Schlee, S. Roth, M.A. Mraheil, W. Barchet, J. Böttcher, T. Hain, S. Geiger, Y. Hayakawa, J.H. Fritz, F. Civril, K.-P. Hopfner, C. Kurts, J. Ruland, G. Hartmann, T. Chakraborty, P.A. Knolle, RIG-I Detects Infection with Live *Listeria* by Sensing Secreted Bacterial Nucleic Acids, *The EMBO Journal*. 31 (2012) 4153-4164. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.274>.
- [95] R. Nandakumar, R. Tschisnarov, F. Meissner, T. Prabakaran, A. Krissanaprasit, E. Farahani, B. Zhang, S. Assil, A. Martin, W. Bertrams, C.K. Holm, A. Ablasser, T. Klause, M.K. Thomsen, B. Schmeck, K.A. Howard, T. Henry, K.V. Gothelf, T. Decker, S.R. Paludan, Intracellular Bacteria Engage a STING-TBK1-MVB12b Pathway to Enable Paracrine cGAS-STING Signalling, *Nature Microbiology*. 4 (2019) 701-713. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0367-z>.
- [96] G.M. Boxx, G. Cheng, The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection, *Cell Host & Microbe*. 19 (2016) 760-769. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.016>.
- [97] V.A.K. Rathinam, K.A. Fitzgerald, Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions, *Cell*. 165 (2016) 792-800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>.
- [98] R. Muñoz-Planillo, P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B.L. Smith, T.M. Rajendiran, G. Núñez, K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter, *Immunity*. 38 (2013) 1142-1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>.
- [99] A.M. Keestra-Gounder, P.E. Nagao, Inflammasome Activation by Gram-positive Bacteria: Mechanisms of Activation and Regulation, *Frontiers in Immunology*. 14 (2023) 1075834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1075834>.
- [100] H. Pillich, T. Chakraborty, M.A. Mraheil, Cell-Autonomous Responses in *Listeria Monocytogenes* Infection, *Future Microbiology*. 10 (2015). <https://doi.org/10.2217/fmb.15.4>.
- [101] B.N. Nguyen, B.N. Peterson, D.A. Portnoy, Listeriolysin O: A Phagosome-Specific Cytolysin Revisited, *Cellular microbiology*. 21 (2019) e12988. <https://doi.org/10.1111/cmi.12988>.
- [102] L. Yuan, Y. Zhu, S. Huang, L. Lin, X. Jiang, S. Chen, NF- κ B/ROS and ERK Pathways Regulate NLRP3 Inflammasome Activation in *Listeria Monocytogenes* Infected BV2 Microglia Cells, *Journal of Microbiology*. 59 (2021) 771-781. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0692-9>.
- [103] J. Wu, T. Fernandes-Alnemri, E.S. Alnemri, Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 Inflammasomes in Caspase-1 Activation by *Listeria Monocytogenes*, *Journal of Clinical Immunology*. 30 (2010) 693-702. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9425-2>.
- [104] C.E. McDougal, J.-D. Sauer, *Listeria Monocytogenes*: The Impact of Cell Death on Infection and Immunity, *Pathogens*. 7 (2018) 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010008>.
- [105] C. Hetz, K. Zhang, R.J. Kaufman, Mechanism, Regulation and Functions of the Unfolded Protein Response, *Nature reviews. Molecular cell biology*. 21 (2020) 421-438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.

- [106] H. Pillich, M. Loose, K.-P. Zimmer, T. Chakraborty, Activation of the Unfolded Protein Response by *Listeria Monocytogenes*, *Cellular Microbiology*. 14 (2012) 949-964. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01769.x>.
- [107] X. Tian, S. Zhang, L. Zhou, A.A. Seyhan, L. Hernandez Borrero, Y. Zhang, W.S. El-Deiry, Targeting the Integrated Stress Response in Cancer Therapy, *Frontiers in Pharmacology*. 12 (2021) 747837. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.747837>.
- [108] K. Pakos-Zebrucka, I. Koryga, K. Mnich, M. Ljujic, A. Samali, A.M. Gorman, The Integrated Stress Response, *EMBO Reports*. 17 (2016) 1374-1395. <https://doi.org/10.15252/embr.201642195>.
- [109] C. Valderrama, A. Clark, F. Urano, E.R. Unanue, J.A. Carrero, *Listeria Monocytogenes* Induces an Interferon-enhanced Activation of the Integrated Stress Response That Is Detrimental for Resolution of Infection in Mice, *European Journal of Immunology*. 47 (2017) 830-840. <https://doi.org/10.1002/eji.201646856>.
- [110] V. Besic, F. Habibolahi, B. Noël, S. Rupp, A. Genovesio, A. Lebreton, Coordination of Transcriptional and Translational Regulations in Human Epithelial Cells Infected by *Listeria Monocytogenes*, *RNA Biology*. 0 (2020) 1-16. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1777380>.
- [111] J. Tsalikis, I. Tattoli, A. Ling, M.T. Sorbara, D.O. Croitoru, D.J. Philpott, S.E. Girardin, Intracellular Bacterial Pathogens Trigger the Formation of U Small Nuclear RNA Bodies (U Bodies) through Metabolic Stress Induction, *The Journal of Biological Chemistry*. 290 (2015) 20904-20918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659466>.
- [112] R. Wang, X. Jiang, P. Bao, M. Qin, J. Xu, Circadian Control of Stress Granules by Oscillating EIF2 α , *Cell Death & Disease*. 10 (2019) 215. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1471-y>.
- [113] S. Xu, D. Chen, D. Chen, Q. Hu, L. Zhou, X. Ge, J. Han, X. Guo, H. Yang, Pseudorabies Virus Infection Inhibits Stress Granules Formation via Dephosphorylating eIF2 α , *Veterinary Microbiology*. 247 (2020) 108786. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108786>.
- [114] R. Pourpre, G. Lakisic, E. Desgranges, P. Cossart, A. Pagliuso, H. Bierne, A Bacterial Virulence Factor Interacts with the Splicing Factor RBM5 and Stimulates Formation of Nuclear RBM5 Granules, *Scientific Reports*. 12 (2022) 21961. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26037-w>.
- [115] M.J.G. Eldridge, P. Cossart, M.A. Hamon, Pathogenic Biohacking: Induction, Modulation and Subversion of Host Transcriptional Responses by *Listeria Monocytogenes*, *Toxins*. 12 (2020) 294. <https://doi.org/10.3390/toxins12050294>.
- [116] T. Regan, K. Nally, R. Carmody, A. Houston, F. Shanahan, J. MacSharry, E. Brint, Identification of TLR10 as a Key Mediator of the Inflammatory Response to *Listeria Monocytogenes* in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages, *The Journal of Immunology*. 191 (2013) 6084-6092. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203245>.
- [117] O. Mirzalieva, M. Juncker, J. Schwartzenburg, S. Desai, ISG15 and ISGylation in Human Diseases, *Cells*. 11 (2022) 538. <https://doi.org/10.3390/cells11030538>.
- [118] L. Radoshevich, F. Impens, D. Ribet, J.J. Quereda, T. Nam Tham, M.-A. Nahori, H. Bierne, O. Dussurget, J. Pizarro-Cerdá, K.-P. Knobloch, P. Cossart, ISG15 Counteracts *Listeria Monocytogenes* Infection, *eLife*. 4 (2015) e06848. <https://doi.org/10.7554/eLife.06848>.
- [119] A.R. Shenoy, D.A. Wellington, P. Kumar, H. Kassa, C.J. Booth, P. Cresswell, J.D. MacMicking, GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals, *Science*. 336 (2012) 481-485. <https://doi.org/10.1126/science.1217141>.
- [120] R. Frantz, L. Teubner, T. Schultze, L. La Pietra, C. Müller, K. Gwozdzinski, H. Pillich, T. Hain, M. Weber-Gerlach, G.-D. Panagiotidis, A. Mostafa, F. Weber, M. Rohde, S. Pleschka, T. Chakraborty, M. Abu Mraheil, The secRNome of *Listeria Monocytogenes* Harbors Small Noncoding RNAs That Are Potent Inducers of Beta Interferon, *mBio*. 10 (2019) 10.1128/mbio.01223-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.01223-19>.
- [121] S. Kayal, A. Lilienbaum, C. Poyart, S. Memet, A. Israel, P. Berche, Listeriolysin O-dependent Activation of Endothelial Cells during Infection with *Listeria Monocytogenes*: Activation of NF- κ B and Upregulation of Adhesion Molecules and Chemokines, *Molecular Microbiology*. 31 (1999) 1709-1722. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01305.x>.

- [122] R. Drolia, S. Tenguria, A.C. Durkes, J.R. Turner, A.K. Bhunia, Listeria Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation, *Cell Host & Microbe*. 23 (2018) 470-484.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.004>.
- [123] A. Mansell, N. Khelef, P. Cossart, L.A.J. O'Neill, Internalin B Activates Nuclear Factor- κ B via Ras, Phosphoinositide 3-Kinase, and Akt*, *Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 43597-43603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105202200>.
- [124] E. Gouin, M. Adib-Conquy, D. Balestrino, M.-A. Nahori, V. Villiers, F. Colland, S. Dramsi, O. Dussurget, P. Cossart, The Listeria Monocytogenes InC Protein Interferes with Innate Immune Responses by Targeting the I B Kinase Subunit IKK, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (2010) 17333-17338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007765107>.
- [125] D. Ribet, M. Hamon, E. Gouin, M.-A. Nahori, F. Impens, H. Neyret-Kahn, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Dejean, P. Cossart, Listeria Monocytogenes Impairs SUMOylation for Efficient Infection, *Nature*. 464 (2010) 1192-1195. <https://doi.org/10.1038/nature08963>.
- [126] G. Felsenfeld, M. Groudine, Controlling the Double Helix, *Nature*. 421 (2003) 448-453. <https://doi.org/10.1038/nature01411>.
- [127] T. Jenuwein, D. Allis, Translating the Histone Code, *Science*. 293 (2001) 1074-1080. <https://doi.org/DOI:10.1126/science.1063127>.
- [128] M.A. Hamon, E. Batsché, B. Régault, T.N. Tham, S. Seveau, C. Muchardt, P. Cossart, Histone Modifications Induced by a Family of Bacterial Toxins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (2007) 13467-13472. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702729104>.
- [129] H.A. Eskandarian, F. Impens, M.-A. Nahori, G. Soubigou, J.-Y. Coppée, P. Cossart, M.A. Hamon, A Role for SIRT2-Dependent Histone H3K18 Deacetylation in Bacterial Infection, *Science*. 341 (2013). <https://doi.org/10.1126/science.1238858>.
- [130] H. Bierne, L. Travier, T. Mahlaköiv, L. Tailleux, A. Subtil, A. Lebreton, A. Paliwal, B. Gicquel, P. Staeheli, M. Lecuit, P. Cossart, Activation of Type III Interferon Genes by Pathogenic Bacteria in Infected Epithelial Cells and Mouse Placenta, *PLoS ONE*. 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039080>.
- [131] A. Lebreton, G. Lakisic, V. Job, L. Fritsch, T.N. Tham, A. Camejo, P.-J. Matteï, B. Régault, M.-A. Nahori, D. Cabanes, A. Gautreau, S. Ait-Si-Ali, A. Dessen, P. Cossart, H. Bierne, A Bacterial Protein Targets the BAHD1 Chromatin Complex to Stimulate Type III Interferon Response, *Science*. 331 (2011). <https://doi.org/10.1126/science.1198125>.
- [132] A. Prokop, E. Gouin, V. Villiers, M.-A. Nahori, R. Vincentelli, M. Duval, P. Cossart, O. Dussurget, OrfX, a Nucleomodulin Required for Listeria Monocytogenes Virulence, *mBio*. 8 (2017) e01550-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01550-17>.
- [133] A.K.D. Schnitger, A. Machova, R.U. Mueller, A. Androulidaki, B. Schermer, M. Pasparakis, M. Krönke, N. Papadopoulou, Listeria Monocytogenes Infection in Macrophages Induces Vacuolar-Dependent Host miRNA Response, *PLOS ONE*. 6 (2011) e27435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027435>.
- [134] B. Izar, G.K. Mannala, M.A. Mraheil, T. Chakraborty, T. Hain, microRNA Response to Listeria Monocytogenes Infection in Epithelial Cells, *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (2012) 1173-1185. <https://doi.org/10.3390/ijms13011173>.
- [135] N.T. Ingolia, S. Ghaemmaghami, J.R.S. Newman, J.S. Weissman, Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling, *Science (New York, N.Y.)*. 324 (2009) 218-223. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>.
- [136] A. Ramanathan, G.B. Robb, S.-H. Chan, mRNA Capping: Biological Functions and Applications, *Nucleic Acids Research*. 44 (2016) 7511-7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>.
- [137] S. Zaccara, R.J. Ries, S.R. Jaffrey, Reading, Writing and Erasing mRNA Methylation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 20 (2019) 608-624. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>.
- [138] R.J. Jackson, C.U.T. Hellen, T.V. Pestova, The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11 (2010) 113-127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>.

- [139] D. Hong, S. Jeong, 3'UTR Diversity: Expanding Repertoire of RNA Alterations in Human mRNAs, *Molecules and Cells*. 46 (2023) 48-56. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0003>.
- [140] B. Tian, J.L. Manley, Alternative Polyadenylation of mRNA Precursors, *Nature reviews. Molecular cell biology*. 18 (2017) 18-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.116>.
- [141] M.K. Vorländer, B. Pacheco-Fiallos, C. Plaschka, Structural Basis of mRNA Maturation: Time to Put It Together, *Current Opinion in Structural Biology*. 75 (2022) 102431. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102431>.
- [142] E.D. Karousis, O. Mühlemann, Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 11 (2019) a032862. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032862>.
- [143] T. Hirose, K. Ninomiya, S. Nakagawa, T. Yamazaki, A Guide to Membraneless Organelles and Their Various Roles in Gene Regulation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 24 (2023) 288-304. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00558-8>.
- [144] A.G. Matera, Z. Wang, A Day in the Life of the Spliceosome, *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15 (2014) 108-121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>.
- [145] Y. Zhang, J. Qian, C. Gu, Y. Yang, Alternative Splicing and Cancer: A Systematic Review, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 6 (2021) 78. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00486-7>.
- [146] K. Ninomiya, J. Iwakiri, M.K. Aly, Y. Sakaguchi, S. Adachi, T. Natsume, G. Terai, K. Asai, T. Suzuki, T. Hirose, m6A Modification of HSATIII lncRNAs Regulates Temperature-Dependent Splicing, *The EMBO Journal*. 40 (2021) e107976. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107976>.
- [147] D.L. Spector, A.I. Lamond, Nuclear Speckles, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3 (2011) a000646. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>.
- [148] T. Yamazaki, S. Nakagawa, T. Hirose, Architectural RNAs for Membraneless Nuclear Body Formation, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 84 (2019) 227-237. <https://doi.org/10.1101/sqb.2019.84.039404>.
- [149] V. Lallemand-Breitenbach, H. de Thé, PML Nuclear Bodies: From Architecture to Function, *Current Opinion in Cell Biology*. 52 (2018) 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011>.
- [150] N. Standart, D. Weil, P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage, *Trends in Genetics: TIG*. 34 (2018) 612-626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.005>.
- [151] M.A. Ferraiuolo, S. Basak, J. Dostie, E.L. Murray, D.R. Schoenberg, N. Sonenberg, A Role for the eIF4E-binding Protein 4E-T in P-body Formation and mRNA Decay, *Journal of Cell Biology*. 170 (2005) 913-924. <https://doi.org/10.1083/jcb.200504039>.
- [152] W. Ma, C. Mayr, A Membraneless Organelle Associated with the Endoplasmic Reticulum Enables 3'UTR-Mediated Protein-Protein Interactions, *Cell*. 175 (2018) 1492-1506.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.007>.
- [153] N. Kedersha, P. Anderson, Stress Granules: Sites of mRNA Triage That Regulate mRNA Stability and Translatability, *Biochemical Society Transactions*. 30 (2002) 963-969. <https://doi.org/10.1042/bst0300963>.
- [154] D.S.W. Protter, R. Parker, Principles and Properties of Stress Granules, *Trends in cell biology*. 26 (2016) 668-679. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004>.
- [155] J.R. Buchan, R. Parker, Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation, *Molecular Cell*. 36 (2009) 932-941. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.020>.
- [156] K. Ninomiya, S. Adachi, T. Natsume, J. Iwakiri, G. Terai, K. Asai, T. Hirose, LncRNA-dependent Nuclear Stress Bodies Promote Intron Retention through SR Protein Phosphorylation, *The EMBO Journal*. 39 (2020) e102729. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102729>.
- [157] O. Isken, L.E. Maquat, Quality Control of Eukaryotic mRNA: Safeguarding Cells from Abnormal mRNA Function, *Genes & Development*. 21 (2007) 1833-1856. <https://doi.org/10.1101/gad.1566807>.
- [158] J. Cheng, L.E. Maquat, Nonsense Codons Can Reduce the Abundance of Nuclear mRNA without Affecting the Abundance of Pre-mRNA or the Half-Life of Cytoplasmic mRNA., *Molecular and Cellular Biology*. 13 (1993) 1892. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.3.1892>.

- [159] T. Kurosaki, L.E. Maquat, Nonsense-Mediated mRNA Decay in Humans at a Glance, *Journal of Cell Science*. 129 (2016) 461-467. <https://doi.org/10.1242/jcs.181008>.
- [160] H. Le Hir, J. Saulière, Z. Wang, The Exon Junction Complex as a Node of Post-Transcriptional Networks, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 17 (2016) 41-54. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>.
- [161] M. Colombo, E.D. Karousis, J. Bourquin, R. Bruggmann, O. Mühlemann, Transcriptome-Wide Identification of NMD-targeted Human mRNAs Reveals Extensive Redundancy between SMG6- and SMG7-mediated Degradation Pathways, *RNA*. 23 (2017) 189-201. <https://doi.org/10.1261/rna.059055.116>.
- [162] H. Yepiskoposyan, F. Aeschmann, D. Nilsson, M. Okoniewski, O. Mühlemann, Autoregulation of the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway in Human Cells, *RNA*. 17 (2011) 2108-2118. <https://doi.org/10.1261/rna.030247.111>.
- [163] N. Hug, D. Longman, J.F. Cáceres, Mechanism and Regulation of the Nonsense-Mediated Decay Pathway, *Nucleic Acids Research*. 44 (2016) 1483-1495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw010>.
- [164] H. Le Hir, D. Gatfield, E. Izaurralde, M.J. Moore, The Exon-Exon Junction Complex Provides a Binding Platform for Factors Involved in mRNA Export and Nonsense-Mediated mRNA Decay, *The EMBO Journal*. 20 (2001) 4987-4997. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4987>.
- [165] V. Boehm, N. Haberman, F. Ottens, J. Ule, N.H. Gehring, 3' UTR Length and Messenger Ribonucleoprotein Composition Determine Endocleavage Efficiencies at Termination Codons, *Cell Reports*. 9 (2014) 555-568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.012>.
- [166] M. Bühler, S. Steiner, F. Mohn, A. Paillusson, O. Mühlemann, EJC-independent Degradation of Nonsense Immunoglobulin- μ mRNA Depends on 3' UTR Length, *Nature Structural & Molecular Biology*. 13 (2006) 462-464. <https://doi.org/10.1038/nsmb1081>.
- [167] P.M. Moriarty, C.C. Reddy, L.E. Maquat, Selenium Deficiency Reduces the Abundance of mRNA for Se-Dependent Glutathione Peroxidase 1 by a UGA-Dependent Mechanism Likely To Be Nonsense Codon-Mediated Decay of Cytoplasmic mRNA, *Molecular and Cellular Biology*. 18 (1998) 2932-2939.
- [168] O. Vargas-Rodriguez, M. Englert, A. Merkuriev, T. Mukai, D. Söll, Recoding of the Selenocysteine UGA Codon by Cysteine in the Presence of a Non-Canonical tRNA^{Cys} and Elongation Factor SelB, *RNA Biology*. 15 (2018) 471-479. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1474074>.
- [169] J.A. Hurt, A.D. Robertson, C.B. Burge, Global Analyses of UPF1 Binding and Function Reveal Expanded Scope of Nonsense-Mediated mRNA Decay, *Genome Research*. 23 (2013) 1636-1650. <https://doi.org/10.1101/gr.157354.113>.
- [170] G. Singh, I. Rebbapragada, J. Lykke-Andersen, A Competition between Stimulators and Antagonists of Upf Complex Recruitment Governs Human Nonsense-Mediated mRNA Decay, *PLOS Biology*. 6 (2008) e111. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060111>.
- [171] Y. Huang, J.A. Steitz, Splicing Factors SRp20 and 9G8 Promote the Nucleocytoplasmic Export of mRNA, *Molecular Cell*. 7 (2001) 899-905. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00233-7).
- [172] H. Le Hir, B. Séraphin, EJCs at the Heart of Translational Control, *Cell*. 133 (2008) 213-216. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.002>.
- [173] C.U.T. Hellen, Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 10 (2018). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>.
- [174] N. Imamachi, K.A. Salam, Y. Suzuki, N. Akimitsu, A GC-rich Sequence Feature in the 3' UTR Directs UPF1-dependent mRNA Decay in Mammalian Cells, *Genome Research*. 27 (2017) 407-418. <https://doi.org/10.1101/gr.206060.116>.
- [175] V. Boehm, S. Kueckelmann, J.V. Gerbracht, S. Kallabis, T. Britto-Borges, J. Altmüller, M. Krüger, C. Dieterich, N.H. Gehring, SMG5-SMG7 Authorize Nonsense-Mediated mRNA Decay by Enabling SMG6 Endonucleolytic Activity, *Nature Communications*. 12 (2021) 3965. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24046-3>.
- [176] Y.K. Kim, L.E. Maquat, UPF1 Front and Center in RNA Decay: UPF1 in Nonsense-Mediated mRNA Decay and Beyond, *RNA*. 25 (2019) 407-422. <https://doi.org/10.1261/rna.070136.118>.

