

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
UMR_S1110 Institut de recherche sur les maladies virales et hépatiques
Sanofi Strasbourg R&D

THÈSE présentée par :
Laure KIEFFER-HOMAND

Soutenue le : 08 octobre 2021

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Étude du rôle de la protéine RACK1 dans la
traduction IRES-dépendante dans les
hépatocytes et son impact sur la
différenciation des macrophages**

THÈSE dirigée par :
Dr SCHUSTER Catherine

DR INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Prof. IMBERT Isabelle
Dr OHLMANN Théophile

PU CNRS, Université d'Aix-Marseille
DR INSERM, Ecole Normale Supérieure de Lyon

EXAMINATEUR :
Dr MUELLER Christopher G.

DR CNRS, Université de Strasbourg

A mes grands-parents,

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je souhaite remercier les membres du jury, le Professeur Isabelle Imbert, le Docteur Théophile Ohlmann et le Docteur Christopher G. Mueller d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de doctorat.

Je tiens particulièrement à remercier Catherine Schuster et Safia Deddouche-Grass de m'avoir offert l'opportunité de faire un doctorat au sein de leurs équipes et de la confiance qu'elles m'ont accordé ces quatre années. Merci pour votre disponibilité, votre curiosité scientifique et votre rigueur. Vous m'avez permis d'explorer différents domaines de la biologie, que ce soit la biochimie, le génie génétique ou l'immunologie. Sans votre encadrement, ce doctorat n'aurait pas été aussi enrichissant ; votre soutien m'a permis de grandir humainement et scientifiquement.

J'aimerais remercier chaleureusement tous les membres passés et présents de l'unité Inserm U1110 et Sanofi Strasbourg. Ces quatre années n'auraient pas été les mêmes sans votre bienveillance, votre entraide et votre bonne humeur. Vous avez été une seconde famille pour moi durant ce doctorat. Merci pour tous les moments passés au laboratoire, vos encouragements dans les galères de manips, j'ai tellement appris à vos côtés. Merci aussi pour les moments que nous avons partagé en dehors du laboratoire, que ce soit un resto, une bière, un ciné, une sortie vélo ou un footing. Certains d'entre vous sont devenus des amis. Je souhaite remercier particulièrement : Anne, Anne-Julie, Camille D, Camille T, Emma, Emilie C, Emilie S, Hugo, Julia, Justine, Léa, Lina, Lucille, Maria, Marine, Matthieu, Nathalie, Neila, Rama, Orphée, Véro. Des noms ont sans doute été oubliés au moment d'écrire ces mots, pardonnez-moi. Sans vous, mon doctorat n'aurait jamais été une si belle aventure humaine.

Merci à mes amis et à ma famille qui m'ont toujours soutenu dans mes projets professionnels. Les amis qui m'ont entouré de près ou de loin, ceux qui sont là depuis toujours et ceux que j'ai appris à découvrir plus récemment : Anaïs, Benjamin, Emeraude, Emmanuelle, Geoffrey, Morgane, Noémie, Tamara. Merci à mon cousin Yannick pour l'attention particulière qu'il a toujours porté à mon égard et pour sa soif de connaissance. Un énorme merci à ma mini couz', Chloé, qui a été d'un soutien sans faille, la galère des études ça nous connaît à toutes les deux. Une page se tourne pour moi mais je serai toujours à tes côtés pour les quelques années qui te restent encore, bientôt ce sera ton tour !

J'aimerais remercier du fond du cœur mes parents, Marcelle et Francis, et mon frère Jérôme. Vous avez toujours porté un intérêt particulier à découvrir le monde de la biologie. Vous m'avez encouragé à aller plus loin. Mon parcours universitaire n'aurait pas été le même sans votre présence à mes côtés. Ces années d'études n'ont pas toujours été simples, semées d'embûches mais j'ai toujours pu compter sur votre soutien inébranlable.