- [177] K.T. Powers, J.-Y.A. Szeto, C. Schaffitzel, New Insights into No-Go, Non-Stop and Nonsense-Mediated mRNA Decay Complexes, *Current Opinion in Structural Biology*. 65 (2020) 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.011>.
- [178] D. Lavysh, G. Neu-Yilik, UPF1-Mediated RNA Decay—Danse Macabre in a Cloud, *Biomolecules*. 10 (2020) 999. <https://doi.org/10.3390/biom10070999>.
- [179] G. Balistreri, P. Horvath, C. Schweingruber, D. Zünd, G. McInerney, A. Merits, O. Mühlemann, C. Azzalin, A. Helenius, The Host Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway Restricts Mammalian RNA Virus Replication, *Cell Host & Microbe*. 16 (2014) 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.007>.
- [180] A.T. Belew, A. Meskauskas, S. Musalgaonkar, V.M. Advani, S.O. Sulima, W.K. Kasprzak, B.A. Shapiro, J.D. Dinman, Ribosomal Frameshifting in the CCR5 mRNA Is Regulated by miRNAs and the NMD Pathway, *Nature*. 512 (2014) 265-269. <https://doi.org/10.1038/nature13429>.
- [181] L.B. Gardner, Hypoxic Inhibition of Nonsense-Mediated RNA Decay Regulates Gene Expression and the Integrated Stress Response, *Molecular and Cellular Biology*. 28 (2008) 3729-3741. <https://doi.org/10.1128/MCB.02284-07>.
- [182] L.B. Gardner, Nonsense Mediated RNA Decay Regulation by Cellular Stress; Implications for Tumorigenesis, *Molecular cancer research : MCR*. 8 (2010) 295-308. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0502>.
- [183] J. Wengrod, L. Martin, D. Wang, P. Frischmeyer-Guerrero, H.C. Dietz, L.B. Gardner, Inhibition of Nonsense-Mediated RNA Decay Activates Autophagy, *Molecular and Cellular Biology*. 33 (2013) 2128-2135. <https://doi.org/10.1128/MCB.00174-13>.
- [184] T. Kurosaki, M.W. Popp, L.E. Maquat, Quality and Quantity Control of Gene Expression by Nonsense-Mediated mRNA Decay, *Nature reviews. Molecular cell biology*. 20 (2019) 406-420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>.
- [185] W. Kugler, J. Enssle, M.W. Hentze, A.E. Kulozik, Nuclear Degradation of Nonsense Mutated Beta-Globin mRNA: A Post-Transcriptional Mechanism to Protect Heterozygotes from Severe Clinical Manifestations of Beta-Thalassemia?, *Nucleic Acids Research*. 23 (1995) 413-418.
- [186] T.P. Kerr, C.A. Sewry, S.A. Robb, R.G. Roberts, Long Mutant Dystrophins and Variable Phenotypes: Evasion of Nonsense-Mediated Decay?, *Human Genetics*. 109 (2001) 402-407. <https://doi.org/10.1007/s004390100598>.
- [187] A. Addington, J. Gauthier, A. Piton, F. Hamdan, A. Raymond, N. Gogtay, R. Miller, J. Tossell, J. Bakalar, G. Germain, P. Gochman, R. Long, J. Rapoport, G. Rouleau, A Novel Frameshift Mutation in UPF3B Identified in Brothers Affected with Childhood Onset Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders, *Molecular psychiatry*. 16 (2011) 238-239. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.59>.
- [188] F. Supek, B. Lehner, R.G.H. Lindeboom, To NMD or Not To NMD: Nonsense-Mediated mRNA Decay in Cancer and Other Genetic Diseases, *Trends in Genetics*. 37 (2021) 657-668. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.11.002>.
- [189] D. Wang, J. Zavadil, L. Martin, F. Parisi, E. Friedman, D. Levy, H. Harding, D. Ron, L.B. Gardner, Inhibition of Nonsense-Mediated RNA Decay by the Tumor Microenvironment Promotes Tumorigenesis ∇, *Molecular and Cellular Biology*. 31 (2011) 3670-3680. <https://doi.org/10.1128/MCB.05704-11>.
- [190] A. Bokhari, V. Jonchere, A. Lagrange, R. Bertrand, M. Svrcek, L. Marisa, O. Buhard, M. Greene, A. Demidova, J. Jia, E. Adriaenssens, T. Chassat, D.S. Biard, J.-F. Flejou, F. Lejeune, A. Duval, A. Collura, Targeting Nonsense-Mediated mRNA Decay in Colorectal Cancers with Microsatellite Instability, *Oncogenesis*. 7 (2018) 70. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0079-x>.
- [191] Y. Zhang, X. Xie, P.N. Yeganeh, D.-J. Lee, D. Valle-Garcia, K.F. Meza-Sosa, C. Junqueira, J. Su, H.R. Luo, W. Hide, J. Lieberman, Immunotherapy for Breast Cancer Using EpCAM Aptamer Tumor-Targeted Gene Knockdown, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118 (2021) e2022830118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022830118>.
- [192] K.-F. Tung, C.-Y. Pan, C.-H. Chen, W. Lin, Top-Ranked Expressed Gene Transcripts of Human Protein-Coding Genes Investigated with GTEx Dataset, *Scientific Reports*. 10 (2020) 16245. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73081-5>.

- [193] J.M. Rodriguez, P. Maietta, I. Ezkurdia, A. Pietrelli, J.-J. Wesselink, G. Lopez, A. Valencia, M.L. Tress, APPRIS: Annotation of Principal and Alternative Splice Isoforms, *Nucleic Acids Research*. 41 (2013) D110-D117. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1058>.
- [194] A. Piovesan, M. Caracausi, F. Antonaros, M.C. Pelleri, L. Vitale, GeneBase 1.1: A Tool to Summarize Data from NCBI Gene Datasets and Its Application to an Update of Human Gene Statistics, *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*. 2016 (2016) baw153. <https://doi.org/10.1093/database/baw153>.
- [195] Q. Pan, O. Shai, L.J. Lee, B.J. Frey, B.J. Blencowe, Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing, *Nature Genetics*. 40 (2008) 1413-1415. <https://doi.org/10.1038/ng.259>.
- [196] X.-D. Fu, M. Ares, Context-Dependent Control of Alternative Splicing by RNA-binding Proteins, *Nature Reviews Genetics*. 15 (2014) 689-701. <https://doi.org/10.1038/nrg3778>.
- [197] T. Haltenhof, A. Kotte, F. De Bortoli, S. Schiefer, S. Meinke, A.-K. Emmerichs, K.K. Petermann, B. Timmermann, P. Imhof, A. Franz, B. Loll, M.C. Wahl, M. Preußner, F. Heyd, A Conserved Kinase-Based Body-Temperature Sensor Globally Controls Alternative Splicing and Gene Expression, *Molecular Cell*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.028>.
- [198] T. Geuens, D. Bouhy, V. Timmerman, The hnRNP Family: Insights into Their Role in Health and Disease, *Human Genetics*. 135 (2016) 851-867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>.
- [199] S. Jacquenet, A. Méreau, P.S. Bilodeau, L. Damier, C.M. Stoltzfus, C. Branlant, A Second Exon Splicing Silencer within Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Exon 2 Represses Splicing of Tat mRNA and Binds Protein hnRNP H*, *Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 40464-40475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104070200>.
- [200] E. Buratti, M. Baralle, L. De Conti, D. Baralle, M. Romano, Y.M. Ayala, F.E. Baralle, hnRNP H Binding at the 5' Splice Site Correlates with the Pathological Effect of Two Intronic Mutations in the NF-1 and TSH β Genes, *Nucleic Acids Research*. 32 (2004) 4224-4236. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh752>.
- [201] A. Expert-Bezançon, A. Sureau, P. Durosay, R. Salesse, H. Groeneveld, J.P. Lecaer, J. Marie, hnRNP A1 and the SR Proteins ASF/SF2 and SC35 Have Antagonistic Functions in Splicing of β -Tropomyosin Exon 6B*, *Journal of Biological Chemistry*. 279 (2004) 38249-38259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405377200>.
- [202] S. Sharma, A.M. Falick, D.L. Black, Polypyrimidine Tract Binding Protein Blocks the 5' Splice Site Dependent Assembly of U2AF and the Prespliceosomal E Complex, *Molecular cell*. 19 (2005) 485-496. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.014>.
- [203] J.L. Manley, A.R. Krainer, A Rational Nomenclature for Serine/Arginine-Rich Protein Splicing Factors (SR Proteins), *Genes & Development*. 24 (2010) 1073-1074. <https://doi.org/10.1101/gad.1934910>.
- [204] A.M. Zahler, W.S. Lane, J.A. Stolk, M.B. Roth, SR Proteins: A Conserved Family of Pre-mRNA Splicing Factors., *Genes & Development*. 6 (1992) 837-847. <https://doi.org/10.1101/gad.6.5.837>.
- [205] J.Y. Wu, T. Maniatis, Specific Interactions between Proteins Implicated in Splice Site Selection and Regulated Alternative Splicing, *Cell*. 75 (1993) 1061-1070. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90316-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90316-l).
- [206] J.D. Kohtz, S.F. Jamison, C.L. Will, P. Zuo, R. Lührmann, M.A. Garcia-Blanco, J.L. Manley, Protein-Protein Interactions and 5'-Splice-Site Recognition in Mammalian mRNA Precursors, *Nature*. 368 (1994) 119-124. <https://doi.org/10.1038/368119a0>.
- [207] Z. Zhou, X.-D. Fu, Regulation of Splicing by SR Proteins and SR Protein-Specific Kinases, *Chromosoma*. 122 (2013) 191-207. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>.
- [208] B.L. Robberson, G.J. Cote, S.M. Berget, Exon Definition May Facilitate Splice Site Selection in RNAs with Multiple Exons., *Molecular and Cellular Biology*. 10 (1990) 84-94.
- [209] B.R. Graveley, K.J. Hertel, T. Maniatis, The Role of U2AF35 and U2AF65 in Enhancer-Dependent Splicing., *RNA*. 7 (2001) 806-818.
- [210] J. Zhu, A. Mayeda, A.R. Krainer, Exon Identity Established through Differential Antagonism between Exonic Splicing Silencer-Bound hnRNP A1 and Enhancer-Bound SR Proteins, *Molecular Cell*. 8 (2001) 1351-1361. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00409-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00409-9).

- [211] R.F. Roscigno, M.A. Garcia-Blanco, SR Proteins Escort the U4/U6.U5 Tri-snRNP to the Spliceosome., *RNA*. 1 (1995) 692-706.
- [212] D.F. Comiskey, A.G. Jacob, R.K. Singh, A.S. Tapia-Santos, D.S. Chandler, Splicing Factor SRSF1 Negatively Regulates Alternative Splicing of MDM2 under Damage, *Nucleic Acids Research*. 43 (2015) 4202-4218. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv223>.
- [213] S. Erkelenz, W.F. Mueller, M.S. Evans, A. Busch, K. Schöneweis, K.J. Hertel, H. Schaal, Position-Dependent Splicing Activation and Repression by SR and hnRNP Proteins Rely on Common Mechanisms, *RNA*. 19 (2013) 96-102. <https://doi.org/10.1261/rna.037044.112>.
- [214] J. Han, J.-H. Ding, C.W. Byeon, J.H. Kim, K.J. Hertel, S. Jeong, X.-D. Fu, SR Proteins Induce Alternative Exon Skipping through Their Activities on the Flanking Constitutive Exons, *Molecular and Cellular Biology*. 31 (2011) 793-802. <https://doi.org/10.1128/mcb.01117-10>.
- [215] S. Pandit, Y. Zhou, L. Shiue, G. Coutinho-Mansfield, H. Li, J. Qiu, J. Huang, G.W. Yeo, M. Ares, X.-D. Fu, Genome-Wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing, *Molecular Cell*. 50 (2013) 223-235. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.001>.
- [216] J.R. Sanford, J.D. Ellis, D. Cazalla, J.F. Cáceres, Reversible Phosphorylation Differentially Affects Nuclear and Cytoplasmic Functions of Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005) 15042-15047. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507827102>.
- [217] H. Shen, M.R. Green, A Pathway of Sequential Arginine-Serine-Rich Domain-Splicing Signal Interactions during Mammalian Spliceosome Assembly, *Molecular Cell*. 16 (2004) 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.021>.
- [218] J.M. Yeakley, H. Tronchère, J. Olesen, J.A. Dyck, H.-Y. Wang, X.-D. Fu, Phosphorylation Regulates In Vivo Interaction and Molecular Targeting of Serine/Arginine-rich Pre-mRNA Splicing Factors, *The Journal of Cell Biology*. 145 (1999) 447-455.
- [219] J.E. Mermoud, P.T. Cohen, A.I. Lamond, Regulation of Mammalian Spliceosome Assembly by a Protein Phosphorylation Mechanism., *The EMBO Journal*. 13 (1994) 5679-5688. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06906.x>.
- [220] S. Cho, A. Hoang, R. Sinha, X.-Y. Zhong, X.-D. Fu, A.R. Krainer, G. Ghosh, Interaction between the RNA Binding Domains of Ser-Arg Splicing Factor 1 and U1-70K snRNP Protein Determines Early Spliceosome Assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (2011) 8233-8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017700108>.
- [221] C. Shin, Y. Feng, J.L. Manley, Dephosphorylated SRp38 Acts as a Splicing Repressor in Response to Heat Shock, *Nature*. 427 (2004) 553-558. <https://doi.org/10.1038/nature02288>.
- [222] J.-F. Gui, W.S. Lane, X.-D. Fu, A Serine Kinase Regulates Intracellular Localization of Splicing Factors in the Cell Cycle, *Nature*. 369 (1994) 678-682. <https://doi.org/10.1038/369678a0>.
- [223] K. Colwill, L.L. Feng, J.M. Yeakley, G.D. Gish, J.F. Cáceres, T. Pawson, X.-D. Fu, SRPK1 and Clk/Sty Protein Kinases Show Distinct Substrate Specificities for Serine/Arginine-rich Splicing Factors *, *Journal of Biological Chemistry*. 271 (1996) 24569-24575. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24569>.
- [224] P. Martín Moyano, V. Němec, K. Paruch, Cdc-Like Kinases (CLKs): Biology, Chemical Probes, and Therapeutic Potential, *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020) 7549. <https://doi.org/10.3390/ijms21207549>.
- [225] M. Song, L. Pang, M. Zhang, Y. Qu, K.V. Laster, Z. Dong, Cdc2-like Kinases: Structure, Biological Function, and Therapeutic Targets for Diseases, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 8 (2023) 148. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01409-4>.
- [226] P.I. Duncan, D.F. Stojdl, R.M. Marius, J.C. Bell, In Vivo Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing by the Clk1 Protein Kinase., *Molecular and Cellular Biology*. 17 (1997) 5996-6001.
- [227] K. Ninomiya, N. Kataoka, M. Hagiwara, Stress-Responsive Maturation of Clk1/4 Pre-mRNAs Promotes Phosphorylation of SR Splicing Factor, *The Journal of Cell Biology*. 195 (2011) 27-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201107093>.

- [228] B.E. Aubol, G. Wu, M.M. Keshwani, M. Movassat, L. Fattet, K.J. Hertel, X.-D. Fu, J.A. Adams, Release of SR Proteins from CLK1 by SRPK1: A Symbiotic Kinase System for Phosphorylation Control of Pre-mRNA Splicing, *Molecular Cell*. 63 (2016) 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.034>.
- [229] K. Jiang, N.A. Patel, J.E. Watson, H. Apostolatos, E. Kleiman, O. Hanson, M. Hagiwara, D.R. Cooper, Akt2 Regulation of Cdc2-Like Kinases (Clk/Sty), Serine/Arginine-Rich (SR) Protein Phosphorylation, and Insulin-Induced Alternative Splicing of PKC β II Messenger Ribonucleic Acid, *Endocrinology*. 150 (2009) 2087-2097. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0818>.
- [230] X. Liu, P.S. Klein, Glycogen Synthase Kinase-3 and Alternative Splicing, *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. 9 (2018) e1501. <https://doi.org/10.1002/wrna.1501>.
- [231] L.F. Lareau, M. Inada, R.E. Green, J.C. Wengrod, S.E. Brenner, Unproductive Splicing of SR Genes Associated with Highly Conserved and Ultraconserved DNA Elements, *Nature*. 446 (2007) 926-929. <https://doi.org/10.1038/nature05676>.
- [232] C. de Oliveira Freitas Machado, M. Schafraneck, M. Brüggemann, M.C. Hernández Cañas, M. Keller, A. Di Liddo, A. Brezski, N. Blümel, B. Arnold, A. Bremm, I. Wittig, N. Jaé, F. McNicoll, S. Dimmeler, K. Zarnack, M. Müller-McNicoll, Poison Cassette Exon Splicing of SRSF6 Regulates Nuclear Speckle Dispersal and the Response to Hypoxia, *Nucleic Acids Research*. 51 (2023) 870-890. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1225>.
- [233] K. Kemmerer, S. Fischer, J.E. Weigand, Auto- and Cross-Regulation of the hnRNPs D and DL, *RNA*. 24 (2018) 324-331. <https://doi.org/10.1261/rna.063420.117>.
- [234] J.Z. Ni, L. Grate, J.P. Donohue, C. Preston, N. Nobida, G. O'Brien, L. Shiue, T.A. Clark, J.E. Blume, M. Ares, Ultraconserved Elements Are Associated with Homeostatic Control of Splicing Regulators by Alternative Splicing and Nonsense-Mediated Decay, *Genes & Development*. 21 (2007) 708-718. <https://doi.org/10.1101/gad.1525507>.
- [235] R. Sciarillo, A. Wojtuszkiewicz, Y.G. Assaraf, G. Jansen, G.J.L. Kaspers, E. Giovannetti, J. Cloos, The Role of Alternative Splicing in Cancer: From Oncogenesis to Drug Resistance, *Drug Resistance Updates*. 53 (2020) 100728. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2020.100728>.
- [236] L. He, H. Li, A. Wu, Y. Peng, G. Shu, G. Yin, Functions of N6-methyladenosine and Its Role in Cancer, *Molecular Cancer*. 18 (2019) 176. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1109-9>.
- [237] W. Xiao, S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, X. Wang, H.-L. Ma, C.-M. Huang, Y. Yang, N. Huang, G.-B. Jiang, H.-L. Wang, Q. Zhou, X.-J. Wang, Y.-L. Zhao, Y.-G. Yang, Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing, *Molecular Cell*. 61 (2016) 507-519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>.
- [238] N. Liu, K.I. Zhou, M. Parisien, Q. Dai, L. Diatchenko, T. Pan, N 6-Methyladenosine Alters RNA Structure to Regulate Binding of a Low-Complexity Protein, *Nucleic Acids Research*. 45 (2017) 6051-6063. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx141>.
- [239] Z.-L. Huang, J. Dai, W.-H. Luo, X.-G. Wang, J.-H. Tan, S.-B. Chen, Z.-S. Huang, Identification of G-Quadruplex-Binding Protein from the Exploration of RGG Motif/G-Quadruplex Interactions, *Journal of the American Chemical Society*. 140 (2018) 17945-17955. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b09329>.
- [240] L. Fish, M. Khoroshkin, A. Navickas, K. Garcia, B. Culbertson, B. Hänisch, S. Zhang, H.C.B. Nguyen, L.M. Soto, M. Dermit, F.K. Mardakheh, H. Molina, C. Alarcón, H.S. Najafabadi, H. Goodarzi, A Pro-Metastatic Splicing Program Regulated by SNRPA1 Interactions with Structured RNA Elements, *Science (New York, N.Y.)*. 372 (2021) eabc7531. <https://doi.org/10.1126/science.abc7531>.
- [241] R. Rahhal, E. Seto, Emerging Roles of Histone Modifications and HDACs in RNA Splicing, *Nucleic Acids Research*. 47 (2019) 4911-4926. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz292>.
- [242] A.R. Kornblihtt, I.E. Schor, M. Alló, G. Dujardin, E. Petrillo, M.J. Muñoz, Alternative Splicing: A Pivotal Step between Eukaryotic Transcription and Translation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14 (2013) 153-165. <https://doi.org/10.1038/nrm3525>.
- [243] M.J. Muñoz, M.S.P. Santangelo, M.P. Paronetto, M. de la Mata, F. Pelisch, S. Boireau, K. Glover-Cutter, C. Ben-Dov, M. Blaustein, J.J. Lozano, G. Bird, D. Bentley, E. Bertrand, A.R. Kornblihtt, DNA Damage Regulates Alternative Splicing through Inhibition of RNA Polymerase II Elongation, *Cell*. 137 (2009) 708-720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.010>.