Et enfin, celui qui est devenu mon mari pendant cette aventure, Alexis, tu as été un véritable pilier tout au long de ces huit dernières années et encore plus pendant le doctorat. Tu as pris soin de moi, séché bon nombre de larmes et m'a redonné confiance dans les moments de doutes. Merci d'avoir toujours cru en moi.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION	13
I. Gène et structure de RACK1	15
A. Le gène <i>GNB2L1</i> , promoteur et expression	15
B. Famille à motif de répétition WD et structure.....	16
C. Modifications post-traductionnelles régulant l'activité de RACK1	18
II. Rôle de RACK1 dans l'homéostasie et le stress.....	19
A. Rôle de RACK1 dans la signalisation	19
1. Interaction avec des protéines contenant des motifs d'ancrage spécifiques	19
2. Rôle pléiotropique de RACK1 dans des fonctions physiologiques majeures.	21
i. Le développement.....	21
ii. Croissance cellulaire.....	23
iii. Adhésion et migration cellulaire	24
iv. Réponse au stress.....	26
B. Rôle de RACK1 dans la traduction	29
1. Structure de RACK1 au ribosome	30
i. RACK1 est un composant de la petite sous-unité 40S du ribosome.....	30
ii. Mutations empêchant l'association de RACK1 au ribosome	33
2. Rôle ribosomique de RACK1 dans la traduction	35
i. RACK1 régule l'initiation de la traduction	35
ii. RACK1 régule la traduction d'ARNm spécifiques	40
III. Rôle de RACK1 dans les pathologies	41
A. Infection virale.....	42
1. Rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux.....	42
i. Définition de la traduction IRES-dépendante	42
ii. RACK1 est un facteur d'hôte nécessaire à la traduction IRES-dépendante	46
2. RACK1 est un facteur d'hôte impliqué dans la réplication virale.....	48
B. Inflammation et cancer	50
1. RACK1 régule de nombreuses voies de signalisation impliquées dans	
l'inflammation	50

i.	Régulation de la réponse immunitaire innée.....	50
ii.	Régulation de la réponse à l'interféron de type I	52
iii.	Régulation de la réponse à l'insuline	53
iv.	Régulation de la voie de signalisation NF- κ B	53
v.	Régulation de la signalisation de JNK/c-Jun.....	54
vi.	Rôle de RACK1 dans l'inflammasome NLRP3.....	56
vii.	Rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral	58
2.	Rôle intrinsèque de RACK1 dans le cancer.....	59
i.	RACK1, un nouveau marqueur de diagnostic dans le cancer	59
ii.	RACK1 régule la progression du cancer	59
iii.	RACK1 est impliquée dans la survie cellulaire et la chimiorésistance	61
	OBJECTIFS	63
	MATERIEL ET METHODES	67
	RESULTATS.....	79
	PARTIE I. Rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante virale et cellulaire	81
	I. La traduction IRES-dépendante des ARN viraux et cellulaires est médiée par l'expression de RACK1.	81
	II. Découplage de la fonction ribosomique et de signalisation : construction d'un mutant RACK1 pour étudier l'interaction de RACK1 au ribosome.....	83
	A. Stratégie de knock-in sur la protéine RACK1 endogène par la technique du CRISPR/Cas9	83
	1. Stratégie	83
	2. Optimisation des méthodes de transfection	85
	3. Clonage des guides et conception des matrices contenant les mutations....	86
	4. Création des lignées cellulaires mutantes.....	88
	B. Expression du mutant RACK1 exogène et analyse de son association au ribosome	93
	1. Optimisations de l'analyse du profil des polysomes.....	94
	2. Analyse du profil des polysomes de RACK1 sauvage et mutée	96
	PARTIE II. Rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral	100
	I. RACK1 régule l'expression de la cytokine pro-inflammatoire CXCL10.....	100
	II. Rôle de RACK1 dans la polarisation des macrophages de type M1 et M2	102
	A. Mise au point d'outils d'identification des populations de macrophages.....	102
	1. Optimisation de la polarisation <i>in vitro</i> des macrophages dérivés des THP-1	102