- [244] Q. Liu, L. Fang, C. Wu, Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases, *Genes*. 13 (2022) 401. <https://doi.org/10.3390/genes13030401>.
- [245] L. Wan, M. Deng, H. Zhang, SR Splicing Factors Promote Cancer via Multiple Regulatory Mechanisms, *Genes*. 13 (2022) 1659. <https://doi.org/10.3390/genes13091659>.
- [246] S. Chen, C. Yang, Z.-W. Wang, J.-F. Hu, J.-J. Pan, C.-Y. Liao, J.-Q. Zhang, J.-Z. Chen, Y. Huang, L. Huang, Q. Zhan, Y.-F. Tian, B.-Y. Shen, Y.-D. Wang, CLK1/SRSF5 Pathway Induces Aberrant Exon Skipping of METTL14 and Cyclin L2 and Promotes Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer, *Journal of Hematology & Oncology*. 14 (2021) 60. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01072-8>.
- [247] D.C. Glatz, D. Rujescu, Y. Tang, F.J. Berendt, A.M. Hartmann, F. Faltraco, C. Rosenberg, C. Hulette, K. Jellinger, H. Hampel, P. Riederer, H.-J. Möller, A. Andreadis, K. Henkel, S. Stamm, The Alternative Splicing of Tau Exon 10 and Its Regulatory Proteins CLK2 and TRA2-BETA1 Changes in Sporadic Alzheimer's Disease, *Journal of Neurochemistry*. 96 (2006) 635-644. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03552.x>.
- [248] H.K. Kim, M.H.C. Pham, K.S. Ko, B.D. Rhee, J. Han, Alternative Splicing Isoforms in Health and Disease, *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 470 (2018) 995-1016. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2136-x>.
- [249] H. Chung, E. Creger, L. Sitts, K. Chiu, C.-C. Mak, S. KC, B. Tam, G. Bucci, J. Stewart, T. Phalen, S. Cha, SM09419, a Novel, Small-Molecule CDC-like Kinase (CLK) Inhibitor, Demonstrates Strong Inhibition of the Wnt Signaling Pathway and Antitumor Effects in Tumor Protein P53 (TP53)-Mutant Acute Myeloid Leukemia Models, *Blood*. 134 (2019) 3913. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-131209>.
- [250] K.-C. Liao, M.A. Garcia-Blanco, Role of Alternative Splicing in Regulating Host Response to Viral Infection, *Cells*. 10 (2021) 1720. <https://doi.org/10.3390/cells10071720>.
- [251] S. Boudreault, P. Roy, G. Lemay, M. Bisailon, Viral Modulation of Cellular RNA Alternative Splicing: A New Key Player in Virus-Host Interactions?, *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*. 10 (2019) e1543. <https://doi.org/10.1002/wrna.1543>.
- [252] N. Nguyen Quang, S. Goudey, E. Ségéral, A. Mohammad, S. Lemoine, C. Blugeon, M. Versapuech, J.-C. Paillart, C. Berlioz-Torrent, S. Emiliani, S. Gallois-Montbrun, Dynamic Nanopore Long-Read Sequencing Analysis of HIV-1 Splicing Events during the Early Steps of Infection, *Retrovirology*. 17 (2020) 25. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00533-1>.
- [253] H. Kalam, M.F. Fontana, D. Kumar, Alternate Splicing of Transcripts Shape Macrophage Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection, *PLoS Pathogens*. 13 (2017) e1006236. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006236>.
- [254] Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics, *Nature reviews. Genetics*. 10 (2009) 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.
- [255] T.A. Clark, C.W. Sugnet, J. Manuel Ares, Genomewide Analysis of mRNA Processing in Yeast Using Splicing-Specific Microarrays, *Science*. 296 (2002). <https://doi.org/DOI: 10.1126/science.1069415>.
- [256] M. Harbers, P. Carninci, Tag-Based Approaches for Transcriptome Research and Genome Annotation, *Nature Methods*. 2 (2005) 495-502. <https://doi.org/10.1038/nmeth768>.
- [257] R. Stark, M. Grzelak, J. Hadfield, RNA Sequencing: The Teenage Years, *Nature Reviews Genetics*. 20 (2019) 631-656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>.
- [258] H. Zhang, L. He, L. Cai, Transcriptome Sequencing: RNA-Seq, *Computational Systems Biology*. 1754 (2018) 15-27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7717-8_2.
- [259] D. Sims, I. Sudbery, N.E. Illott, A. Heger, C.P. Ponting, Sequencing Depth and Coverage: Key Considerations in Genomic Analyses, *Nature Reviews Genetics*. 15 (2014) 121-132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>.
- [260] E.T. Wang, R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth, C.B. Burge, Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes, *Nature*. 456 (2008) 470-476. <https://doi.org/10.1038/nature07509>.
- [261] A.S. Mikheyev, M.M.Y. Tin, A First Look at the Oxford Nanopore MinION Sequencer, *Molecular Ecology Resources*. 14 (2014) 1097-1102. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12324>.

- [262] X. Zhang, C.-G. Liu, S.-H. Yang, X. Wang, F.-W. Bai, Z. Wang, Benchmarking of Long-Read Sequencing, Assemblers and Polishers for Yeast Genome, *Briefings in Bioinformatics*. 23 (2022) bbac146. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac146>.
- [263] T. Wongsurawat, P. Jenjaroenpun, I. Nookaew, Direct Sequencing of RNA and RNA Modification Identification Using Nanopore, *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2477 (2022) 71-77. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2257-5_5.
- [264] Z.-D. Zhong, Y.-Y. Xie, H.-X. Chen, Y.-L. Lan, X.-H. Liu, J.-Y. Ji, F. Wu, L. Jin, J. Chen, D.W. Mak, Z. Zhang, G.-Z. Luo, Systematic Comparison of Tools Used for m6A Mapping from Nanopore Direct RNA Sequencing, *Nature Communications*. 14 (2023) 1906. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37596-5>.
- [265] G. Baruzzo, K.E. Hayer, E.J. Kim, B. Di Camillo, G.A. FitzGerald, G.R. Grant, Simulation-Based Comprehensive Benchmarking of RNA-seq Aligners, *Nature methods*. 14 (2017) 135-139. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4106>.
- [266] J.H. Hong, Y.H. Ko, K. Kang, RNA Variant Identification Discrepancy among Splice-Aware Alignment Algorithms, *PLoS ONE*. 13 (2018) e0201822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201822>.
- [267] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: Ultrafast Universal RNA-seq Aligner, *Bioinformatics*. 29 (2013) 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- [268] H. Li, Minimap2: Pairwise Alignment for Nucleotide Sequences, *Bioinformatics*. 34 (2018) 3094-3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>.
- [269] A. Mehmood, A. Laiho, M.S. Venäläinen, A.J. McGlinchey, N. Wang, L.L. Elo, Systematic Evaluation of Differential Splicing Tools for RNA-seq Studies, *Briefings in Bioinformatics*. 21 (2019) 2052-2065. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz126>.
- [270] S. Anders, A. Reyes, W. Huber, Detecting Differential Usage of Exons from RNA-seq Data, *Genome Research*. 22 (2012) 2008-2017. <https://doi.org/10.1101/gr.133744.111>.
- [271] M.E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, G.K. Smyth, Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-sequencing and Microarray Studies, *Nucleic Acids Research*. 43 (2015) e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- [272] M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth, edgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data, *Bioinformatics*. 26 (2010) 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- [273] G.P. Alamancos, A. Pagès, J.L. Trincado, N. Bellora, E. Eyra, Leveraging Transcript Quantification for Fast Computation of Alternative Splicing Profiles, *RNA*. 21 (2015) 1521-1531. <https://doi.org/10.1261/rna.051557.115>.
- [274] J. Vaquero-Garcia, A. Barrera, M.R. Gazzara, J. González-Vallinas, N.F. Lahens, J.B. Hogenesch, K.W. Lynch, Y. Barash, A New View of Transcriptome Complexity and Regulation through the Lens of Local Splicing Variations, *eLife*. 5 (2016) e11752. <https://doi.org/10.7554/eLife.11752>.
- [275] C.J. Green, M.R. Gazzara, Y. Barash, MAJIQ-SPEL: Web-Tool to Interrogate Classical and Complex Splicing Variations from RNA-Seq Data, *Bioinformatics*. 34 (2018) 300-302. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx565>.
- [276] S.L. Amarasinghe, M.E. Ritchie, Q. Gouil, Long-Read-Tools.Org: An Interactive Catalogue of Analysis Methods for Long-Read Sequencing Data, *GigaScience*. 10 (2021) giab003. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab003>.
- [277] Y. Chen, A. Sim, Y.K. Wan, K. Yeo, J.J.X. Lee, M.H. Ling, M.I. Love, J. Göke, Context-Aware Transcript Quantification from Long Read RNA-Seq Data with Bambu, (2022) 2022.11.14.516358. <https://doi.org/10.1101/2022.11.14.516358>.
- [278] K. Vitting-Seerup, A. Sandelin, IsoformSwitchAnalyzeR: Analysis of Changes in Genome-Wide Patterns of Alternative Splicing and Its Functional Consequences, *Bioinformatics*. 35 (2019) 4469-4471. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz247>.

- [279] R. Liu, A.E. Loraine, J.A. Dickerson, Comparisons of Computational Methods for Differential Alternative Splicing Detection Using RNA-seq in Plant Systems, *BMC Bioinformatics*. 15 (2014) 364. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0364-4>.
- [280] D. Leshkowitz, M. Kedmi, Y. Fried, D. Pilzer, H. Keren-Shaul, E. Ainbinder, B. Dassa, Exploring Differential Exon Usage via Short- and Long-Read RNA Sequencing Strategies, *Open Biology*. 12 (s. d.) 220206. <https://doi.org/10.1098/rsob.220206>.
- [281] D.J. Wright, N.A.L. Hall, N. Irish, A.L. Man, W. Glynn, A. Mould, A.D.L. Angeles, E. Angiolini, D. Swarbreck, K. Gharbi, E.M. Tunbridge, W. Haerty, Long Read Sequencing Reveals Novel Isoforms and Insights into Splicing Regulation during Cell State Changes, *BMC Genomics*. 23 (2022) 42. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08261-2>.
- [282] M.N. Chowdhury, H. Jin, The RGG Motif Proteins: Interactions, Functions, and Regulations, *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*. 14 (2023) e1748. <https://doi.org/10.1002/wrna.1748>.
- [283] M.A. Lischwe, R.G. Cook, Y.S. Ahn, L.C. Yeoman, H. Busch, Clustering of Glycine and NG,NG-dimethylarginine in Nucleolar Protein C23, *Biochemistry*. 24 (1985) 6025-6028. <https://doi.org/10.1021/bi00343a001>.
- [284] M. Kiledjian, G. Dreyfuss, Primary Structure and Binding Activity of the hnRNP U Protein: Binding RNA through RGG Box., *The EMBO Journal*. 11 (1992) 2655-2664. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05331.x>.
- [285] C.L. Borders, J.A. Broadwater, P.A. Bekeny, J.E. Salmon, A.S. Lee, A.M. Eldridge, V.B. Pett, A Structural Role for Arginine in Proteins: Multiple Hydrogen Bonds to Backbone Carbonyl Oxygens: Structural Arginine in Proteins, *Protein Science*. 3 (1994) 541-548. <https://doi.org/10.1002/pro.5560030402>.
- [286] B.X. Yan, Y.Q. Sun, Glycine Residues Provide Flexibility for Enzyme Active Sites*, *Journal of Biological Chemistry*. 272 (1997) 3190-3194. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3190>.
- [287] P. Thandapani, T.R. O'Connor, T.L. Bailey, S. Richard, Defining the RGG/RG Motif, *Molecular Cell*. 50 (2013) 613-623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.021>.
- [288] B. Bourgeois, S. Hutten, B. Gottschalk, M. Hofweber, G. Richter, J. Sternat, C. Abou-Ajram, C. Göbl, G. Leitinger, W.F. Graier, D. Dormann, T. Madl, Nonclassical Nuclear Localization Signals Mediate Nuclear Import of CIRBP, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2020). <https://doi.org/10.1073/pnas.1918944117>.
- [289] F. De Leeuw, T. Zhang, C. Wauquier, G. Huez, V. Kruys, C. Gueydan, The Cold-Inducible RNA-binding Protein Migrates from the Nucleus to Cytoplasmic Stress Granules by a Methylation-Dependent Mechanism and Acts as a Translational Repressor, *Experimental Cell Research*. 313 (2007) 4130-4144. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.09.017>.
- [290] J. Tao, A.D. Frankel, Electrostatic Interactions Modulate the RNA-binding and Transactivation Specificities of the Human Immunodeficiency Virus and Simian Immunodeficiency Virus Tat Proteins., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90 (1993) 1571-1575.
- [291] J. Tao, A.D. Frankel, Specific Binding of Arginine to TAR RNA., *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (1992) 2723-2726. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2723>.
- [292] M.J. Churcher, C. Lamont, F. Hamy, C. Dingwall, S.M. Green, A.D. Lowe, P.J.G. Butler, M.J. Gait, J. Karn, High Affinity Binding of TAR RNA by the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Tat Protein Requires Base-pairs in the RNA Stem and Amino Acid Residues Flanking the Basic Region, *Journal of Molecular Biology*. 230 (1993) 90-110. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1128>.
- [293] W.-C. Tsai, S. Gayatri, L.C. Reineke, G. Sbardella, M.T. Bedford, R.E. Lloyd, Arginine Demethylation of G3BP1 Promotes Stress Granule Assembly, *The Journal of Biological Chemistry*. 291 (2016) 22671-22685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739573>.
- [294] P. Yang, C. Mathieu, R.M. Kolaitis, P. Zhang, J. Messing, U. Yurtsever, Z. Yang, J. Wu, Y. Li, Q. Pan, J. Yu, E.W. Martin, T. Mittag, H.J. Kim, J.P. Taylor, G3BP1 Is a Tunable Switch That Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules, *Cell*. 181 (2020) 325-345.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.046>.

- [295] M. Hofweber, S. Hutten, B. Bourgeois, E. Spreitzer, A. Niedner-Boblenz, M. Schifferer, M.-D. Ruepp, M. Simons, D. Niessing, T. Madl, D. Dormann, Phase Separation of FUS Is Suppressed by Its Nuclear Import Receptor and Arginine Methylation, *Cell*. 173 (2018) 706-719.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.004>.
- [296] C. Huang, Y. Chen, H. Dai, H. Zhang, M. Xie, H. Zhang, F. Chen, X. Kang, X. Bai, Z. Chen, UBAP2L Arginine Methylation by PRMT1 Modulates Stress Granule Assembly, Cell Death and Differentiation. 27 (2020) 227-241. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0350-5>.
- [297] W.-H. YANG, J.H. YU, T. GULICK, K.D. BLOCH, D.B. BLOCH, RNA-associated Protein 55 (RAP55) Localizes to mRNA Processing Bodies and Stress Granules, *RNA*. 12 (2006) 547-554. <https://doi.org/10.1261/rna.2302706>.
- [298] P.A. Chong, R.M. Vernon, J.D. Forman-Kay, RGG/RG Motif Regions in RNA Binding and Phase Separation, *Journal of Molecular Biology*. 430 (2018) 4650-4665. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.014>.
- [299] F.-M. Boisvert, U. Déry, J.-Y. Masson, S. Richard, Arginine Methylation of MRE11 by PRMT1 Is Required for DNA Damage Checkpoint Control, *Genes & Development*. 19 (2005) 671-676. <https://doi.org/10.1101/gad.1279805>.
- [300] Z. Yu, G. Vogel, Y. Coulombe, D. Dubeau, E. Spehalski, J. Hébert, D.O. Ferguson, J.Y. Masson, S. Richard, The MRE11 GAR Motif Regulates DNA Double-Strand Break Processing and ATR Activation, *Cell Research*. 22 (2012) 305-320. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.128>.
- [301] S.E. Polo, A.N. Blackford, J.R. Chapman, L. Baskcomb, S. Gravel, A. Rusch, A. Thomas, R. Blundred, P. Smith, J. Kzhyshkowska, T. Dobner, A.M.R. Taylor, A.S. Turnell, G.S. Stewart, R.J. Grand, S.P. Jackson, Regulation of DNA-End Resection by hnRNP-like Proteins Promotes DNA Double-Strand Break Signaling and Repair, *Molecular Cell*. 45 (2012) 505-516. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.035>.
- [302] F.-M. Boisvert, A. Rhie, S. Richard, A.J. Doherty, The GAR Motif of 53BP1 Is Arginine Methylated by PRMT1 and Is Necessary for 53BP1 DNA Binding Activity, (s. d.). <https://doi.org/10.4161/cc.4.12.2250>.
- [303] J. Friedemann, F. Grosse, S. Zhang, Nuclear DNA Helicase II (RNA Helicase A) Interacts with Werner Syndrome Helicase and Stimulates Its Exonuclease Activity, *Journal of Biological Chemistry*. 280 (2005) 31303-31313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503882200>.
- [304] M.S. Erard, P. Belenguer, M. Caizergues-Ferrer, A. Pantaloni, F. Amalric, A Major Nucleolar Protein, Nucleolin, Induces Chromatin Decondensation by Binding to Histone H1, *European Journal of Biochemistry*. 175 (1988) 525-530. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14224.x>.
- [305] E.-C. Cho, N.B. La Thangue, Arginine Methylation Controls Growth Regulation by E2F-1, *The EMBO Journal*. 31 (2012) 1785-1797. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.17>.
- [306] J. Jean-Philippe, S. Paz, M.L. Lu, M. Caputi, A Truncated hnRNP A1 Isoform, Lacking the RGG-box RNA Binding Domain, Can Efficiently Regulate HIV-1 Splicing and Replication, *Biochimica et biophysica acta*. 1839 (2014) 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.002>.
- [307] T. de Vries, W. Martelly, S. Campagne, K. Sabath, C.P. Sarnowski, J. Wong, A. Leitner, S. Jonas, S. Sharma, F.H.-T. Allain, Sequence-Specific RNA Recognition by an RGG Motif Connects U1 and U2 snRNP for Spliceosome Assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 119 (2022) e2114092119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2114092119>.
- [308] Q. Yan, P. Zeng, X. Zhou, X. Zhao, R. Chen, J. Qiao, L. Feng, Z. Zhu, G. Zhang, C. Chen, RBMX Suppresses Tumorigenicity and Progression of Bladder Cancer by Interacting with the hnRNP A1 Protein to Regulate PKM Alternative Splicing, *Oncogene*. 40 (2021) 2635-2650. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01666-z>.
- [309] Y.J. Lee, Q. Wang, D.C. Rio, Coordinate Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing Events by the Human RNA Chaperone Proteins hnRNPA1 and DDX5, *Genes & Development*. 32 (2018) 1060-1074. <https://doi.org/10.1101/gad.316034.118>.
- [310] K.I. Zhou, H. Shi, R. Lyu, A.C. Wylder, Ż. Matuszek, J.N. Pan, C. He, M. Parisien, T. Pan, Regulation of Co-Transcriptional Pre-mRNA Splicing by m6A through the Low-Complexity Protein hnRNPG, *Molecular cell*. 76 (2019) 70-81.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.005>.
- [311] J.C. Darnell, S.J. Van Driesche, C. Zhang, K.Y.S. Hung, A. Mele, C.E. Fraser, E.F. Stone, C. Chen, J.J. Fak, S.W. Chi, D.D. Licatalosi, J.D. Richter, R.B. Darnell, FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism, *Cell*. 146 (2011) 247-261. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013>.

- [312] I. Napoli, V. Mercaldo, P.P. Boyl, B. Eleuteri, F. Zalfa, S. De Rubeis, D. Di Marino, E. Mohr, M. Massimi, M. Falconi, W. Witke, M. Costa-Mattioli, N. Sonenberg, T. Achsel, C. Bagni, The Fragile X Syndrome Protein Represses Activity-Dependent Translation through CYFIP1, a New 4E-BP, *Cell*. 134 (2008) 1042-1054. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.031>.
- [313] R. Yang, D.J. Weber, F. Carrier, Post-Transcriptional Regulation of Thioredoxin by the Stress Inducible Heterogenous Ribonucleoprotein A18, *Nucleic Acids Research*. 34 (2006) 1224-1236. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj519>.
- [314] P. Rajyaguru, R. Parker, RGG Motif Proteins, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 11 (2012) 10.4161/cc.20716. <https://doi.org/10.4161/cc.20716>.
- [315] J. Zhang, G. Tsaprailis, G.T. Bowden, Nucleolin Stabilizes Bcl-XL Messenger RNA in Response to UVA Irradiation, *Cancer Research*. 68 (2008) 1046-1054. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1927>.
- [316] D. Ishimaru, L. Zuraw, S. Ramalingam, T.K. Sengupta, S. Bandyopadhyay, A. Reuben, D.J. Fernandes, E.K. Spicer, Mechanism of Regulation of Bcl-2 mRNA by Nucleolin and A+U-rich Element-binding Factor 1 (AUF1), *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 27182-27191. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098830>.
- [317] Y. Boulila, S. Tomavo, M. Gissot, A RGG Motif Protein Is Involved in Toxoplasma Gondii Stress-Mediated Response, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 196 (2014) 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.009>.
- [318] N.S. Gokhale, A.B.R. McIntyre, M.D. Mattocks, C.L. Holley, H.M. Lazear, C.E. Mason, S.M. Horner, Altered m6A Modification of Specific Cellular Transcripts Affects Flaviviridae Infection, *Molecular Cell*. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.007>.
- [319] J. Najbauer, B.A. Johnson, A.L. Young, D.W. Aswad, Peptides with Sequences Similar to Glycine, Arginine-Rich Motifs in Proteins Interacting with RNA Are Efficiently Recognized by Methyltransferase(s) Modifying Arginine in Numerous Proteins, *Journal of Biological Chemistry*. 268 (1993) 10501-10509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82227-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82227-X).
- [320] E. Blackwell, X. Zhang, S. Ceman, Arginines of the RGG Box Regulate FMRP Association with Polyribosomes and mRNA, *Human Molecular Genetics*. 19 (2010) 1314-1323. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq007>.
- [321] J. Wesche, S. Kühn, B.M. Kessler, M. Salton, A. Wolf, Protein Arginine Methylation: A Prominent Modification and Its Demethylation, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74 (2017) 3305-3315. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2515-z>.
- [322] M. Corre, A. Lebreton, Regulation of Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRBP) in Response to Cellular Stresses, *Biochimie*. (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.04.003>.
- [323] K. Tripsianes, T. Madl, M. Machyna, D. Fessas, C. Englbrecht, U. Fischer, K.M. Neugebauer, M. Sattler, Structural Basis for Dimethylarginine Recognition by the Tudor Domains of Human SMN and SPF30 Proteins, *Nature Structural & Molecular Biology*. 18 (2011) 1414-1420. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2185>.
- [324] A.Y. Tan, J.L. Manley, Tls/Fus, *Cell Cycle*. 11 (2012) 3349-3350. <https://doi.org/10.4161/cc.21875>.
- [325] E. Blackwell, S. Ceman, A New Regulatory Function of the Region Proximal to the RGG Box in the Fragile X Mental Retardation Protein, *Journal of Cell Science*. 124 (2011) 3060-3065. <https://doi.org/10.1242/jcs.086751>.
- [326] Y. Liu, J. Xing, Y. Li, Q. Luo, Z. Su, X. Zhang, H. Zhang, Chronic Hypoxia-Induced Cirbp Hypermethylation Attenuates Hypothermic Cardioprotection via down-Regulation of Ubiquinone Biosynthesis, *Science Translational Medicine*. 11 (2019) eaat8406. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat8406>.
- [327] Y. Sumitomo, H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, Y. Liu, T. Fujita, T. Sakurai, M.M. Candeias, K. Itoh, T. Chiba, J. Fujita, Identification of a Novel Enhancer That Binds Sp1 and Contributes to Induction of Cold-Inducible RNA-binding Protein (Cirp) Expression in Mammalian Cells., *BMC Biotechnology*. 12 (2012) 72. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-72>.

- [328] C. Shang, Y. Li, Z. Wu, Q. Han, Y. Zhu, T. He, H. Guo, The Prognostic Value of DNA Methylation, Post-Translational Modifications and Correlated with Immune Infiltrates in Gynecologic Cancers, *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 14 (2021) 39-53. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S293399>.
- [329] R. Yang, M. Zhan, N.R. Nalabothula, Q. Yang, F.E. Indig, F. Carrier, Functional Significance for a Heterogenous Ribonucleoprotein A18 Signature RNA Motif in the 3'-Untranslated Region of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related (ATR) Transcript, *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 8887-8893. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013128>.
- [330] L.-P. Mao, Y. Jiao, J.-H. Xiang, X.-W. Luo, Q. He, D.-H. Ran, Q. Xu, C.-H. Lang, L.-X. Chen, Cold-Inducible RNA-binding Protein Migrates from the Nucleus to the Cytoplasm under Cold Stress in Normal Human Bronchial Epithelial Cells via TRPM8-mediated Mechanism., *Annals of Translational Medicine*. 9 (2021) 1470. <https://doi.org/10.21037/atm-21-4447>.
- [331] Y. Juan, W. Haiqiao, W. Xie, H. Huaping, H. Zhong, Z. Xiangdong, V.P. Kolosov, J.M. Perelman, Cold-Inducible RNA-binding Protein Mediates Airway Inflammation and Mucus Hypersecretion through a Post-Transcriptional Regulatory Mechanism under Cold Stress, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 78 (2016) 335-348. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.029>.
- [332] X. Guo, Y. Wu, R.S. Hartley, Cold-Inducible RNA-binding Protein Contributes to Human Antigen R and Cyclin E1 Deregulation in Breast Cancer., *Molecular Carcinogenesis*. 49 (2010) 130-140. <https://doi.org/10.1002/mc.20582>.
- [333] J.-K. Chen, W.-L. Lin, Z. Chen, H. Liu, PARP-1-Dependent Recruitment of Cold-Inducible RNA-binding Protein Promotes Double-Strand Break Repair and Genome Stability, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115 (2018) E1759-E1768. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713912115>.
- [334] Q. Zhou, S. Usluer, F. Zhang, A.J. Lenard, B.M.R. Bourgeois, T. Madl, ATP Regulates RNA-driven Cold Inducible RNA Binding Protein Phase Separation., *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 30 (2021) 1438-1453. <https://doi.org/10.1002/pro.4123>.
- [335] H. Nishiyama, K. Itoh, Y. Kaneko, M. Kishishita, O. Yoshida, J. Fujita, A Glycine-rich RNA-binding Protein Mediating Cold-inducible Suppression of Mammalian Cell Growth, *The Journal of Cell Biology*. 137 (1997) 899-908. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.899>.
- [336] M. Roilo, M.K. Kullmann, L. Hengst, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) Induces Translation of the Cell-Cycle Inhibitor p27Kip1, *Nucleic Acids Research*. 46 (2018) 3198-3210. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1317>.
- [337] J.K. Hong, Y.-G. Kim, S.K. Yoon, G.M. Lee, Down-Regulation of Cold-Inducible RNA-binding Protein Does Not Improve Hypothermic Growth of Chinese Hamster Ovary Cells Producing Erythropoietin., *Metabolic Engineering*. 9 (2007) 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.11.003>.
- [338] L.A. Sonna, M.M. Kuhlmeier, H.C. Carter, J.D. Hasday, C.M. Lilly, K.D. Fairchild, Effect of Moderate Hypothermia on Gene Expression by THP-1 Cells: A DNA Microarray Study., *Physiological Genomics*. 26 (2006) 91-98. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00296.2005>.
- [339] A. Liu, Z. Zhang, A. Li, J. Xue, Effects of Hypothermia and Cerebral Ischemia on Cold-Inducible RNA-binding Protein mRNA Expression in Rat Brain., *Brain Research*. 1347 (2010) 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.029>.
- [340] G. Tong, S. Endersfelder, L.-M. Rosenthal, S. Wollersheim, I.M. Sauer, C. Bühner, F. Berger, K.R.L. Schmitt, Effects of Moderate and Deep Hypothermia on RNA-binding Proteins RBM3 and CIRP Expressions in Murine Hippocampal Brain Slices., *Brain Research*. 1504 (2013) 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.041>.
- [341] T.C. Jackson, M.D. Manole, S.E. Kotermanski, E.K. Jackson, R.S.B. Clark, P.M. Kochanek, Cold Stress Protein RBM3 Responds to Temperature Change in an Ultra-Sensitive Manner in Young Neurons., *Neuroscience*. 305 (2015) 268-278. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.012>.
- [342] K. Saito, N. Fukuda, T. Matsumoto, Y. Iribe, A. Tsunemi, T. Kazama, C. Yoshida-Noro, N. Hayashi, Moderate Low Temperature Preserves the Stemness of Neural Stem Cells and Suppresses Apoptosis of the Cells via Activation of the Cold-Inducible RNA Binding Protein., *Brain Research*. 1358 (2010) 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.048>.

- [343] Z. Lu, S. Xu, ERK1/2 MAP Kinases in Cell Survival and Apoptosis, *IUBMB Life*. 58 (2006) 621-631. <https://doi.org/10.1080/15216540600957438>.
- [344] R.M. Lucas, L. Luo, J.L. Stow, ERK1/2 in Immune Signalling, *Biochemical Society Transactions*. 50 (2022) 1341-1352. <https://doi.org/10.1042/BST20220271>.
- [345] T. Sakurai, K. Itoh, H. Higashitsuji, K. Nonoguchi, Y. Liu, H. Watanabe, T. Nakano, M. Fukumoto, T. Chiba, J. Fujita, Cirp Protects against Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Apoptosis via Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase, *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1763 (2006) 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.02.007>.
- [346] T. Sakurai, M. Kudo, T. Watanabe, K. Itoh, H. Higashitsuji, T. Arizumi, T. Inoue, S. Hagiwara, K. Ueshima, N. Nishida, M. Fukumoto, J. Fujita, Hypothermia Protects against Fulminant Hepatitis in Mice by Reducing Reactive Oxygen Species Production., *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*. 31 (2013) 440-446. <https://doi.org/10.1159/000355242>.
- [347] G. Wang, J.-N. Zhang, J.-K. Guo, Y. Cai, H.-S. Sun, K. Dong, C.-G. Wu, Neuroprotective Effects of Cold-Inducible RNA-binding Protein during Mild Hypothermia on Traumatic Brain Injury., *Neural Regeneration Research*. 11 (2016) 771-778. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182704>.
- [348] L. Chen, D. Ran, W. Xie, Q. Xu, X. Zhou, Cold-Inducible RNA-binding Protein Mediates Cold Air Inducible Airway Mucin Production through TLR4/NF- κ B Signaling Pathway, *International Immunopharmacology*. 39 (2016) 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.07.007>.
- [349] D. Ran, L. Chen, W. Xie, Q. Xu, Z. Han, H. Huang, X. Zhou, Cold-Inducible RNA Binding Protein Regulates Mucin Expression Induced by Cold Temperatures in Human Airway Epithelial Cells., *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 603 (2016) 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.05.009>.
- [350] X. Zhang, N. Tang, T.J. Hadden, A.K. Rishi, Akt, FoxO and Regulation of Apoptosis, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1813 (2011) 1978-1986. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>.
- [351] Y. Liu, P. Liu, Y. Hu, Y. Cao, J. Lu, Y. Yang, H. Lv, S. Lian, B. Xu, S. Li, Cold-Induced RNA-Binding Protein Promotes Glucose Metabolism and Reduces Apoptosis by Increasing AKT Phosphorylation in Mouse Skeletal Muscle Under Acute Cold Exposure., *Frontiers in Molecular Biosciences*. 8 (2021) 685993. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685993>.
- [352] Y. Zhang, Y. Wu, P. Mao, F. Li, X. Han, Y. Zhang, S. Jiang, Y. Chen, J. Huang, D. Liu, Y. Zhao, W. Ma, Z. Songyang, Cold-Inducible RNA-binding Protein CIRP/hnRNP A18 Regulates Telomerase Activity in a Temperature-Dependent Manner, *Nucleic Acids Research*. 44 (2016) 761-775. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1465>.
- [353] H. Nishiyama, S. Danno, Y. Kaneko, K. Itoh, H. Yokoi, M. Fukumoto, H. Okuno, J.L. Millán, T. Matsuda, O. Yoshida, J. Fujita, Decreased Expression of Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) in Male Germ Cells at Elevated Temperature., *The American Journal of Pathology*. 152 (1998) 289-296.
- [354] S.-H. Wang, C.-Y. Cheng, P.-C. Tang, C.-F. Chen, H.-H. Chen, Y.-P. Lee, S.-Y. Huang, Acute Heat Stress Induces Differential Gene Expressions in the Testes of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens., *PLoS One*. 10 (2015) e0125816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125816>.
- [355] A. Beemelmanns, F.S. Zanuzzo, X. Xue, R.M. Sandrelli, M.L. Rise, A.K. Gamperl, The Transcriptomic Responses of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) to High Temperature Stress Alone, and in Combination with Moderate Hypoxia., *BMC Genomics*. 22 (2021) 261. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07464-x>.
- [356] G. Cheng, D. Ke, M. Rao, S. Hu, Y. Wang, F. Zhou, H. Liu, C. Zhu, W. Xia, Effects of Cold-Inducible RNA-binding Protein on the Proliferation and Apoptosis of Spermatogenic Cells in Vitro Following Heat Stress., *Reproduction, Fertility, and Development*. 31 (2019) 953-961. <https://doi.org/10.1071/RD18469>.
- [357] H. Liu, C. Xu, M. Bao, J. Huang, L. Zou, X. Fan, C. Zhu, W. Xia, Cold-inducible RNA-binding Protein Regulates Cyclin B1 against Spermatogenesis Arrest Caused by Heat Stress, *Andrology*. 10 (2022) 392-403. <https://doi.org/10.1111/andr.13115>.

- [358] C. Xu, D. Ke, L. Zou, N. Li, Y. Wang, X. Fan, C. Zhu, W. Xia, Cold-Induced RNA-binding Protein (CIRBP) Regulates the Expression of Src-associated during Mitosis of 68 kDa (Sam68) and Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) during Heat Stress-Induced Testicular Injury., *Reproduction, Fertility, and Development*. 32 (2020) 1357-1364. <https://doi.org/10.1071/RD20253>.
- [359] A.J. Fornace, I. Alamo, M.C. Hollander, DNA Damage-Inducible Transcripts in Mammalian Cells., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85 (1988) 8800-8804.
- [360] Y. Liao, J. Feng, Y. Zhang, L. Tang, S. Wu, The Mechanism of CIRP in Inhibition of Keratinocytes Growth Arrest and Apoptosis Following Low Dose UVB Radiation., *Molecular Carcinogenesis*. 56 (2017) 1554-1569. <https://doi.org/10.1002/mc.22597>.
- [361] W. Sun, Y. Liao, Q. Yi, S. Wu, L. Tang, L. Tong, The Mechanism of CIRP in Regulation of STAT3 Phosphorylation and Bag-1/S Expression Upon UVB Radiation., *Photochemistry and Photobiology*. 94 (2018) 1234-1239. <https://doi.org/10.1111/php.12981>.
- [362] C. Yang, F. Carrier, The UV-inducible RNA-binding Protein A18 (A18 hnRNP) Plays a Protective Role in the Genotoxic Stress Response., *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 47277-47284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105396200>.
- [363] X. Xiao, W. Zhang, D. Hua, L. Zhang, W. Meng, J. Huang, L. Zhang, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRBP) Promotes Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)-Induced Inflammatory Response., *International Immunopharmacology*. 86 (2020) 106728. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106728>.
- [364] M. Zhou, M. Aziz, H.-T. Yen, G. Ma, A. Murao, P. Wang, Extracellular CIRP Dysregulates Macrophage Bacterial Phagocytosis in Sepsis, *Cellular and Molecular Immunology*. 20 (2023) 80-93. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00961-3>.
- [365] K.-W. Zhou, K. Jiang, W. Zhu, G. Weng, Expression of Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) in Renal Cell Carcinoma and the Effect of CIRP Downregulation Cell Proliferation and Chemosensitivity to Gemcitabine., *Oncology Letters*. 15 (2018) 7611-7616. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8338>.
- [366] Y. Zhang, R.A. Weinberg, Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer: Complexity and Opportunities, *Frontiers of Medicine*. 12 (2018) 361-373. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0656-6>.
- [367] H.N. Lee, S.-M. Ahn, H.H. Jang, Cold-Inducible RNA-binding Protein Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating ERK and P38 Pathways, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 477 (2016) 1038-1044. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.028>.
- [368] M. Wang, H. Zhang, X. Heng, Q. Pang, A. Sun, Expression of Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) in Pituitary Adenoma and Its Relationships with Tumor Recurrence., *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 21 (2015) 1256-1260. <https://doi.org/10.12659/MSM.893128>.
- [369] F. Jian, Y. Chen, G. Ning, W. Fu, H. Tang, X. Chen, Y. Zhao, L. Zheng, S. Pan, W. Wang, L. Bian, Q. Sun, Cold Inducible RNA Binding Protein Upregulation in Pituitary Corticotroph Adenoma Induces Corticotroph Cell Proliferation via Erk Signaling Pathway., *Oncotarget*. 7 (2016) 9175-9187. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7037>.
- [370] Y.-X. Liu, J.-N. Zhou, K.-H. Liu, X.-P. Fu, Z.-W. Zhang, Q.-H. Zhang, W. Yue, CIRP Regulates BEV-induced Cell Migration in Gliomas., *Cancer Management and Research*. 11 (2019) 2015-2025. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S191249>.
- [371] P. Chongsathidkiet, P.E. Fecci, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRBP) as a Biomarker to Predict Recurrence of Brain Metastases., *Neuro-Oncology*. 23 (2021) 1419-1420. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab122>.
- [372] M. Dankner, M. Caron, T. Al-Saadi, W. Yu, V. Ouellet, R. Ezzeddine, S.M. Maritan, M.G. Annis, P.U. Le, J. Nadaf, N.S. Neubarth, P. Savage, D. Zuo, C.P. Couturier, J. Monlong, H. Djambazian, H. Altoukhi, G. Bourque, J. Ragoussis, R.J. Diaz, M. Park, M.-C. Guiot, S. Lam, K. Petrecca, P.M. Siegel, Invasive Growth Associated with Cold-Inducible RNA-binding Protein Expression Drives Recurrence of Surgically Resected Brain Metastases., *Neuro-Oncology*. 23 (2021) 1470-1480. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab002>.