2.	Mise au point d'un panel d'anticorps d'identification des populations M1 et M2 par cytométrie en flux.....	104
3.	Identification des populations M1 et M2 par détection des cytokines sécrétées	106
B.	Etude du rôle de RACK1 sur la polarisation des macrophages <i>in vitro</i>	107
	DISCUSSION	113
	PARTIE I. Rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante virale et cellulaire	115
I.	RACK1 est impliquée dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux et cellulaires	115
II.	Développement d'une lignée cellulaire mutante RACK1 ^{R36D,K38E} pour découpler les fonctions ribosomiques et cytosoliques de RACK1	121
	PARTIE II. Rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral	124
	CONCLUSION	129
	BIBLIOGRAPHIE.....	133

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Représentation des différents éléments présents dans le promoteur humain de <i>GNB2L1</i>	16
Figure 2. Représentation des motifs à répétition WD de la protéine RACK1 humaine.	17
Figure 3. Les différents effets de RACK1 sur ses partenaires d'interaction.	20
Figure 4. RACK1 régule les voies de signalisation Wnt/PCP.	22
Figure 5. RACK1 joue des rôles opposés dans la croissance cellulaire.	24
Figure 6. Rôle de RACK1 dans la migration et l'adhésion cellulaire.	26
Figure 7. RACK1 facilite la communication croisée entre la formation des granules de stress et la voie SAPK.	27
Figure 8. Rôle de RACK1 dans l'autophagie.	29
Figure 9. RACK1 est un composant de la petite sous-unité 40S du ribosome.	30
Figure 10. Interactions de RACK1 avec l'ARN ribosomique 18S et les protéines ribosomiques uS3, uS9 et eS17.	32
Figure 11. Représentation du dimère RACK1 associé au ribosome.	33
Figure 12. Interaction entre le ribosome et les résidus R38 et K40 de RACK1/Asc1.	34
Figure 13. Rôle de RACK1 dans l'initiation de la traduction coiffe-dépendante chez les eucaryotes.	37
Figure 14. RACK1 régule l'activité d'eIF6.	39
Figure 15. Rôle de RACK1 dans la traduction d'ARN spécifiques associées à Scp160.	41
Figure 16. Structure des IRES de type I à IV.	45
Figure 17. La position de RACK1 dans la sous-unité 40S peut être liée au rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante du VHC.	48
Figure 18. RACK1 atténue la réponse inflammatoire innée induite par l'activation de RIG-I.	51
Figure 19. RACK1 régule la réponse inflammatoire de la voie de l'IFN de type I.	52
Figure 20. RACK1 est un régulateur négatif de la voie NF- κ B.	54
Figure 21. RACK1 est un régulateur positif de la voie JNK/c-Jun.	55
Figure 22. RACK1 est impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.	57
Figure 23. RACK1 est impliquée dans la polarisation des macrophages dans le microenvironnement du carcinome épidermoïde oral (OSCC).	58
Figure 24. RACK1 régule positivement la croissance cellulaire.	60
Figure 25. Rôles pro- et anti-apoptotique de RACK1.	61
Figure 26. RACK1 régule la traduction IRES-dépendante d'ARN viraux et cellulaires.	82
Figure 27. Stratégie de knock-in utilisant la technique CRISPR/Cas9 pour introduire les deux points de mutations R36D et K38E.	84
Figure 28. Optimisation de la transfection d'ADN dans les cellules Huh7.	86
Figure 29. Évaluation de l'efficacité de clivage des guides.	87
Figure 30. Évaluation de l'efficacité de clivage des guides dans les pools de mutants R36D et K38E.	89
Figure 31. Méthodes de détection de la présence spécifique de mutants dans les pools de cellules transfectées avec les guides et les matrices ssODN.	90
Figure 32. Observation de l'état allélique des lignées R36D et K38E par analyse ddPCR.	92