- [373] A. Indacochea, S. Guerrero, M. Ureña, F. Araujo, O. Coll, M.E. LLeonart, F. Gebauer, Cold-Inducible RNA Binding Protein Promotes Breast Cancer Cell Malignancy by Regulating Cystatin C Levels, *RNA*. 27 (2021) 190-201. <https://doi.org/10.1261/rna.076422.120>.
- [374] R. Huang, J. Guo, P. Yan, S. Zhai, P. Hu, X. Zhu, J. Zhang, Y. Qiao, Y. Zhang, H. Liu, L. Huang, J. Zhang, D. Yang, Z. Huang, The Construction of Bone Metastasis-Specific Prognostic Model and Co-expressed Network of Alternative Splicing in Breast Cancer., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8 (2020) 790. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00790>.
- [375] A. Mangé, J. Lacombe, C. Bascoul-Mollevi, M. Jarlier, P.-J. Lamy, P. Rouanet, T. Maudelonde, J. Solassol, Serum Autoantibody Signature of Ductal Carcinoma in Situ Progression to Invasive Breast Cancer., *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 18 (2012) 1992-2000. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2527>.
- [376] H.H. Jang, H.N. Lee, S.-Y. Kim, S. Hong, W.-S. Lee, Expression of RNA-binding Motif Protein 3 (RBM3) and Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRP) Is Associated with Improved Clinical Outcome in Patients with Colon Cancer., *Anticancer Research*. 37 (2017) 1779-1785. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11511>.
- [377] W.H. Ren, L.M. Zhang, H.Q. Liu, L. Gao, C. Chen, C. Qiang, X.L. Wang, C.Y. Liu, S.M. Li, C. Huang, H. Qi, K.Q. Zhi, Protein Overexpression of CIRP and TLR4 in Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical and Clinical Correlation Analysis., *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. 31 (2014) 120. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0120-7>.
- [378] T. Sakurai, H. Kashida, T. Watanabe, S. Hagiwara, T. Mizushima, H. Iijima, N. Nishida, H. Higashitsuji, J. Fujita, M. Kudo, Stress Response Protein Cirp Links Inflammation and Tumorigenesis in Colitis-Associated Cancer., *Cancer Research*. 74 (2014) 6119-6128. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0471>.
- [379] T. Sakurai, N. Yada, T. Watanabe, T. Arizumi, S. Hagiwara, K. Ueshima, N. Nishida, J. Fujita, M. Kudo, Cold-Inducible RNA-binding Protein Promotes the Development of Liver Cancer, *Cancer Science*. 106 (2015) 352-358. <https://doi.org/10.1111/cas.12611>.
- [380] C. Guo, Y. Tang, Q. Li, Z. Yang, Y. Guo, C. Chen, Y. Zhang, Deciphering the Immune Heterogeneity Dominated by Natural Killer Cells with Prognostic and Therapeutic Implications in Hepatocellular Carcinoma, *Computers in Biology and Medicine*. 158 (2023) 106872. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2023.106872>.
- [381] X. Chen, H. Xie, X. Wang, Z. Zheng, S. Jin, CIRBP Knockdown Attenuates Tumourigenesis and Improves the Chemosensitivity of Pancreatic Cancer via the Downregulation of DYRK1B., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9 (2021) 667551. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667551>.
- [382] Y. Wang, Y. Zhao, T. Ye, L. Yang, Y. Shen, H. Li, Ferroptosis Signaling and Regulators in Atherosclerosis, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9 (2021) 809457. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.809457>.
- [383] H. Gao, R. Xie, R. Huang, C. Wang, Y. Wang, D. Wang, K. Liu, C. Yang, Q. Yang, L. Chen, CIRBP Regulates Pancreatic Cancer Cell Ferroptosis and Growth by Directly Binding to P53., *Journal of Immunology Research*. 2022 (2022) 2527210. <https://doi.org/10.1155/2022/2527210>.
- [384] S. Wu, Z. Li, H. Li, K. Liao, Dihydroartemisinin Reduces Irradiation-Induced Mitophagy and Radioresistance in Lung Cancer A549 Cells via CIRBP Inhibition., *Life (Basel, Switzerland)*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/life12081129>.
- [385] R. He, S. Zuo, A Robust 8-Gene Prognostic Signature for Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer., *Frontiers in Oncology*. 9 (2019) 693. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00693>.
- [386] Y. Liao, J. Feng, W. Sun, C. Wu, J. Li, T. Jing, Y. Liang, Y. Qian, W. Liu, H. Wang, CIRP Promotes the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer through Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling via CTNNB1., *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. 40 (2021) 275. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02080-9>.
- [387] T.-Y. Lin, Y. Chen, J.-S. Jia, C. Zhou, M. Lian, Y.-T. Wen, X.-Y. Li, H.-W. Chen, X.-L. Lin, X.-L. Zhang, S.-J. Xiao, Y. Sun, D. Xiao, Loss of Cirbp Expression Is Correlated with the Malignant Progression and Poor Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma, *Cancer Management and Research*. 11 (2019) 6959-6969. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S211389>.
- [388] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, The Role of Hypoxia in Cancer Progression, Angiogenesis, Metastasis, and Resistance to Therapy, *Hypoxia*. 3 (2015) 83-92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.

- [389] E.T. Chang, P.R. Parekh, Q. Yang, D.M. Nguyen, F. Carrier, Heterogenous Ribonucleoprotein A18 (hnRNP A18) Promotes Tumor Growth by Increasing Protein Translation of Selected Transcripts in Cancer Cells, *Oncotarget*. 7 (2016) 10578-10593. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7020>.
- [390] M. Lu, Q. Ge, G. Wang, Y. Luo, X. Wang, W. Jiang, X. Liu, C.-L. Wu, Y. Xiao, X. Wang, CIRBP Is a Novel Oncogene in Human Bladder Cancer Inducing Expression of HIF-1 α , *Cell Death & Disease*. 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1109-5>.
- [391] W. Sun, A.P. Bergmeier, Y. Liao, S. Wu, L. Tong, CIRP Sensitizes Cancer Cell Responses to Ionizing Radiation., *Radiation Research*. 195 (2021) 93-100. <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00063.1>.
- [392] A.A. Hamid, M. Mandai, J. Fujita, K. Nanbu, M. Kariya, T. Kusakari, K. Fukuhara, S. Fujii, Expression of Cold-Inducible RNA-binding Protein in the Normal Endometrium, Endometrial Hyperplasia, and Endometrial Carcinoma., *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 22 (2003) 240-247. <https://doi.org/10.1097/01.PGP.0000070851.25718.EC>.
- [393] S. Yuan, X. Sun, L. Wang, Prognostic Values From Integrated Analysis of the Nomogram Based on RNA-Binding Proteins and Clinical Factors in Endometrial Cancer., *Clinical Medicine Insights. Oncology*. 16 (2022) 11795549221123620. <https://doi.org/10.1177/11795549221123620>.
- [394] P. Zhou, C. Wu, C. Ma, T. Luo, J. Yuan, P. Zhou, Z. Wei, P. Zhou, C. Wu, C. Ma, T. Luo, J. Yuan, P. Zhou, Z. Wei, Identification of an Endoplasmic Reticulum Stress-Related Gene Signature to Predict Prognosis and Potential Drugs of Uterine Corpus Endometrial Cancer, *Mathematical Biosciences and Engineering*. 20 (2023) 4018-4039. <https://doi.org/10.3934/mbe.2023188>.
- [395] Y. Zeng, P. Kulkarni, T. Inoue, R.H. Getzenberg, Down-Regulating Cold Shock Protein Genes Impairs Cancer Cell Survival and Enhances Chemosensitivity., *Journal of Cellular Biochemistry*. 107 (2009) 179-188. <https://doi.org/10.1002/jcb.22114>.
- [396] G.-P. Liu, Y. Zhang, X.-Q. Yao, C.-E. Zhang, J. Fang, Q. Wang, J.-Z. Wang, Activation of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibits Protein Phosphatase-2A and the Underlying Mechanisms, *Neurobiology of Aging*. 29 (2008) 1348-1358. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.012>.
- [397] W.H. Stoothoff, G.V.W. Johnson, Tau Phosphorylation: Physiological and Pathological Consequences, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1739 (2005) 280-297. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.017>.
- [398] F. Su, S. Yang, H. Wang, Z. Qiao, H. Zhao, Z. Qu, CIRBP Ameliorates Neuronal Amyloid Toxicity via Antioxidative and Antiapoptotic Pathways in Primary Cortical Neurons., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020 (2020) 2786139. <https://doi.org/10.1155/2020/2786139>.
- [399] L. Ge, P. Huang, H. Miao, H. Yu, D. Wu, F. Chen, Y. Lin, Y. Lin, W. Li, J. Hua, The New Landscape of Differentially Expression Proteins in Placenta Tissues of Gestational Diabetes Based on iTRAQ Proteomics, *Placenta*. 131 (2023) 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.11.012>.
- [400] L. Sun, R. Wang, G. Hu, H. Liu, K. Lv, Y. Duan, N. Shen, J. Wu, J. Hu, Y. Liu, Q. Jin, F. Zhang, X. Xu, Single Cell RNA Sequencing (scRNA-Seq) Deciphering Pathological Alterations in Streptozotocin-Induced Diabetic Retinas., *Experimental Eye Research*. 210 (2021) 108718. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108718>.
- [401] Y. Li, X. Wu, S. Miao, Q. Cao, MiR-383-5p Promotes Apoptosis of Ovarian Granulosa Cells by Targeting CIRP through the PI3K/AKT Signaling Pathway., *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 306 (2022) 501-512. <https://doi.org/10.1007/s00404-022-06461-z>.
- [402] H. Bazid, M. Shoeib, A. Elsayed, M. Mostafa, M. Shoeib, E.M.A. El Gayed, R. Abdallah, Expression of Cold-Inducible RNA Binding Protein in Psoriasis., *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 43 (2022) 384-402. <https://doi.org/10.1080/15321819.2022.2039183>.
- [403] Y. Fujita, T. Yago, T. Asano, H. Matsumoto, N. Matsuoka, J. Temmoku, S. Sato, M. Yashiro-Furuya, E. Suzuki, H. Watanabe, A. Kawakami, K. Migita, Clinical Relevance for Circulating Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) in Patients with Adult-Onset Still's Disease., *PloS One*. 16 (2021) e0255493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255493>.
- [404] J. Liu, X. Ke, L. Wang, Y. Zhang, J. Yang, Deficiency of Cold-Inducible RNA-binding Protein Exacerbated Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Hypertension through Caveolin1 and CAVIN1., *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 25 (2021) 4732-4743. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16437>.

- [405] S. Chettimada, J. Yang, H. Moon, Y. Jin, Caveolae, Caveolin-1 and Cavin-1: Emerging Roles in Pulmonary Hypertension, *World journal of respirology*. 5 (2015) 126-134. <https://doi.org/10.5320/wjr.v5.i2.126>.
- [406] M. Chen, H. Fu, J. Zhang, H. Huang, P. Zhong, CIRP Downregulation Renders Cardiac Cells Prone to Apoptosis in Heart Failure., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 517 (2019) 545-550. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.012>.
- [407] J. Li, D. Xie, J. Huang, F. Lv, D. Shi, Y. Liu, L. Lin, L. Geng, Y. Wu, D. Liang, Y.-H. Chen, Cold-Inducible RNA-Binding Protein Regulates Cardiac Repolarization by Targeting Transient Outward Potassium Channels., *Circulation Research*. 116 (2015) 1655-1659. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306287>.
- [408] D. Xie, L. Geng, S. Wang, K. Xiong, T. Zhao, G. Wang, Z. Feng, F. Lv, C. Wang, D. Liang, D. Shi, X. Ma, Y. Liu, J. Yang, C. Zhang, Y.-H. Chen, Cold-Inducible RNA-binding Protein Modulates Atrial Fibrillation Onset by Targeting Multiple Ion Channels., *Heart Rhythm*. 17 (2020) 998-1008. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2019.12.021>.
- [409] X. Chen, J. Jiang, X. Wu, J. Li, S. Li, Plasma Cold-Inducible RNA-Binding Protein Predicts Lung Dysfunction After Cardiovascular Surgery Following Cardiopulmonary Bypass: A Prospective Observational Study., *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 25 (2019) 3288-3297. <https://doi.org/10.12659/MSM.914318>.
- [410] L. Wang, R.-F. Li, X.-L. Guan, S.-S. Liang, P. Gong, The Value of Extracellular Cold-Inducible RNA-Binding Protein (eCIRP) in Predicting the Severity and Prognosis of Patients After Cardiac Arrest: A Preliminary Observational Study., *Shock (Augusta, Ga.)*. 56 (2021) 229-236. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001702>.
- [411] G. Li, L. Yang, H. Yuan, Y. Liu, Y. He, X. Wu, X. Jin, Cold-Inducible RNA-binding Protein Plays a Central Role in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm in a Murine Experimental Model., *Surgery*. 159 (2016) 1654-1667. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.01.007>.
- [412] K. Roe, An Inflammation Classification System Using Cytokine Parameters, *Scandinavian Journal of Immunology*. 93 (2021) e12970. <https://doi.org/10.1111/sji.12970>.
- [413] M. Aziz, M. Brenner, P. Wang, Extracellular CIRP (eCIRP) and Inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*. 106 (2019) 133-146. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1118-443R>.
- [414] X. Qiang, W.-L. Yang, R. Wu, M. Zhou, A. Jacob, W. Dong, M. Kuncewitch, Y. Ji, H. Yang, H. Wang, J. Fujita, J. Nicastro, G.F. Coppa, K.J. Tracey, P. Wang, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) Triggers Inflammatory Responses in Hemorrhagic Shock and Sepsis, *Nature Medicine*. 19 (2013) 1489-1495. <https://doi.org/10.1038/nm.3368>.
- [415] K. Chen, J. Cagliani, M. Aziz, C. Tan, M. Brenner, P. Wang, Extracellular CIRP Activates STING to Exacerbate Hemorrhagic Shock., *JCI Insight*. 6 (2021). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143715>.
- [416] C. Brochu, M.A. Cabrita, B.D. Melanson, J.D. Hamill, R. Lau, M.A.C. Pratt, B.C. McKay, NF- κ B-Dependent Role for Cold-Inducible RNA Binding Protein in Regulating Interleukin 1 β , *PLoS ONE*. 8 (2013) e57426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057426>.
- [417] H. Jin, M. Aziz, Y. Ode, P. Wang, CIRP Induces Neutrophil Reverse Transendothelial Migration in Sepsis, *Shock (Augusta, Ga.)*. 51 (2019) 548-556. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001257>.
- [418] H.R. Thiam, S.L. Wong, D.D. Wagner, C.M. Waterman, Cellular Mechanisms of NETosis, *Annual review of cell and developmental biology*. 36 (2020) 191-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>.
- [419] K. Murata, A. Murao, M. Aziz, P. Wang, Extracellular CIRP Induces Novel Nectin-2+ (CD112+) Neutrophils to Promote Th1 Differentiation in Sepsis, *The Journal of Immunology*. 210 (2023) 310-321. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200308>.
- [420] W.-L. Yang, A. Sharma, Z. Wang, Z. Li, J. Fan, P. Wang, Cold-Inducible RNA-binding Protein Causes Endothelial Dysfunction via Activation of Nlrp3 Inflammasome, *Scientific Reports*. 6 (2016) 26571. <https://doi.org/10.1038/srep26571>.

- [421] Z. Li, E.K. Fan, J. Liu, M.J. Scott, Y. Li, S. Li, W. Xie, T.R. Billiar, M.A. Wilson, Y. Jiang, P. Wang, J. Fan, Cold-Inducible RNA-binding Protein through TLR4 Signaling Induces Mitochondrial DNA Fragmentation and Regulates Macrophage Cell Death after Trauma, *Cell Death & Disease*. 8 (2017) e2775. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.187>.
- [422] Y. Lee, B. Reilly, C. Tan, P. Wang, M. Aziz, Extracellular CIRP Induces Macrophage Extracellular Trap Formation Via Gasdermin D Activation, *Frontiers in Immunology*. 12 (2021) 780210. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.780210>.
- [423] M.M. Khan, W.-L. Yang, M. Brenner, A.C. Bolognese, P. Wang, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) Causes Sepsis-Associated Acute Lung Injury via Induction of Endoplasmic Reticulum Stress, *Scientific Reports*. 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep41363>.
- [424] Y. Xu, Y. Tian, Y. Wang, J. Yang, F. Li, X. Wan, M. Ouyang, Human Antigen R (HuR) and Cold Inducible RNA-binding Protein (CIRP) Influence Intestinal Mucosal Barrier Function in Ulcerative Colitis by Competitive Regulation on Claudin1., *BioFactors (Oxford, England)*. 47 (2021) 427-443. <https://doi.org/10.1002/biof.1719>.
- [425] Q. He, H. Gao, Y.-L. Chang, X. Wu, R. Lin, G. Li, J. Lin, H. Lu, H. Chen, Z. Li, Y. Cong, J. Yao, Z. Liu, ETS-1 Facilitates Th1 Cell-Mediated Mucosal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases through Upregulating CIRBP., *Journal of Autoimmunity*. 132 (2022) 102872. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102872>.
- [426] L. Lai, G. Wang, L. Xu, Y. Fu, CEBPB Promotes Gastrointestinal Motility Dysfunction after Severe Acute Pancreatitis via the MALAT1/CIRBP/ERK Axis, *Molecular Immunology*. 156 (2023) 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.02.001>.
- [427] L.-L. Shi, J. Ma, Y.-K. Deng, C.-L. Chen, H. Wang, P.-P. Cao, X.-B. Long, M. Zeng, Z. Liu, Cold-Inducible RNA-binding Protein Contributes to Tissue Remodeling in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps., *Allergy*. 76 (2021) 497-509. <https://doi.org/10.1111/all.14287>.
- [428] H. Higashitsuji, T. Fujita, H. Higashitsuji, J. Fujita, Mammalian Cold-Inducible RNA-binding Protein Facilitates Wound Healing through Activation of AMP-activated Protein Kinase., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 533 (2020) 1191-1197. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.004>.
- [429] J.P. Idrovo, A. Jacob, W.L. Yang, Z. Wang, H.T. Yen, J. Nicastro, G.F. Coppa, P. Wang, A Deficiency in Cold-Inducible RNA-binding Protein Accelerates the Inflammation Phase and Improves Wound Healing., *International Journal of Molecular Medicine*. 37 (2016) 423-428. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2451>.
- [430] H.K. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and Reperfusion—from Mechanism to Translation, *Nature medicine*. 17 (2011) 10.1038/nm.2507. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>.
- [431] P. Dong, Q. Li, H. Han, HIF-1 α in Cerebral Ischemia, *Molecular Medicine Reports*. 25 (2022) 41. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12557>.
- [432] X. Chen, X. Liu, B. Li, Q. Zhang, J. Wang, W. Zhang, W. Luo, J. Chen, Cold Inducible RNA Binding Protein Is Involved in Chronic Hypoxia Induced Neuron Apoptosis by Down-Regulating HIF-1 α Expression and Regulated By microRNA-23a, *International Journal of Biological Sciences*. 13 (2017) 518-531. <https://doi.org/10.7150/ijbs.17800>.
- [433] L. Chen, Q. Tian, W. Wang, Association between CIRP Expression and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats., *Experimental and Therapeutic Medicine*. 18 (2019) 1515-1520. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7767>.
- [434] Y. Liu, C. Xue, H. Lu, Y. Zhou, R. Guan, J. Wang, Q. Zhang, T. Ke, M. Aschner, W. Zhang, W. Luo, Hypoxia Causes Mitochondrial Dysfunction and Brain Memory Disorder in a Manner Mediated by the Reduction of Cirbp, *Science of The Total Environment*. 806 (2022) 151228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151228>.
- [435] Q. Zhang, Y.-Z. Wang, W. Zhang, X. Chen, J. Wang, J. Chen, W. Luo, Involvement of Cold Inducible RNA-Binding Protein in Severe Hypoxia-Induced Growth Arrest of Neural Stem Cells In Vitro., *Molecular Neurobiology*. 54 (2017) 2143-2153. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9761-1>.
- [436] Y. Zou, Z. Yuan, Y. Sun, M. Zhai, Z. Tan, R. Guan, M. Aschner, W. Luo, J. Zhang, Resetting Proteostasis of CIRBP with ISRIB Suppresses Neural Stem Cell Apoptosis under Hypoxic Exposure, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022 (2022) 1-20. <https://doi.org/10.1155/2022/3627026>.

- [437] T.Y. Long, R. Jing, F. Kuang, L. Huang, Z.X. Qian, T.L. Yang, CIRBP Protects H9C2 Cells against Myocardial Ischemia through Inhibition of NF- κ B Pathway., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*. 50 (2017) e5861. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20175861>.
- [438] M. Zhou, W.-L. Yang, Y. Ji, X. Qiang, P. Wang, Cold-Inducible RNA-binding Protein Mediates Neuroinflammation in Cerebral Ischemia., *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1840 (2014) 2253-2261. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.027>.
- [439] S.J. Wowro, G. Tong, J. Krech, N. Rolfs, F. Berger, K.R.L. Schmitt, Combined Cyclosporin A and Hypothermia Treatment Inhibits Activation of BV-2 Microglia but Induces an Inflammatory Response in an Ischemia/Reperfusion Hippocampal Slice Culture Model., *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 13 (2019) 273. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00273>.
- [440] M. Kobritz, T. Borjas, V. Patel, G. Coppa, M. Aziz, P. Wang, H151, A SMALL MOLECULE INHIBITOR OF STING AS A NOVEL THERAPEUTIC IN INTESTINAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY., *Shock (Augusta, Ga.)*. 58 (2022) 241-250. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001968>.
- [441] C. Cen, W.-L. Yang, H.-T. Yen, J.M. Nicastro, G.F. Coppa, P. Wang, Deficiency of Cold-Inducible Ribonucleic Acid-Binding Protein Reduces Renal Injury after Ischemia-Reperfusion., *Surgery*. 160 (2016) 473-483. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.04.014>.
- [442] C. Cen, J. McGinn, M. Aziz, W.-L. Yang, J. Cagliani, J.M. Nicastro, G.F. Coppa, P. Wang, Deficiency in Cold-Inducible RNA-binding Protein Attenuates Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion., *Surgery*. 162 (2017) 917-927. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.06.004>.
- [443] A. Godwin, W.-L. Yang, A. Sharma, A. Khader, Z. Wang, F. Zhang, J. Nicastro, G.F. Coppa, P. Wang, Blocking Cold-Inducible RNA-binding Protein Protects Liver from Ischemia-Reperfusion Injury., *Shock (Augusta, Ga.)*. 43 (2015) 24-30. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000251>.
- [444] W. Liu, Y. Fan, H. Ding, D. Han, Y. Yan, R. Wu, Y. Lv, X. Zheng, Normothermic Machine Perfusion Attenuates Hepatic Ischaemia-Reperfusion Injury by Inhibiting CIRP-mediated Oxidative Stress and Mitochondrial Fission., *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 25 (2021) 11310-11321. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17062>.
- [445] M. Sui, D. Xu, W. Zhao, H. Lu, R. Chen, Y. Duan, Y. Li, Y. Zhu, L. Zhang, L. Zeng, CIRBP Promotes Ferroptosis by Interacting with ELAVL1 and Activating Ferritinophagy during Renal Ischaemia-reperfusion Injury, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 25 (2021) 6203-6216. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16567>.
- [446] M. Kübler, S. Beck, L.L. Peffenköver, P. Götz, H. Ishikawa-Ankerhold, K.T. Preissner, S. Fischer, M. Lasch, E. Deindl, The Absence of Extracellular Cold-Inducible RNA-Binding Protein (eCIRP) Promotes Pro-Angiogenic Microenvironmental Conditions and Angiogenesis in Muscle Tissue Ischemia., *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22179484>.
- [447] E.A.C. Goossens, L. Zhang, M.R. de Vries, J.W. Jukema, P.H.A. Quax, A.Y. Nossent, Cold-Inducible RNA-Binding Protein but Not Its Antisense lncRNA Is a Direct Negative Regulator of Angiogenesis In Vitro and In Vivo via Regulation of the 14q32 angiomiRs—microRNA-329-3p and microRNA-495-3p, *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021) 12678. <https://doi.org/10.3390/ijms222312678>.
- [448] J.H. Xue, K. Nonoguchi, M. Fukumoto, T. Sato, H. Nishiyama, H. Higashitsuji, K. Itoh, J. Fujita, Effects of Ischemia and H₂O₂ on the Cold Stress Protein CIRP Expression in Rat Neuronal Cells., *Free Radical Biology & Medicine*. 27 (1999) 1238-1244. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00158-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00158-6).
- [449] J. Liu, C. Shen, M. Chen, J. Zhang, M. Chen, P. Zhong, Downregulation of CIRP Prone Cells to Oxidative Injury via Regulating Nrf2 Signaling Pathway., *BioMed Research International*. 2022 (2022) 2416787. <https://doi.org/10.1155/2022/2416787>.
- [450] B. Chazarin, A. Ziemianin, A.L. Evans, E. Meugnier, E. Loizon, I. Chery, J.M. Arnemo, J.E. Swenson, G. Gauquelin-Koch, C. Simon, S. Blanc, E. Lefai, F. Bertile, Limited Oxidative Stress Favors Resistance to Skeletal Muscle Atrophy in Hibernating Brown Bears (*Ursus Arctos*)., *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/antiox8090334>.