Figure 33. Stratégie utilisée pour exprimer la protéine RACK1 exogène contenant les mutations R36D et K38E.	93
Figure 34. Optimisation des conditions de profil des polysomes.	95
Figure 35. La double mutation R36D,K38E de RACK1 inhibe l'association de RACK1 au ribosome.	98
Figure 36. L'inhibition de RACK1 induit une augmentation de l'expression de CXCL10 dans le CHC.	101
Figure 37. Optimisation de la polarisation des macrophages de type M1 et M2 dérivés de THP-1.	103
Figure 38. Validation des marqueurs de surface cellulaire spécifiques des populations de macrophages de type M1 et M2.	105
Figure 39. Détection de la sécrétion de cytokines spécifiques aux macrophages de type M1 et de type M2.	106
Figure 40. Dans le carcinome épidermoïde oral RACK1 n'est pas impliquée dans la polarisation des macrophages dérivés des THP-1.	108
Figure 41. Dans le carcinome épidermoïde oral RACK1 ne module pas la polarisation des macrophages dérivés des THP-1 en réponse à la privation de sérum.	110
Tableau 1. Séquences des guides ciblant les régions R36 ou K38 utilisés dans la stratégie de knock-in par CRISPR.	84
Tableau 2. Séquences des ssODN permettant d'introduire les mutations R36D et K38E utilisées dans la stratégie de knock-in par CRISPR.	88

ABREVIATIONS

A : adénine	CHC : carcinome hépatocellulaire
AChE-R : acetylcholinesterase receptor	CHO : chinese ovary cell
ADAM12 : A Disintegrin and Metalloprotease 12	Cox-2 : cyclooxygénase 2
ADN : acide désoxyribonucléotidique	CrPV : virus de la Paralyse du Cricket
AMPK : AMP activated protein kinase	CSFV : virus de la peste porcine classique
Apaf-1 : apoptotic peptidase activating factor 1	C-ter : C-terminale
AR : androgen receptor	CXCL : C-X-C motif chemokine ligand
Arg : arginine	D : acide aspartique
ARN : acide ribonucléotidique	DCV : virus de la drosophile C
ARNm : ARN messenger	DDA : direct-acting agent
ARNt : ARN de transfert	ddPCR : droplet digital PCR
ASC : apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain	DE : R36D,K38E
Asp : acide aspartique	DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	DMSO : diméthylsulfoxyde
BEFV : virus de la fièvre épidémique bovine	DMV : vésicules à double membranes
BiP : binding immunoglobulin protein	Dsh : dishevelled
BSA : albumine de sérum bovin	E : acide glutamique
C : cytosine	EBV : virus Epstein-Barr
CAT-1 : cationic amino acid transporter 1	EDC : perturbateurs endocriniens
CCL : C-C motif ligand	eEF : facteur d'élongation de la traduction eucaryote
CD : cluster of differentiation	eIF : facteur d'initiation de la traduction eucaryote
CDB : cassure double brin	EMCV : virus de l'encéphalomyocardite
CDC : cell division control	ERK1/2 : Raf-extracellular signal-regulated kinase 1/2
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	FACS : flow analysis cytometry system

FAK : focal adhesion kinase	IFN : interféron
FBS : fœtal bovine serum	IGF-IR : insulin-like growth factor receptor
Fbw7 : F-box and WD repeat domain-containing 7	IGR : région intergénique
FGF : fibroblast growth factor	IGS : interferon-stimulated genes
FHV : flock house virus	IKK : IκB kinase
FMI : intensité moyenne de fluorescence	IL : interleukine
FMVD : virus pied-main-bouche	IR : insulin receptor
Fz : Frizzled	IRES : internal ribosomal entry site
g : guide	IRF : interferon regulatory factor 3
G : guanine	ISRE : interferon-stimulated response element
GFP : green fluorescent protein	ITAF : IRES-transacting factor
Gln : glutamine	JAK : janus tyrosine kinase
Glu : acide glutamique	JNK : Jun N-terminal kinase
GNB2L1 : guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2 like 1	K : lysine
GRE : élément de réponse aux glucocorticoïdes	L : lentivirus
GS : granule de stress	LB : lysogeny broth
GTP : guanosine triphosphate	LPS : lipopolysaccharide
<i>H. pylory</i> : <i>Helicobacter pylori</i>	Lys : lysine
HDR : recombinaison homologue	M0 : macrophage non polarisé
HEK : human embryonic kidney	M1 : macrophage de type M1
His : histidine	M2 : macrophage de type M2
hnRNPK : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	MAPK : mitogen-activated protein kinase
HRP : horseradish peroxidase	MAVS : mitochondrial antiviral signaling
HRV : rhinovirus humain	MEC : matrice extracellulaire
HSC : human tongue squamous carcinoma	miR : microARN
Huh : human hepatoma cells	MKK : MAP Kinase Kinase
IBDV : virus de la bursite infectieuse	MTT : thiazolyl blue tetrazolium blue
	MuV : virus des oreillons
	NASH : stéatohépatite non alcoolique

N-ter : N-terminale	PV : poliovirus
NF- κ B : nuclear factor-kappa B	R : arginine
NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3	RACK1 : Receptor for Activated Kinase 1
NMDAR : N-methyl D-aspartate receptor	RE : réticulum endoplasmique
NPT : non prétraité	RIG-I : retinoic acid-inducible gene I
ORF : cadre ouvert de lecture	RPMI : Roswell Park Memorial Institute
OSCC : oral squamous cell carcinoma	ROS : espèces réactives de l'oxygène
PAM : protospacer adjacent motif	RT-qPCR : reverse transcriptase quantitative PCR
PAMP : pathogen-associated molecular patterns	Sam68 : Src Associated in Mitosis 68
pb : paire de base	SAPK : stress-responsive MAPK
PBS : tampon phosphate salin	Ser : sérine
PCP : planar cell polarity	sgARN : ARN guide simple brin
PCR : polymerase chain reaction	SHH : sonic hedgehog
PEV : entérovirus porcin	ssODN : donneur d'oligodésoxynucléotides simple brin
PFA : paraformaldéhyde	STAT : signal transducers and activators of transcription
PH : plekstrine homology	STUB : ED3 ubiquitine ligase STIP1 homology and U-box containing protein 1
PHH : hépatocytes humains primaires	T : thymine
PIC : complexe de pré-initiation	TAM : macrophages associés à la tumeur
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase	TBK : TANK-binding kinase 1
PK : pseudo-nœud	TBS : solution saline de tris
PKC : protein kinase C	TCA : trichloroacetic acid solution
PKT7 : protein tyrosine kinase 7	TLR : toll-like receptor
PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate	TNF- α : tumor necrosis factor α
PP2A : phosphatase sérine/thréonine 2	TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
PRRSV : virus du syndrome dysgénésique respiratoire porcin	TRAF : TNF receptor-associated factor
PSA : prostate-specific antigen	TRIM : tripartite motif-containing
PT : prétraité	Tyk : tyrosine kinase

Tyr : tyrosine

UPR : unfold protein response

UTR : région non traduite

UV : ultraviolet

Vangl-2 : van-gogh-like 2

VCIP : vascular endothelial growth factor and
type 1 collagen-inducible protein

VDAC2 : voltage-dependent anion-selective
channel protein 2

VEGF : vascular endothelial growth factor

VF : ViaFect

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VHS : virus de l'herpès simplex