- [451] S. Li, Z. Zhang, J. Xue, A. Liu, H. Zhang, Cold-Inducible RNA Binding Protein Inhibits H₂O₂-Induced Apoptosis in Rat Cortical Neurons., *Brain Research*. 1441 (2012) 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.053>.
- [452] J. Liu, J. Xue, H. Zhang, S. Li, Y. Liu, D. Xu, M. Zou, Z. Zhang, J. Diao, Cloning, Expression, and Purification of Cold Inducible RNA-binding Protein and Its Neuroprotective Mechanism of Action., *Brain Research*. 1597 (2015) 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.061>.
- [453] T. Uochi, M. Asashima, XCIRP (Xenopus Homolog of Cold-Inducible RNA-binding Protein) Is Expressed Transiently in Developing Pronephros and Neural Tissue., *Gene*. 211 (1998) 245-250. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00102-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00102-4).
- [454] S. van Venrooy, D. Fichtner, M. Kunz, D. Wedlich, D. Gradl, Cold-Inducible RNA Binding Protein (CIRP), a Novel XTcf-3 Specific Target Gene Regulates Neural Development in Xenopus., *BMC Developmental Biology*. 8 (2008) 77. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-77>.
- [455] Y. Peng, K.H. Kok, R.H. Xu, K.H. Kwok, D. Tay, P.C. Fung, H.F. Kung, M.C. Lin, Maternal Cold Inducible RNA Binding Protein Is Required for Embryonic Kidney Formation in *Xenopus laevis*., *FEBS Letters*. 482 (2000) 37-43. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02019-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02019-6).
- [456] Y. Peng, P.-H. Yang, J.A. Tanner, J.-D. Huang, M. Li, H.F. Lee, R.-H. Xu, H.-F. Kung, M.C.M. Lin, Cold-Inducible RNA Binding Protein Is Required for the Expression of Adhesion Molecules and Embryonic Cell Movement in *Xenopus laevis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 344 (2006) 416-424. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.086>.
- [457] K.-W. Zhou, X.-M. Zheng, Z.-W. Yang, L. Zhang, H.-D. Chen, Overexpression of CIRP May Reduce Testicular Damage Induced by Cryptorchidism., *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*. 32 (2009) E103-111. <https://doi.org/10.25011/cim.v32i2.6027>.
- [458] Z.-P. Xia, X.-M. Zheng, H. Zheng, X.-J. Liu, G.-Y. Liu, X.-H. Wang, Downregulation of Cold-Inducible RNA-binding Protein Activates Mitogen-Activated Protein Kinases and Impairs Spermatogenic Function in Mouse Testes., *Asian Journal of Andrology*. 14 (2012) 884-889. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.71>.
- [459] Z. Xia, X. Zheng, H. Zheng, X. Liu, Z. Yang, X. Wang, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP) Regulates Target mRNA Stabilization in the Mouse Testis, *FEBS Letters*. 586 (2012) 3299-3308. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.004>.
- [460] T. Masuda, K. Itoh, H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, N. Nakazawa, T. Sakurai, Y. Liu, H. Tokuchi, T. Fujita, Y. Zhao, H. Nishiyama, T. Tanaka, M. Fukumoto, M. Ikawa, M. Okabe, J. Fujita, Cold-Inducible RNA-binding Protein (Cirp) Interacts with Dyrk1b/Mirk and Promotes Proliferation of Immature Male Germ Cells in Mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (2012) 10885-10890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121524109>.
- [461] D.A. Lujan, S. Garcia, J. Vanderhoof, J. Sifuentes, Y. Brandt, Y. Wu, X. Guo, T. Mitchell, T. Howard, H.J. Hathaway, R.S. Hartley, Cold-Inducible RNA Binding Protein in Mouse Mammary Gland Development., *Tissue & Cell*. 48 (2016) 577-587. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.10.004>.
- [462] J. Gardela, M. Ruiz-Conca, S. Olvera-Maneu, M. López-Béjar, M. Álvarez-Rodríguez, The mRNA Expression of the Three Major Described Cold-Inducible Proteins, Including CIRBP, Differs in the Bovine Endometrium and Ampulla during the Estrous Cycle., *Research in Veterinary Science*. 152 (2022) 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.08.006>.
- [463] A.H. Jamieson-Lucy, M. Kobayashi, Y. James Aykit, Y.M. Elkouby, M. Escobar-Aguirre, C.E. Vejnar, A.J. Giraldez, M.C. Mullins, A Proteomics Approach Identifies Novel Resident Zebrafish Balbiani Body Proteins Cirbpa and Cirbbp., *Developmental Biology*. 484 (2022) 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.01.006>.
- [464] S. Kohno, Y. Katsu, H. Urushitani, Y. Ohta, T. Iguchi, L.J.J. Guillette, Potential Contributions of Heat Shock Proteins to Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator., *Sexual Development : Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*. 4 (2010) 73-87. <https://doi.org/10.1159/000260374>.
- [465] D. Jiang, X.-L. Zhu, J.-F. Zhao, Y.-K. Zhou, C. Zhong, J. Zhang, X. Huang, Subtractive Screen of Potential Limb Regeneration Related Genes from *Pachytriton brevipes*., *Molecular Biology Reports*. 41 (2014) 1015-1026. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2946-z>.

- [466] D.M. Bryant, K. Johnson, T. DiTommaso, T. Tickle, M.B. Couger, D. Payzin-Dogru, T.J. Lee, N.D. Leigh, T.-H. Kuo, F.G. Davis, J. Bateman, S. Bryant, A.R. Guzikowski, S.L. Tsai, S. Coyne, W.W. Ye, R.M.J. Freeman, L. Peshkin, C.J. Tabin, A. Regev, B.J. Haas, J.L. White, A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors., *Cell Reports*. 18 (2017) 762-776. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063>.
- [467] B.M. Tezak, K. Guthrie, J. Wyneken, An Immunohistochemical Approach to Identify the Sex of Young Marine Turtles., *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*. 300 (2017) 1512-1518. <https://doi.org/10.1002/ar.23589>.
- [468] A.L. Schroeder, K.J. Metzger, A. Miller, T. Rhen, A Novel Candidate Gene for Temperature-Dependent Sex Determination in the Common Snapping Turtle., *Genetics*. 203 (2016) 557-571. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182840>.
- [469] S. Radhakrishnan, R. Literman, J. Neuwald, A. Severin, N. Valenzuela, Transcriptomic Responses to Environmental Temperature by Turtles with Temperature-Dependent and Genotypic Sex Determination Assessed by RNAseq Inform the Genetic Architecture of Embryonic Gonadal Development., *PLoS One*. 12 (2017) e0172044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172044>.
- [470] J. Chang, Y. Pan, W. Liu, Y. Xie, W. Hao, P. Xu, Y. Wang, Acute Temperature Adaptation Mechanisms in the Native Reptile Species *Eremias Argus*., *The Science of the Total Environment*. 818 (2022) 151773. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151773>.
- [471] J. Morf, G. Rey, K. Schneider, M. Stratmann, J. Fujita, F. Naef, U. Schibler, Cold-Inducible RNA-Binding Protein Modulates Circadian Gene Expression Posttranscriptionally, *Science*. 338 (2012) 379-383. <https://doi.org/10.1126/science.1217726>.
- [472] Y. Liu, W. Hu, Y. Murakawa, J. Yin, G. Wang, M. Landthaler, J. Yan, Cold-Induced RNA-binding Proteins Regulate Circadian Gene Expression by Controlling Alternative Polyadenylation, *Scientific Reports*. 3 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02054>.
- [473] R. Winsky-Sommerer, H.A. King, V. Iadevaia, C. Möller-Levet, A.P. Gerber, A Post-Transcriptional Regulatory Landscape of Aging in the Female Mouse Hippocampus, *Frontiers in Aging Neuroscience*. 15 (2023) 1119873. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1119873>.
- [474] A. Artero-Castro, F.B. Callejas, J. Castellvi, H. Kondoh, A. Carnero, P.J. Fernández-Marcos, M. Serrano, S. Ramón y Cajal, M.E. Lleónart, Cold-Inducible RNA-Binding Protein Bypasses Replicative Senescence in Primary Cells through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation, *Molecular and Cellular Biology*. 29 (2009) 1855-1868. <https://doi.org/10.1128/MCB.01386-08>.
- [475] H. Nishiyama, J.H. Xue, T. Sato, H. Fukuyama, N. Mizuno, T. Houtani, T. Sugimoto, J. Fujita, Diurnal Change of the Cold-Inducible RNA-binding Protein (Circp) Expression in Mouse Brain., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 245 (1998) 534-538. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8482>.
- [476] M.M. Hoekstra, Y. Emmenegger, J. Hubbard, P. Franken, Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRBP) Adjusts Clock-Genes Expression and REM-sleep Recovery Following Sleep Deprivation, *eLife*. 8 (s. d.). <https://doi.org/10.7554/eLife.43400>.
- [477] M. Bellesi, L. de Vivo, G. Tononi, C. Cirelli, Effects of Sleep and Wake on Astrocytes: Clues from Molecular and Ultrastructural Studies., *BMC Biology*. 13 (2015) 66. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0176-7>.
- [478] E. Barth, A. Srivastava, D. Wengerodt, M. Stojiljkovic, H. Axer, O.W. Witte, A. Kretz, M. Marz, Age-Dependent Expression Changes of Circadian System-Related Genes Reveal a Potentially Conserved Link to Aging., *Aging*. 13 (2021) 25694-25716. <https://doi.org/10.18632/aging.203788>.
- [479] P. Liu, R. Yao, H. Shi, Y. Liu, S. Lian, Y. Yang, H. Yang, S. Li, Effects of Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRP) on Liver Glycolysis during Acute Cold Exposure in C57BL/6 Mice, *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20061470>.
- [480] S. Lv, Y. Zhou, J. Chen, H. Yuan, Z.-N. Zhang, B. Luan, Hepatic ER Stress Suppresses Adipose Browning through ATF4-CIRP-ANGPTL3 Cascade., *Cell Reports*. 40 (2022) 111422. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111422>.

- [481] S. Robichaud, G. Fairman, V. Vijithakumar, E. Mak, D.P. Cook, A.R. Pelletier, S. Huard, B.C. Vanderhyden, D. Figeys, M. Lavallée-Adam, K. Baetz, M. Ouimet, Identification of Novel Lipid Droplet Factors That Regulate Lipophagy and Cholesterol Efflux in Macrophage Foam Cells., *Autophagy*. 17 (2021) 3671-3689. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1886839>.
- [482] H.N. Lee, S.-M. Ahn, H.H. Jang, Cold-Inducible RNA-binding Protein, CIRP, Inhibits DNA Damage-Induced Apoptosis by Regulating P53., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 464 (2015) 916-921. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.066>.
- [483] H.-T. Zhang, J.-H. Xue, Z.-W. Zhang, H.-B. Kong, A.-J. Liu, S.-C. Li, D.-G. Xu, Cold-Inducible RNA-binding Protein Inhibits Neuron Apoptosis through the Suppression of Mitochondrial Apoptosis, *Brain Research*. 1622 (2015) 474-483. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.004>.
- [484] L. Wu, H.-L. Sun, Y. Gao, K.-L. Hui, M.-M. Xu, H. Zhong, M.-L. Duan, Therapeutic Hypothermia Enhances Cold-Inducible RNA-Binding Protein Expression and Inhibits Mitochondrial Apoptosis in a Rat Model of Cardiac Arrest, *Molecular Neurobiology*. 54 (2017) 2697-2705. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9813-6>.
- [485] P. Zhang, L. Bai, Y. Tong, S. Guo, W. Lu, Y. Yuan, W. Wang, Y. Jin, P. Gao, J. Liu, CIRP Attenuates Acute Kidney Injury after Hypothermic Cardiovascular Surgery by Inhibiting PHD3/HIF-1 α -mediated ROS-TGF- β 1/P38 MAPK Activation and Mitochondrial Apoptotic Pathways, *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. 29 (2023) 61. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00655-0>.
- [486] A. Tarangelo, L. Magtanong, K.T. Bieging-Rolett, Y. Li, J. Ye, L.D. Attardi, S.J. Dixon, P53 Suppresses Metabolic Stress-Induced Ferroptosis in Cancer Cells, *Cell reports*. 22 (2018) 569-575. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.077>.
- [487] J. Shimizu, A. Murao, C. Nofi, P. Wang, M. Aziz, Extracellular CIRP Promotes GPX4-Mediated Ferroptosis in Sepsis., *Frontiers in Immunology*. 13 (2022) 903859. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.903859>.
- [488] Y. Ode, M. Aziz, H. Jin, A. Arif, J.G. Nicastro, P. Wang, Cold-Inducible RNA-binding Protein Induces Neutrophil Extracellular Traps in the Lungs during Sepsis., *Scientific Reports*. 9 (2019) 6252. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42762-1>.
- [489] J.-M. Shin, J.-W. Ko, I.S. Kwon, J.-W. Choi, D. Hong, J.-H. Lee, Y.-J. Seo, C.-D. Kim, J.-H. Lee, Y. Lee, K.-D. Park, Clinical Relevance for Serum Cold-Inducible RNA-Binding Protein Level in Alopecia Areata., *Annals of Dermatology*. 31 (2019) 387-392. <https://doi.org/10.5021/ad.2019.31.4.387>.
- [490] H. Hozumi, K. Kataoka, Y. Kondoh, T. Isayama, J. Okada, K. Sugiura, K. Mori, M. Kono, Y. Suzuki, M. Karayama, K. Furuhashi, N. Enomoto, T. Fujisawa, N. Inui, Y. Nakamura, T. Suda, Clinical Significance of Cold-Inducible RNA-Binding Protein in Idiopathic Pulmonary Fibrosis., *Chest*. 160 (2021) 2149-2157. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.06.067>.
- [491] N.H. Moftah, H. Alnos, L. Rashed, M. Hamdino, Evaluation of Serum and Tissue Levels of Cold-Inducible RNA-binding Protein in Non-Segmental Vitiligo, *Archives of Dermatological Research*. (2023). <https://doi.org/10.1007/s00403-023-02586-6>.
- [492] I. Omori, H. Sumida, A. Sugimori, M. Sakakibara, M. Urano-Takaoka, O. Iwasawa, H. Saito, A. Matsuno, S. Sato, Serum Cold-Inducible RNA-binding Protein Levels as a Potential Biomarker for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease, *Scientific Reports*. 13 (2023) 5017. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32231-1>.
- [493] M.-J. Prieto-Alamo, N. Abril, I. Osuna-Jiménez, C. Pueyo, Solea Senegalensis Genes Responding to Lipopolysaccharide and Copper Sulphate Challenges: Large-Scale Identification by Suppression Subtractive Hybridization and Absolute Quantification of Transcriptional Profiles by Real-Time RT-PCR., *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*. 91 (2009) 312-319. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.11.001>.
- [494] C. Tang, Q. Liu, Y. Zhang, G. Liu, G. Shen, Identification of CIRBP and TRPV4 as Immune-Related Diagnostic Biomarkers in Osteoarthritis., *International Journal of General Medicine*. 14 (2021) 10235-10245. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S342286>.
- [495] I.S. Yoo, S.Y. Lee, C.K. Park, J.C. Lee, Y. Kim, S.J. Yoo, S.C. Shim, Y.S. Choi, Y. Lee, S.W. Kang, Serum and Synovial Fluid Concentrations of Cold-Inducible RNA-binding Protein in Patients with Rheumatoid Arthritis., *International Journal of Rheumatic Diseases*. 21 (2018) 148-154. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12892>.

- [496] J.-D. Gong, X.-F. Qi, Y. Zhang, H.-L. Li, Increased Admission Serum Cold-Inducible RNA-binding Protein Concentration Is Associated with Prognosis of Severe Acute Pancreatitis., *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 471 (2017) 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.06.002>.
- [497] Y. Zhou, H. Dong, Y. Zhong, J. Huang, J. Lv, J. Li, The Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Level in Peripheral Blood Predicts Sepsis Outcome., *PloS One*. 10 (2015) e0137721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137721>.
- [498] X. Ren, H. Xie, J. Zhang, X. Jin, L. Cui, L. Chen, L. Chen, G. Zuo, Prognostic Value of Plasma Cold-Inducible RNA-Binding Protein in Patients with Acute Coronary Syndrome., *Disease Markers*. 2022 (2022) 6119601. <https://doi.org/10.1155/2022/6119601>.
- [499] Q. Guo, W. Song, H. Li, M. Li, X. Chen, H. Liu, H. Peng, H. Yu, N. Liu, Z. Lü, L. Liang, Q. Zhao, M. Jiang, Cold-Inducible RNA-binding Protein Might Determine the Severity and the Presences of Major/Minor Criteria for Severe Community-Acquired Pneumonia and Best Predicted Mortality, *Respiratory Research*. 21 (2020) 192. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01457-2>.
- [500] L. Silva, J. Egea, L. Villanueva, M. Ruiz, D. Llopiz, D. Repáraz, B. Aparicio, A. Lasarte-Cia, J.J. Lasarte, M. Ruiz de Galarreta, A. Lujambio, B. Sangro, P. Sarobe, Cold-Inducible RNA Binding Protein as a Vaccination Platform to Enhance Immunotherapeutic Responses Against Hepatocellular Carcinoma., *Cancers*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12113397>.
- [501] L. Villanueva, L. Silva, D. Llopiz, M. Ruiz, T. Iglesias, T. Lozano, N. Casares, S. Hervás-Stubbs, M.J. Rodríguez, J.L. Carrascosa, J.J. Lasarte, P. Sarobe, The Toll like Receptor 4 Ligand Cold-Inducible RNA-binding Protein as Vaccination Platform against Cancer., *Oncoimmunology*. 7 (2018) e1409321. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1409321>.
- [502] Y.-J. Sun, S. Ma, B. Fan, Y. Wang, S.-R. Wang, G.-Y. Li, Therapeutic Hypothermia Protects Photoreceptors through Activating Cirbp Pathway, *Neurochemistry International*. 126 (2019) 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.006>.
- [503] M. Rey-Funes, D.S. Contartese, R. Peláez, J. García-Sanmartín, J. Narro-Íñiguez, M. Soliño, J.C. Fernández, A. Sarotto, N.S. Ciranna, J.J. López-Costa, V.B. Dorfman, I.M. Larrayoz, C.F. Loidl, A. Martínez, Hypothermic Shock Applied After Perinatal Asphyxia Prevents Retinal Damage in Rats., *Frontiers in Pharmacology*. 12 (2021) 651599. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.651599>.
- [504] Z. Li, S. Zhang, J. Li, H. Zeng, Y. Wang, Y. Huang, Nerve Regeneration in Rat Peripheral Nerve Allografts: Evaluation of Cold-Inducible RNA-binding Protein in Nerve Storage and Regeneration., *The Journal of Comparative Neurology*. 527 (2019) 2885-2895. <https://doi.org/10.1002/cne.24716>.
- [505] M. Liu, Y. Li, S. Gao, S. Yan, Q. Zhang, G. Liu, B. Ji, A Novel Target to Reduce Microglial Inflammation and Neuronal Damage after Deep Hypothermic Circulatory Arrest., *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 159 (2020) 2431-2444.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.06.115>.
- [506] H. Dai, Y. Zhou, Y. Lu, X. Zhang, Z. Zhuang, Y. Gao, G. Liu, C. Chen, J. Ma, W. Li, C. Hang, Decreased Expression of CIRP Induced by Therapeutic Hypothermia Correlates with Reduced Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage., *Journal of Clinical Medicine*. 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/jcm11123411>.
- [507] K.H. Chau, B.A. Ziganshin, J.A. Eleftheriades, Deep Hypothermic Circulatory Arrest: Real-Life Suspended Animation, *Progress in Cardiovascular Diseases*. 56 (2013) 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2013.05.009>.
- [508] L. Yu, T. Gu, Y. Liu, X. Jiang, E. Shi, Cold-Inducible Ribonucleic Acid-Binding Protein Attenuates Acute Kidney Injuries after Deep Hypothermic Circulatory Arrest in Rats., *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. 26 (2018) 124-130. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivx262>.
- [509] Y. Li, M. Liu, S. Gao, L. Cai, Q. Zhang, S. Yan, G. Liu, B. Ji, Cold-Inducible RNA-binding Protein Maintains Intestinal Barrier during Deep Hypothermic Circulatory Arrest, *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. 29 (2019) 583-591. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivz147>.
- [510] C. Liu, X. Cheng, J. Xing, J. Li, Z. Li, D. Jian, Y. Wang, S. Wang, R. Li, W. Zhang, D. Shao, X. Ma, X. Chen, J. Shen, C. Shi, Z. Guo, W. Wang, T. Fan, L. Liu, H. Tang, CIRBP-OGFR Axis Safeguards against Cardiomyocyte Apoptosis and Cardiotoxicity Induced by Chemotherapy., *International Journal of Biological Sciences*. 18 (2022) 2882-2897. <https://doi.org/10.7150/ijbs.69655>.