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

WD : tryptophane-acide aspartique

WT : sauvage

ZIP1 : zipcode binding protein 1

INTRODUCTION

Le récepteur de la kinase C activée 1 (RACK1) a été originellement identifié comme une protéine d'ancrage de la protéine kinase C activée (PKC) (Rodriguez et al., 1999). C'est un membre de la famille des protéines à répétitions tryptophane-acide aspartique (répétition WD) qui adopte une structure en hélice β et facilite sa liaison à de nombreuses protéines (McCahill et al., 2002). RACK1 interagit avec la machinerie ribosomique (Link et al., 1999), avec plusieurs récepteurs de surface cellulaire et avec des protéines dans le noyau (Adams et al., 2011). Par son interaction avec différents partenaires, RACK1 est un médiateur clé impliqué dans de nombreuses voies et contribue à divers événements biologiques tels que l'infection virale (Majzoub et al., 2014), le développement neuronal (Wehner et al., 2011) et la migration cellulaire (Cox et al., 2003a). De plus, l'altération de son homéostasie est associée au développement de nombreuses pathologies comme le cancer où les variations de son expression analysée dans des cohortes de patients ont pu être corrélées avec un mauvais pronostic de survie (Li and Xie, 2015). Dans cette introduction nous allons développer le rôle de RACK1 dans des activités cellulaires critiques et décrire comment l'altération de son expression peut participer à la réplication virale suite à une infection, à l'inflammation ainsi qu'au développement des maladies associées tel que le cancer.

I. Gène et structure de RACK1

A. Le gène *GNB2L1*, promoteur et expression

La protéine RACK1 humaine est codée par le gène *GNB2L1* (guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like1), qui est cartographié sur le chromosome 5q35.3 et contient 8 exons et 7 introns (Del Vecchio et al., 2009; Wang et al., 2003). Le cadre ouvert de lecture code pour une protéine contenant 317 acides aminés avec un poids moléculaire de 36 kDa. Le gène RACK1 est conservé au cours de l'évolution (Wang et al., 2003), il est exprimé dans divers organismes tels que la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), les insectes (*Drosophila melanogaster*), les plantes (*Arabidopsis thaliana*) et les animaux (rat, poulet, souris, poisson zèbre); et l'alignement de séquences entre les organismes *Tetrahymena thermophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* et *Drosophila melanogaster* révèle une identité de séquence de 43 à 76% (Adams et al., 2011).

Le promoteur du gène humain *GNB2L1* contient deux sites d'initiation de la transcription situés 395 et 328 nucléotides en amont de l'ATG d'initiation ainsi que plusieurs séquences consensus qui permettent le recrutement de facteurs de transcription spécifiques (Buoso et al., 2017). Certains facteurs de transcription ont une activité tissu-spécifique tels qu'Hand1/E47 qui est impliqué dans la différenciation des cardiomyocytes (Risebro et al., 2006), ainsi qu'Elk-1 et Nkx2-5 spécifiques aux muscles lisses et qui ont un rôle dans le développement des muscles cardiaques (Del Vecchio et al., 2009). Le promoteur de *GNB2L1* recrute aussi le facteur de transcription Oct-1, contient trois sites de liaison à Pax-4 et un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) (Del Vecchio et al., 2009) (Figure 1). L'expression de RACK1 est contrôlée par la balance hormonale entre les glucocorticoïdes et

les androgènes qui est dérégulée avec l'âge. La diminution de stéroïdes androgènes actifs entraîne une baisse d'expression de RACK1 qui est impliquée dans le défaut de réponse du système immunitaire lié à l'âge appelé l'immunosénescence indiquant un rôle de RACK1 dans la réponse immunitaire innée (Corsini et al., 2015). L'homéostasie de RACK1 est importante dans des conditions physiologiques et pathologiques comme le vieillissement ou le cancer, puisqu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de RACK1 et le développement de certaines maladies (Corsini et al., 2014, 2016a). L'expression de RACK1 a été identifiée dans la plupart des tissus humains, elle est fortement exprimée dans le cerveau (The Human Protein Atlas) où un changement de son homéostasie induit un défaut dans les processus de mémorisation et le développement de pathologies liées à l'âge (Battaini and Pascale, 2005). De plus, il est décrit que l'expression de RACK1 et de la voie NF- κ B sont réduits chez les patients affectés par la maladie d'Alzheimer, et que NF- κ B joue un rôle dans la plasticité neuronale. De façon intéressante, le promoteur de *GNB2L1* possède quatre sites de liaison à c-Rel, un facteur de transcription de la voie NF- κ B (Figure 1). Une étude fonctionnelle du promoteur de *GNB2L1* dans des cellules de neuroblastomes (SH-SY5Y) a montré l'activation de la transcription du promoteur suite à différents stimuli (LPS et PMA) qui sont des activateurs de la voie NF- κ B (Del Vecchio et al., 2009), confirmant que l'expression de RACK1 est régulée par NF- κ B dans le cerveau. Des résultats similaires ont été obtenus dans des leucocytes THP-1 indiquant que l'expression de RACK1 est directement liée à l'activation de NF- κ B et à l'immunité innée.

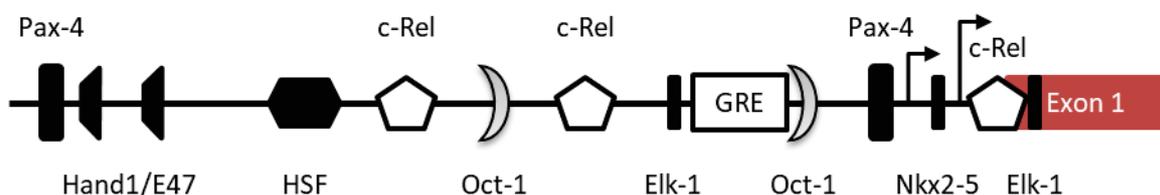


Figure 1. Représentation des différents éléments présents dans le promoteur humain de *GNB2L1*.

Les sites de liaison des différents facteurs de transcription ainsi que les deux sites d'initiation de la transcription (flèches) ont été identifiés après analyse bio-informatique. Figure adaptée de Busco et al., Cell. Signaling, 2017.

B. Famille à motif de répétition WD et structure

RACK1 fait partie de la famille de protéines à motif de répétition tryptophane-acide aspartique (répétition WD) qui est l'une des plus anciennes familles de protéines conservées. Le motif de répétition WD a majoritairement été trouvé chez les eucaryotes et une analyse de la séquence du génome a identifié 136 protéines contenant ce motif chez l'Homme, 98 chez *Drosophila melanogaster*, 72 chez *Caenorhabditis elegans* et 56 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Venter et al., 2001). Les protéines appartenant à la famille WD participent à différentes fonctions cellulaires comme la transduction du signal (RACK1, protéine G β), l'assemblage de la chromatine (CAF-1), l'assemblage du cytosquelette (MAP) ou la régulation du cycle cellulaire (CDC4, CDC20, p55) (Li and Roberts, 2001).

Les protéines à répétition WD sont composées d'au moins quatre séquences répétées contenant chacune un polypeptide de 40 à 60 acides aminés. La répétition des domaines WD permet à la protéine d'adopter une structure en hélice β circulaire où le pli de l'hélice est caractérisé par des pales qui sont chacune composées de quatre brins β -antiparallèles et disposées autour d'un axe central (Xu and Min, 2011). La structure conservée de l'hélice est maintenue par des interactions hydrophobes intramoléculaires entre les pales β adjacentes. La structure tridimensionnelle de la protéine RACK1 humaine a été déterminée par cristallographie avec une résolution de 2,45Å (Ruiz Carrillo et al., 2012). RACK1 est composée de sept répétitions WD et adopte une structure en hélice β à sept pales (Figures 2A et 2B). Un motif « Velcro » stabilise la structure globale en reliant les extrémités N- et C-terminales (N-ter et C-ter) de la chaîne polypeptidique dans la septième pale (Ruiz Carrillo et al., 2012). Un côté du monomère de RACK1 est principalement acide tandis que le côté opposé est plus basique. 60% des résidus tryptophanes sont regroupés sur la face supérieure de l'hélice et n'appartiennent pas au motif WD les laissant accessibles pour former des sites de liaison protéine-protéine.