- [511] W. Zuo, J. Zhao, J. Zhang, Z. Fang, J. Deng, Z. Fan, Y. Guo, J. Han, W. Hou, H. Dong, F. Xu, L. Xiong, MD2 Contributes to the Pathogenesis of Perioperative Neurocognitive Disorder via the Regulation of α 5GABA(A) Receptors in Aged Mice., *Journal of Neuroinflammation*. 18 (2021) 204. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02246-4>.
- [512] Z. Fang, D. Wu, J. Deng, Q. Yang, X. Zhang, J. Chen, S. Wang, S. Hu, W. Hou, S. Ning, Y. Ding, Z. Fan, Z. Jiang, J. Kang, Y. Liu, J. Miao, X. Ji, H. Dong, L. Xiong, An MD2-perturbing Peptide Has Therapeutic Effects in Rodent and Rhesus Monkey Models of Stroke., *Science Translational Medicine*. 13 (2021) eabb6716. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb6716>.
- [513] X. Qiang, J. Li, S. Zhu, M. He, W. Chen, Y. Al-Abed, M. Brenner, K.J. Tracey, P. Wang, H. Wang, Human Dermcidin Protects Mice Against Hepatic Ischemia-Reperfusion-Induced Local and Remote Inflammatory Injury., *Frontiers in Immunology*. 12 (2021) 821154. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.821154>.
- [514] Q. Xu, M. Wang, H. Guo, H. Liu, G. Zhang, C. Xu, H. Chen, Emodin Alleviates Severe Acute Pancreatitis-Associated Acute Lung Injury by Inhibiting the Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP)-Mediated Activation of the NLRP3/IL-1 β /CXCL1 Signaling, *Frontiers in Pharmacology*. 12 (2021) 655372. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.655372>.
- [515] F. Zhang, W.-L. Yang, M. Brenner, P. Wang, Attenuation of Hemorrhage-Associated Lung Injury by Adjuvant Treatment with C23, an Oligopeptide Derived from Cold-Inducible RNA-binding Protein., *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 83 (2017) 690-697. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001566>.
- [516] F. Zhang, M. Brenner, W.-L. Yang, P. Wang, A Cold-Inducible RNA-binding Protein (CIRP)-Derived Peptide Attenuates Inflammation and Organ Injury in Septic Mice., *Scientific Reports*. 8 (2018) 3052. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13139-z>.
- [517] J.T. McGinn, M. Aziz, F. Zhang, W.-L. Yang, J.M. Nicastro, G.F. Coppa, P. Wang, CIRP-derived Peptide C23 Attenuates Inflammation and Tissue Injury in a Murine Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion, *Surgery*. 164 (2018) 1191-1197. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.06.048>.
- [518] E. Solano-Gonzalez, K.M. Coburn, W. Yu, G.M. Wilson, E. Nurmemmedov, S. Kesari, E.T. Chang, A.D. MacKerell, D.J. Weber, F. Carrier, Small Molecules Inhibitors of the Heterogeneous Ribonuclear Protein A18 (hnRNP A18): A Regulator of Protein Translation and an Immune Checkpoint, *Nucleic Acids Research*. 49 (2021) 1235-1246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1254>.
- [519] Y. Zhang, J. Zhang, Y. Ren, T. Li, J. Bi, Z. Du, R. Wu, Luteolin Suppresses Sepsis-Induced Cold-Inducible RNA-Binding Protein Production and Lung Injury in Neonatal Mice, *Shock*. 55 (2021) 268-273. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001624>.
- [520] J. Zhang, C.J. Kuo, L. Chen, GC Content around Splice Sites Affects Splicing through Pre-mRNA Secondary Structures, *BMC Genomics*. 12 (2011) 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-90>.
- [521] M. Amit, M. Donyo, D. Hollander, A. Goren, E. Kim, S. Gelfman, G. Lev-Maor, D. Burstein, S. Schwartz, B. Postolsky, T. Pupko, G. Ast, Differential GC Content between Exons and Introns Establishes Distinct Strategies of Splice-Site Recognition, *Cell Reports*. 1 (2012) 543-556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.013>.
- [522] M.Q. Zhang, Statistical Features of Human Exons and Their Flanking Regions, *Human Molecular Genetics*. 7 (1998) 919-932. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.5.919>.
- [523] P. Glaser, P. Cossart, Comparative Genomics of *Listeria* Species, *Science*. 294 (2001) 849-852. <https://doi.org/https://doi-org.insb.bib.cnrs.fr/10.1126/science.1063447>.
- [524] T. Chakraborty, T. Hain, E. Domann, Genome Organization and the Evolution of the Virulence Gene Locus in *Listeria* Species, *International Journal of Medical Microbiology*. 290 (2000) 167-174. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80086-7](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80086-7).
- [525] X.-H. Lai, I. Arencibia, A. Johansson, S.N. Wai, J. Oscarsson, S. Kalfas, K.-G. Sundqvist, Y. Mizunoe, A. Sjöstedt, B.E. Uhlin, Cytocidal and Apoptotic Effects of the ClyA Protein from *Escherichia Coli* on Primary and Cultured Monocytes and Macrophages, *Infection and Immunity*. 68 (2000) 4363-4367.
- [526] R.R. Isberg, D.L. Voorhis, S. Falkow, Identification of Invasin: A Protein That Allows Enteric Bacteria to Penetrate Cultured Mammalian Cells, *Cell*. 50 (1987) 769-778. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90335-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90335-7).

- [527] T.J.P. Petit, A. Lebreton, Adaptations of Intracellular Bacteria to Vacuolar or Cytosolic Niches, *Trends in Microbiology*. 30 (2022) 736-748. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.015>.
- [528] F.J. del Castillo, F. Moreno, I. del Castillo, Characterization of the Genes Encoding the SheA Haemolysin in *Escherichia Coli* O157:H7 and *Shigella Flexneri* 2a, *Research in Microbiology*. 151 (2000) 229-230. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00143-1).
- [529] C. Von Rhein, S. Bauer, V. Simon, A. Ludwig, Occurrence and Characteristics of the Cytolysin A Gene in *Shigella* Strains and Other Members of the Family Enterobacteriaceae, *FEMS Microbiology Letters*. 287 (2008) 143-148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01290.x>.
- [530] C. von Rhein, S. Bauer, E.J. López Sanjurjo, R. Benz, W. Goebel, A. Ludwig, ClyA Cytolysin from *Salmonella*: Distribution within the Genus, Regulation of Expression by SlyA, and Pore-Forming Characteristics, *International Journal of Medical Microbiology*. 299 (2009) 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.004>.
- [531] E.M. Selleck, D. Van Tyne, M.S. Gilmore, Pathogenicity of Enterococci, *Microbiology spectrum*. 7 (2019) 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>.
- [532] D. Van Tyne, M.J. Martin, M.S. Gilmore, Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus Faecalis* Cytolysin, *Toxins*. 5 (2013) 895-911. <https://doi.org/10.3390/toxins5050895>.
- [533] X. Xiong, S. Tian, P. Yang, F. Lebreton, H. Bao, K. Sheng, L. Yin, P. Chen, J. Zhang, W. Qi, J. Ruan, H. Wu, H. Chen, D.T. Breault, H. Wu, A.M. Earl, M.S. Gilmore, J. Abraham, M. Dong, Emerging *Enterococcus* Pore-Forming Toxins with MHC/HLA-I as Receptors, *Cell*. 185 (2022) 1157-1171.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.002>.
- [534] N. Nunez, A. Derré-Bobillot, N. Trainel, G. Lakisic, A. Lecomte, F. Mercier-Nomé, A.-M. Cassard, H. Bierre, P. Serror, C. Archambaud, The Unforeseen Intracellular Lifestyle of *Enterococcus Faecalis* in Hepatocytes, *Gut Microbes*. 14 (s. d.) 2058851. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2058851>.
- [535] C. Vuong, M. Otto, *Staphylococcus Epidermidis* Infections, *Microbes and Infection*. 4 (2002) 481-489. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01563-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01563-0).
- [536] J.J. Boelens, J. Dankert, J.L. Murk, J.J. Weening, T. Van Der Poll, K.P. Dingemans, L. Koole, J.D. Laman, S.A.J. Zaai, Biomaterial-Associated Persistence of *Staphylococcus Epidermidis* in Pericatheter Macrophages, *The Journal of Infectious Diseases*. 181 (2000) 1337-1349. <https://doi.org/10.1086/315369>.
- [537] A.E. Goetz, M. Wilkinson, Stress and the Nonsense-Mediated RNA Decay Pathway, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 74 (2017) 3509-3531. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2537-6>.
- [538] J.T. Mendell, N.A. Sharifi, J.L. Meyers, F. Martinez-Murillo, H.C. Dietz, Nonsense Surveillance Regulates Expression of Diverse Classes of Mammalian Transcripts and Mutes Genomic Noise, *Nature Genetics*. 36 (2004) 1073-1078. <https://doi.org/10.1038/ng1429>.
- [539] S. Nasif, L. Contu, O. Mühlemann, Beyond Quality Control: The Role of Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) in Regulating Gene Expression, *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 75 (2018) 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.053>.
- [540] I.A. King, A. Tabiowo, Effect of Tunicamycin on Epidermal Glycoprotein and Glycosaminoglycan Synthesis in Vitro, *Biochemical Journal*. 198 (1981) 331-338.
- [541] Y. Sagara, G. Inesi, Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Transport ATPase by Thapsigargin at Subnanomolar Concentrations, *Journal of Biological Chemistry*. 266 (1991) 13503-13506. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92726-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92726-2).
- [542] V. Boehm, S. Kueckelmann, J.V. Gerbracht, T. Britto-Borges, J. Altmüller, C. Dieterich, N.H. Gehring, Nonsense-Mediated mRNA Decay Relies on « Two-Factor Authentication » by SMG5-SMG7, *bioRxiv*. (2020) 2020.07.07.191437. <https://doi.org/10.1101/2020.07.07.191437>.
- [543] L. Radoshevich, F. Impens, D. Ribet, J.J. Quereda, T. Nam Tham, M.-A. Nahori, H. Bierre, O. Dussurget, J. Pizarro-Cerdá, K.-P. Knobloch, P. Cossart, ISG15 Counteracts *Listeria Monocytogenes* Infection, *eLife*. 4 (s. d.). <https://doi.org/10.7554/eLife.06848>.
- [544] C.-L. Chen, S.S. Liu, S.-M. Ip, L.C. Wong, H.Y.S. Ngan, T.Y. Ng, E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Methylation in Cervical Cancer Cell Lines and Tumours, *European Journal of Cancer*. 39 (2003) 517-523. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00175-2).

- [545] H. Gou, Y. Liu, W. Shi, J. Nan, C. Wang, Y. Sun, Q. Cao, H. Wei, C. Song, C. Tian, Y. Wei, H. Xue, The Characteristics and Function of Internalin G in *Listeria Monocytogenes*, *Polish Journal of Microbiology*. 71 (2022) 63-71. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-009>.
- [546] C.T. Nguyen, T.T. Luong, S.-Y. Lee, G.-L. Kim, S. Pyo, D.-K. Rhee, ATF3 Provides Protection from *Staphylococcus Aureus* and *Listeria Monocytogenes* Infections, *FEMS Microbiology Letters*. 363 (2016) fnw062. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw062>.
- [547] G.B. Mackaness, THE INFLUENCE OF IMMUNOLOGICALLY COMMITTED LYMPHOID CELLS ON MACROPHAGE ACTIVITY IN VIVO, *Journal of Experimental Medicine*. 129 (1969) 973-992. <https://doi.org/10.1084/jem.129.5.973>.
- [548] H. Goldfine, S.J. Wadsworth, Macrophage Intracellular Signaling Induced by *Listeria Monocytogenes*, *Microbes and Infection*. 4 (2002) 1335-1343. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00011-4).
- [549] J.A. Vázquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, J. Kreft, *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (2001) 584-640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>.
- [550] P. Zhong, H. Huang, Recent Progress in the Research of Cold-Inducible RNA-binding Protein, *Future Science OA*. 3 (2017). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0077>.
- [551] A.E. Moor, M. Golan, E.E. Massasa, D. Lemze, T. Weizman, R. Shenhav, S. Baydatch, O. Mizrahi, R. Winkler, O. Golani, N. Stern-Ginossar, S. Itzkovitz, Global mRNA Polarization Regulates Translation Efficiency in the Intestinal Epithelium, *Science (New York, N.Y.)*. 357 (2017) 1299-1303. <https://doi.org/10.1126/science.aan2399>.
- [552] A.N. Gasparski, D.E. Mason, K. Moissoglu, S. Mili, Regulation and Outcomes of Localized RNA Translation, *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*. 13 (2022) e1721. <https://doi.org/10.1002/wrna.1721>.
- [553] D. Mateju, B. Eichenberger, F. Voigt, J. Eglinger, G. Roth, J.A. Chao, Single-Molecule Imaging Reveals Translation of mRNAs Localized to Stress Granules, *Cell*. 183 (2020) 1801-1812.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.010>.
- [554] C. McCormick, D.A. Khapersky, Translation Inhibition and Stress Granules in the Antiviral Immune Response, *Nature Reviews Immunology*. 17 (2017) 647-660. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.63>.
- [555] C. Mordstein, R. Savisaar, R.S. Young, J. Bazile, L. Talmane, J. Luft, M. Liss, M.S. Taylor, L.D. Hurst, G. Kudla, Codon Usage and Splicing Jointly Influence mRNA Localization, *Cell Systems*. 10 (2020) 351-362.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.03.001>.
- [556] Y. Ode, M. Aziz, P. Wang, CIRP Increases ICAM-1+ Phenotype of Neutrophils Exhibiting Elevated iNOS and NETs in Sepsis, *Journal of Leukocyte Biology*. 103 (2018) 693. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0817-327RR>.
- [557] B.G. Yipp, B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N.V. Scott, L.D. Zbytniuk, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. de Boisfleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, P. Kubes, Dynamic NETosis Is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram-Positive Infection, *Nature medicine*. 18 (2012) 1386-1393. <https://doi.org/10.1038/nm.2847>.
- [558] I. Jorgensen, E.A. Miao, Pyroptotic Cell Death Defends against Intracellular Pathogens, *Immunological reviews*. 265 (2015) 130-142. <https://doi.org/10.1111/imr.12287>.
- [559] H. Rottenberg, R. Covian, B.L. Trumpower, Membrane Potential Greatly Enhances Superoxide Generation by the Cytochrome Bc1 Complex Reconstituted into Phospholipid Vesicles, *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 19203-19210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017376>.
- [560] P. Li, G. Carter, J. Romero, K.M. Gower, J. Watson, N.A. Patel, D.R. Cooper, Clk/STY (Cdc2-Like Kinase 1) and Akt Regulate Alternative Splicing and Adipogenesis in 3T3-L1 Pre-Adipocytes, *PLoS ONE*. 8 (2013) e53268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053268>.
- [561] S. Chatterjee, E.A. Browning, N. Hong, K. DeBolt, E.M. Sorokina, W. Liu, M.J. Birnbaum, A.B. Fisher, Membrane Depolarization Is the Trigger for PI3K/Akt Activation and Leads to the Generation of ROS, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 302 (2012) H105-H114. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00298.2011>.

- [562] G. Gessain, Y.-H. Tsai, L. Travier, M. Bonazzi, S. Grayo, P. Cossart, C. Charlier, O. Disson, M. Lecuit, PI3-kinase Activation Is Critical for Host Barrier Permissiveness to *Listeria Monocytogenes*, *The Journal of Experimental Medicine*. 212 (2015) 165-183. <https://doi.org/10.1084/jem.20141406>.
- [563] M. Tachibana, M. Hashino, K. Watanabe, T. Shimizu, M. Watarai, Interferon γ -Induced GTPase Promotes Invasion of *Listeria Monocytogenes* into Trophoblast Giant Cells, *Scientific Reports*. 5 (2015) 8195. <https://doi.org/10.1038/srep08195>.
- [564] G. Yang, H. Pillich, R. White, I. Czikora, I. Pochic, Q. Yue, M. Hudel, B. Gorshkov, A. Verin, S. Sridhar, C.M. Isales, D.C. Eaton, J. Hamacher, T. Chakraborty, R. Lucas, Listeriolysin O Causes ENaC Dysfunction in Human Airway Epithelial Cells, *Toxins*. 10 (2018) 79. <https://doi.org/10.3390/toxins10020079>.
- [565] O.D. Schwich, N. Blümel, M. Keller, M. Wegener, S.T. Setty, M.E. Brunstein, I. Poser, I.R.D.L. Mozos, B. Suess, C. Münch, F. McNicoll, K. Zarnack, M. Müller-McNicoll, SRSF3 and SRSF7 Modulate 3'UTR Length through Suppression or Activation of Proximal Polyadenylation Sites and Regulation of CFIm Levels, *Genome Biology*. 22 (2021) 82. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02298-y>.
- [566] K. Leppek, G. Stoecklin, An Optimized Streptavidin-Binding RNA Aptamer for Purification of Ribonucleoprotein Complexes Identifies Novel ARE-binding Proteins, *Nucleic Acids Research*. 42 (2014) e13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt956>.
- [567] S.E. Fritz, S. Ranganathan, C.D. Wang, J.R. Hogg, The RNA-binding Protein PTBP1 Promotes ATPase-dependent Dissociation of the RNA Helicase UPF1 to Protect Transcripts from Nonsense-Mediated mRNA Decay, *The Journal of Biological Chemistry*. 295 (2020) 11613-11625. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013824>.
- [568] Z. Ge, B.L. Quek, K.L. Beemon, J.R. Hogg, Polypyrimidine Tract Binding Protein 1 Protects mRNAs from Recognition by the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway, *eLife*. 5 (2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.11155>.
- [569] A. Kishor, Z. Ge, J.R. Hogg, hnRNP L-dependent Protection of Normal mRNAs from NMD Subverts Quality Control in B Cell Lymphoma, *The EMBO Journal*. 38 (2019) e99128. <https://doi.org/10.15252/embj.201899128>.
- [570] M.K. Atianand, W. Hu, A.T. Satpathy, Y. Shen, E.P. Ricci, J.R. Alvarez-Dominguez, A. Bhatta, S.A. Schattgen, J.D. McGowan, J. Blin, J.E. Braun, P. Gandhi, M.J. Moore, H.Y. Chang, H.F. Lodish, D.R. Caffrey, K.A. Fitzgerald, A Long Noncoding RNA lincRNA-EPS Acts as a Transcriptional Brake to Restrain Inflammation, *Cell*. 165 (2016) 1672-1685. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.075>.
- [571] A.J. Lenard, S. Hutten, Q. Zhou, S. Usluer, F. Zhang, B.M.R. Bourgeois, D. Dormann, T. Madl, Phosphorylation Regulates CIRBP Arginine Methylation, Transportin-1 Binding and Liquid-Liquid Phase Separation., *Frontiers in Molecular Biosciences*. 8 (2021) 689687. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.689687>.
- [572] J. Tsalikis, Q. Pan, I. Tattoli, C. Maisonneuve, B.J. Blencowe, D.J. Philpott, S.E. Girardin, The Transcriptional and Splicing Landscape of Intestinal Organoids Undergoing Nutrient Starvation or Endoplasmic Reticulum Stress, *BMC Genomics*. 17 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2999-1>.
- [573] J. Allahverdy, N. Rashidi, MicroRNAs Induced by *Listeria Monocytogenes* and Their Role in Cells, *Microbial Pathogenesis*. 175 (2023) 105997. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.105997>.
- [574] A. Nanbakhsh, A. Srinivasamani, S. Holzhauer, M.J. Riese, Y. Zheng, D. Wang, R. Burns, M.H. Reimer, S. Rao, A. Lemke, S.-W. Tsaih, M.J. Flister, S. Lao, R. Dahl, M.S. Thakar, S. Malarkannan, Mirc11 Disrupts Inflammatory but Not Cytotoxic Responses of NK Cells, *Cancer Immunology Research*. 7 (2019) 1647-1662. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0934>.
- [575] B. Zhang, S.-Q. Liu, C. Li, E. Lykken, S. Jiang, E. Wong, Z. Gong, Z. Tao, B. Zhu, Y. Wan, Q.-J. Li, MicroRNA-23a Curbs Necrosis during Early T Cell Activation by Enforcing Intracellular Reactive Oxygen Species Equilibrium, *Immunity*. 44 (2016) 568-581. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.007>.
- [576] M.K. O'Bryan, B.J. Clark, E.A. McLaughlin, R.J. D'Sylva, L. O'Donnell, J.A. Wilce, J. Sutherland, A.E. O'Connor, B. Whittle, C.C. Goodnow, C.J. Ormandy, D. Jamsai, RBM5 Is a Male Germ Cell Splicing Factor and Is Required for Spermatid Differentiation and Male Fertility, *PLoS Genetics*. 9 (2013) e1003628. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003628>.

- [577] G. Chen, M. Wu, W. Liu, M. Xie, W. Zhang, E. Fan, Q. Liu, Reactive Oxygen Species Inhibits *Listeria Monocytogenes* Invasion into HepG2 Epithelial Cells, *Food Science & Nutrition*. 6 (2018) 1501-1507. <https://doi.org/10.1002/fsn3.615>.
- [578] C. Mayr, What Are 3' UTRs Doing?, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 11 (2019) a034728. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>.
- [579] S. Saha, A. Chakraborty, S.S. Bandyopadhyay, Stabilization of Oncostatin-M mRNA by Binding of Nucleolin to a GC-Rich Element in Its 3'UTR, *Journal of Cellular Biochemistry*. 117 (2016) 988-999. <https://doi.org/10.1002/jcb.25384>.
- [580] A. Sidali, V. Teotia, N.S. Solaiman, N. Bashir, R. Kanagaraj, J.J. Murphy, K. Surendranath, AU-Rich Element RNA Binding Proteins: At the Crossroads of Post-Transcriptional Regulation and Genome Integrity, *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2021) 96. <https://doi.org/10.3390/ijms23010096>.
- [581] N. Ryczek, A. Łyś, I. Makołowska, The Functional Meaning of 5'UTR in Protein-Coding Genes, *International Journal of Molecular Sciences*. 24 (2023) 2976. <https://doi.org/10.3390/ijms24032976>.
- [582] L. Jia, Y. Mao, Q. Ji, D. Dersh, J.W. Yewdell, S.-B. Qian, Decoding mRNA Translatability and Stability from the 5' UTR, *Nature Structural & Molecular Biology*. 27 (2020) 814-821. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0465-x>.
- [583] F.K. Bahrani, P.J. Sansonetti, C. Parsot, Secretion of Ipa Proteins by *Shigella Flexneri*: Inducer Molecules and Kinetics of Activation., *Infection and Immunity*. 65 (1997) 4005-4010.
- [584] S. Durinck, Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. De Moor, A. Brazma, W. Huber, BioMart and Bioconductor: A Powerful Link between Biological Databases and Microarray Data Analysis, *Bioinformatics*. 21 (2005) 3439-3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>.
- [585] S. Durinck, P.T. Spellman, E. Birney, W. Huber, Mapping Identifiers for the Integration of Genomic Datasets with the R/Bioconductor Package biomaRt, *Nature protocols*. 4 (2009) 1184-1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>.

10 Listes des URL

Santé publique France, 2020 :

<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/listeriose/donnees/#tabs>

Ensembl GRCh37 release 110, Juillet 2023:

https://grch37.ensembl.org/info/genome/genebuild/transcript_quality_tags.html

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000099622;r=19:1259384-1274880;t=ENST00000320936

<https://grch37.ensembl.org/info/genome/genebuild/biotypes.html>

Michal Szpak, 16 Avril 2021:

<https://www.ensembl.info/2021/04/16/update-to-the-ensembl-canonical-transcript-set/>

Ania Kurowska, 22 Juin 2021 :

<https://github.com/AnnaKurowska/Epifluorescent-analysis>

GJ lab, Université de Manchester, 2004 :

<https://www.mirbase.org/>

Répositoire Github associé à ce manuscrit, Morgane Corre, 2023 :

<https://github.com/BIRDLab-AL/MorganeCorrePhDCIRBP>

Table des matières

1	Remerciements	3
2	Liste des abréviations	7
3	Introduction	15
3.1	Interactions hôte-pathogène	16
3.1.1	Bactéries et maladies infectieuses	16
3.1.2	Réponses des cellules hôtes aux infections bactériennes	25
3.1.3	Réorganisation de l'expression des gènes hôtes et conséquences fonctionnelles	33
3.2	Maturation des ARN messagers	38
3.2.1	Cycle de vie d'un ARNm	38
3.2.2	Surveillance de l'intégrité des ARN	41
3.2.3	Régulation de l'expression des gènes par épissage alternatif	46
3.2.4	Optimisation de la détection de modification de l'épissage avec les technologies de séquençages	53
3.3	CIRBP, un acteur essentiel de la coordination de la réponse au stress	59
3.3.1	La famille des protéines RGG	59
3.3.2	Régulation de CIRBP dans les contextes de stress biotiques et abiotiques	62
3.3.3	Fonctions de CIRBP	71
3.3.4	CIRBP comme cible thérapeutique	85
4	Résultats	91
4.1	L'épissage alternatif du facteur de réponse au stress CIRBP renforce la réponse cellulaire aux infections bactériennes	93
4.1.1	Résumé de l'article en français	93
4.2	Analyse des transcrits affectés par des événements d'épissage alternatifs au cours de l'infection	126
4.3	Identification d'un facteur de régulation de CIRBP d'origine bactérienne	128
4.3.1	Etude de la régulation de CIRBP dans le contexte de l'infection par différentes bactéries	128
4.3.2	Validation du rôle de la LLO dans le changement d'isoforme de CIRBP	131
4.4	Surexpression des protéines et des 3'-UTR de CIRBP-201 et CIRBP-210	132
4.4.1	Quantification de la surexpression de CIRBP	132
4.4.2	Impact de la surexpression de CIRBP sur l'invasion des cellules par <i>Lm</i>	133
4.5	Etude de l'impact de l'ISR et du NMD sur la variation d'abondance des isoformes de CIRBP dans le contexte de l'infection par <i>Lm</i>	134
4.5.1	Régulation de CIRBP par perturbation chimique de l'ISR	135
4.5.2	Etude de l'impact des deux voies de dégradation du NMD sur la stabilité différentielle des isoformes de CIRBP	136
4.6	Quantification des différentes isoformes de CLK1 par RT-qPCR	139
4.7	Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires	140
4.7.1	Régulation de l'épissage de CIRBP dans d'autres lignées de cellules adhérentes non-immunitaires	140
4.7.2	Régulation de l'épissage de CIRBP en réponse à la LLO dans une lignée de macrophages	141
4.8	Localisation de CIRBP dans des cellules non-infectées, infectées ou incubées avec de la LLO	141
4.8.1	Analyse de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées et infectées	142
4.8.2	Localisation des ARN CIRBP-201 et CIRBP-210 par sm-FISH	143
4.8.3	Localisation cellulaire des protéines CIRBP-201 et CIRBP-210 dans des cellules infectées	144
4.8.4	Localisation cellulaire de la protéine CIRBP dans des cellules incubées avec de la LLO	146
5	Discussion	151
5.1	Résumé de l'article Corre <i>et al.</i> , 2023	152
5.2	Compléter la caractérisation de la régulation de CIRBP dans le contexte d'infection bactérienne	152
5.2.1	Régulation de CIRBP par la reconnaissance de la perturbation de la membrane par la LLO	152
5.2.2	Quels sont les facteurs d'épissage à l'origine de la régulation de CIRBP ?	153

5.3	Approfondir les rôles de CIRBP pour mieux cerner son importance	157
5.3.1	Généralisation de la réponse CIRBP au-delà des cellules LoVo	157
5.3.2	Comment CIRBP impacte-t-il la progression de l'infection ?	157
5.3.3	Quelles sont les différences d'activité des isoformes CIRBP-201 et CIRBP-210 ?	158
5.4	Optimiser les outils d'identification des évènements d'épissage alternatif	160
5.4.1	Tirer le meilleur des lectures longues	160
5.4.2	Les lectures courtes à la rescousse	161
6	Conclusion générale	163
7	Matériels et méthodes	165
7.1	Identification d'un facteur d'origine bactérienne de régulation de CIRBP	166
7.1.1	Criblage de potentiels facteurs bactériens de régulation de CIRBP	166
7.1.2	Validation de la capacité de régulation de CIRBP de la listériolysine O	168
7.2	Surexpression des protéines et des 3'-UTR de CIRBP-201 et CIRBP-210	169
7.2.1	Clonage de CIRBP dans un vecteur de surexpression	169
7.2.2	Transfection des cellules LoVo avec les plasmides de surexpression de CIRBP	171
7.2.3	Evaluation de l'invasion bactérienne dans des cellules LoVo surexprimant CIRBP	173
7.3	Régulation de CIRBP par perturbation chimique de l'ISR	173
7.4	Etude de l'impact des deux voies de dégradation du NMD sur la stabilisation de CIRBP-210	173
7.5	Quantification des différents isoformes de CLK1 par RT-qPCR	174
7.6	Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires	175
7.6.1	Hela, A549 et Caco2	175
7.6.2	THP-1	175
7.7	Localisation de CIRBP dans des cellules non-infectées, infectées ou incubées avec de la LLO	175
7.7.1	Analyse de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées et infectées	175
7.7.2	Localisation cellulaire de la protéine dans des cellules incubées avec de la LLO	178
7.8	Caractérisation des transcrits affectés par un événement d'épissage alternatif au cours de l'infection par <i>Lm</i>	180
8	Annexes	181
8.1	Table de description des cytolysines bactériennes	182
8.2	Table de description des différents types de transcrits	184
8.3	Table de caractérisation des transcrits épissés alternativement au cours de l'infection et des transcrits contrôles	186
8.4	Gels originaux d'estimation de la surexpression de la protéine CIRBP par immunodétection	195
8.5	Quantification de l'inhibition des protéines SMG en RT-qPCR	196
8.6	Gels originaux d'estimation de la phosphorylation de CIRBP dans des cellules infectées par immunodétection	197
8.7	Gels originaux de quantification de la protéine CIRBP dans le noyau et le cytoplasme par immunodétection	198
8.8	Gels originaux d'estimation de la quantité de protéine CIRBP en cas d'inhibition du NMD par immunodétection	199
8.9	Gels originaux de quantification de la protéine CIRBP dans des cellules infectées et non-infectées	200
8.10	Gels originaux de quantification de la phosphorylation des protéines SRSF dans des cellules incubées avec de la LLO par immunodétection	201
8.11	Inhibition de CIRBP par siARN	202
8.11.1	Résultats de RT-qPCR	202
8.11.2	Gels originaux d'immunodétection de CIRBP en condition d'inhibition de son expression	203
9	Références bibliographiques	205
10	Listes des URL	243
11	Table des matières	245

11.1 Table des matières	245
11.2 Liste des figures	249
11.3 List of Tables	250

Table des figures

3.1	Le microbiote et les barrières physiologiques anti-infectieuses	17
3.2	Le microbiote et les barrières physiologiques anti-infectieuses	18
3.3	Dissémination systémique de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.4	Cycle de vie intracellulaire de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
3.5	Régulation de la virulence de <i>Lm</i> par PrfA	22
3.6	Le système de sécrétion Sec	23
3.7	Structure cristal de la LLO	24
3.8	Régulation de l'expression de la LLO	25
3.9	Fonctions cellulaires de la LLO	26
3.10	Détection des PAMP et DAMP au cours de l'infection par <i>Lm</i>	27
3.11	Les réponses interférons à l'infection par <i>Lm</i>	29
3.12	Activation de l'inflammasome par l'infection par <i>Lm</i>	30
3.13	Morts cellulaires programmées en réponse à l'infection par <i>Lm</i>	31
3.14	Activation de l'ISR en réponse à l'infection par <i>Lm</i>	33
3.15	Formation d'organites sans membranes en réponse à l'infection par <i>Lm</i>	34
3.16	Conséquences de l'infection par <i>Lm</i> sur la structure de la chromatine	36
3.17	Cycle de vie des ARN messagers	38
3.18	Assemblage du spliceosome	40
3.19	Organites sans membrane	41
3.20	Transcrits cibles du NMD	42
3.21	Assemblage de l'EJC	43
3.22	Mécanisme de dégradation des ARNm avec un PTC par le NMD	45
3.23	Double-authentification des cibles du NMD.	46
3.24	Les différents types d'évènements d'épissage alternatif.	47
3.25	Régulateurs cis et trans de l'épissage alternatif.	48
3.26	Régulation des facteurs d'épissage par les kinases CLK1 et SRPK1.	49
3.27	Régulation de l'épissage par modification des acides nucléiques.	52
3.28	Interférence de la transcription avec l'épissage.	52
3.29	Illustration des technologies NGS Illumina et Oxford nanopore technologie.	56
3.30	Etapes de détection d'évènements d'épissage alternatif à partir de données NGS.	57
3.31	Organisation des protéines RGG	60
3.32	Fonctions cellulaires des protéines RGG.	61
3.33	Modifications post-traductionnelles des protéines RGG et leurs conséquences.	62
3.34	Régulations additionnelles de CIRBP.	72
3.35	CIRBP et Hypothermie.	73
3.36	CIRBP et Hypothermie.	75
3.37	CIRBP comme oncogène et suppresseur de tumeur.	77
3.38	Effets de l'expression de CIRBP dans le développement de pathologies.	79
3.39	eCIRBP.	80
3.40	eCIRBP dans les cellules immunitaires.	80
3.41	eCIRBP dans les macrophages.	81
3.42	Rôle et régulation de CIRBP au cours de l'ischémie.	83
3.43	Rôle de CIRBP au cours du développement et de la vie cellulaire.	86
3.44	Rôle de CIRBP au cours de l'hypothermie thérapeutique.	88
4.1	Caractérisation des transcrits épissés alternativement au cours de l'infection	127
4.2	Comparaison des transcrits alternativement épissés	128
4.3	Changement d'expression de CIRBP dans le contexte de différentes infections bactériennes	130
4.4	Changement d'isoforme de CIRBP par complémentation de l'expression de la LLO dans <i>Lm</i>	131
4.5	Validation de la surexpression de CIRBP par les différents plasmides	134
4.6	Taux d'invasion des cellules LoVo surexprimant CIRBP	135
4.7	Schéma des interactions décrites entre <i>Lm</i> , CIRBP, l'ISR et le NMD	136

4.8	Changement d'isoforme de CIRBP en cas d'activation de l'ISR	137
4.9	Expression des isoformes de CIRBP lors d'une inhibition partielle du NMD dans des cellules infectées	138
4.10	Invasion des cellules en cas d'inhibition totale ou partielle du NMD et/ou de CIRBP	139
4.11	Changement d'isoforme de CLK1 dans des cellules LoVo incubées avec de la LLO	140
4.12	Validation du changement d'isoforme de CIRBP dans d'autres lignées cellulaires	142
4.13	Phosphorylation de CIRBP dans des cellules non-infectées ou infectées par <i>Lm</i>	143
4.14	Localisation des isoformes de CIRBP dans des cellules infectées par <i>Lm</i>	145
4.15	Localisation cellulaire de la protéine CIRBP et de ses isoformes dans des cellules infectées par <i>Lm</i>	147
4.16	Localisation de CIRBP en présence de LLO	148
4.17	Détection de CIRBP dans les fractions cytoplasmique et nucléaire de cellules en présence de LLO	148
4.18	Détection de CIRBP dans le surnageants de cellules LoVo et THP-1 incubées avec de la LLO . . .	149
5.1	Isoformes protéiques de CIRBP	155
5.2	Calcul du PSI	162
7.1	Carte du plasmide pcDNA3	169
7.2	Amplification des isoformes de CLK1	174
7.3	Localisation des sondes FISH	177
8.1	Surexpression de CIRBP	195
8.2	Inhibition du NMD	196
8.3	Phosphorylation de CIRBP	197
8.4	Localisation cellulaire de CIRBP	198
8.5	Expression de CIRBP en inhibition du NMD	199
8.6	Expression de CIRBP dans des cellules infectées	200
8.7	Phosphorylation des SRSF en présence de LLO	201
8.8	Baisse de l'expression des ARN de CIRBP par de siARN.	202
8.9	Inhibition de la protéine CIRBP	203

Liste des tableaux

3.1	Catégorisation des facteurs de virulence bactériens.	19
3.2	Les protéines SRSF	51
3.3	Comparaison des technologies de séquençage.	58
3.4	Modulation thérapeutique de CIRBP	90
4.1	Souches bactériennes utilisées pour les infections	129
4.2	Description des constructions pour la surexpression transitoire de CIRBP	132
7.1	Milieux de culture bactériens	166
7.2	Conditions de cultures des différentes souches bactériennes	167
7.3	Complémentation de la LLO dans des souches de <i>Lm ΔhlyA</i>	168
7.4	Constructions de surexpression de CIRBP	170
7.5	Amorces pour la surexpression de CIRBP	172
7.6	Amorces de validation des surexpressions	173
7.7	Tampon SB	173
7.8	siARN contre le NMD	174
7.9	Amorces CLK1	174
7.10	Tampon de lyse pour immunoprécipitation	176
7.11	Tampon de lavage IP	176
7.12	Tampons d'ARN-immunoprécipitation	179
7.13	Composition du RIPA	180
7.14	Liste des anticorps	180
8.1	Les cytolysines bactériennes.	183
8.2	Les différents types de transcrits	185
8.3	Evènements d'épissage alternatifs au cours de 'infection	194

RÉSUMÉ

Au cours de l'infection de cellules humaines par la bactérie pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes*, l'expression des gènes de l'hôte est remaniée par différents mécanismes. Ce manuscrit porte sur l'étude des régulations des gènes humains par épissage alternatif au cours de l'infection, et plus particulièrement celle d'un facteur de réponse au stress, la protéine de liaison à l'ARN CIRBP. Les résultats de ces travaux révèlent que sa régulation est médiée par l'activité de la listeriolyisine O, une toxine bactérienne qui forme des pores dans la membrane plasmique. Les dommages cellulaires qu'elle occasionne affectent l'activité de la kinase CLK1, qui régule l'activité des facteurs d'épissage SRSF. Cette perturbation redessine le paysage d'épissage alternatif cellulaire. Parmi les gènes les plus régulés, l'expression d'un isoforme alternatif de CIRBP participe à modérer la progression de l'infection.

MOTS CLÉS

Listeria monocytogenes, Epissage alternatif, ARN, CIRBP, Réponse au stress, Infection

ABSTRACT

Upon infection of human cells by the foodborne bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*, host gene expression is reshuffled through various mechanisms. This manuscript documents how alternative splicing contributes to this reprogramming, with a special emphasis on its impact on the expression of the stress-responsive RNA-binding protein CIRBP. This study reveals that CIRBP regulation upon infection is mediated by listeriolysin O, a bacterial toxin known to create pores in cell membranes. This cellular damage affects the activity of the CLK1 kinase, which regulates the activity of the SRSF splicing factors. As a consequence, alternative splicing is reoriented in a set of genes, amongst which CIRBP. Expression of an alternative isoform of CIRBP contributes to dampen infection.

KEYWORDS

Listeria monocytogenes, alternative splicing, RNA, CIRBP, stress response, infection