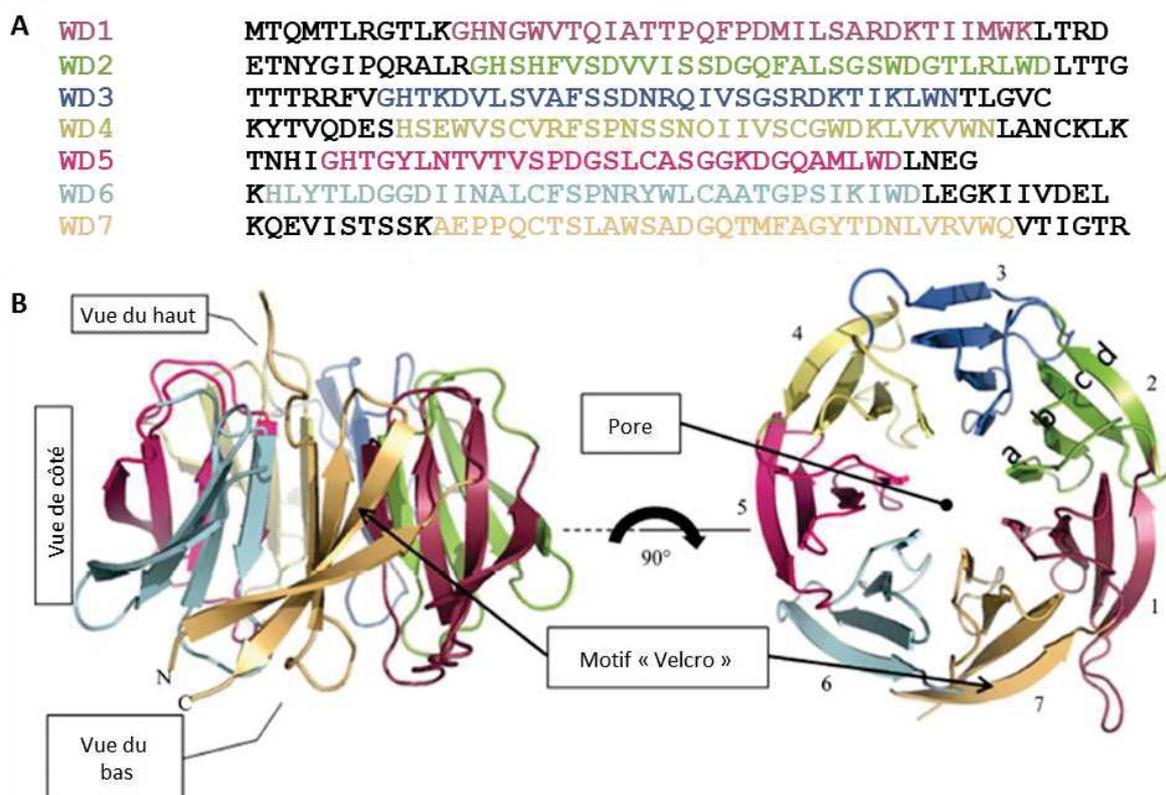


Figure 2. Représentation des motifs à répétition WD de la protéine RACK1 humaine.

(A) Séquence représentant les répétitions WD. (B) Structure cristallographique de RACK1, représentation en cartoon de RACK1 vu de côté (à gauche) et vu du haut (à droite). Les emplacements du pore protéique et du motif « Velcro » sont indiqués. Chaque feuillet ou pale est numéroté à partir de l'extrémité N-ter de la protéine et leurs brins sont étiquetés a, b, c et d à partir de l'intérieur de l'hélice près du pore. Figure adaptée de Ruiz Carrillo et coll., Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2012.

Le motif à répétition WD permet l'interaction de la structure en hélice β avec de nombreux partenaires protéiques. RACK1 a d'abord été décrite comme associée à la conformation active de la protéine kinase C bêta-II (PKC β II) et a été nommée Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) (Ron et al., 1994). Il est maintenant bien établi que RACK1 interagit avec de nombreuses autres protéines, soit directement ou dans le cadre d'un complexe. Plusieurs résidus fortement conservés participent à l'interface d'interaction protéine-protéine et protéine-ARN entre RACK1 et ses partenaires (Ullah et al., 2008). Par exemple, les régions conservées contenant un grand nombre de résidus chargés positivement comme la lysine et l'arginine dans la pale 2 de RACK1 sont capables d'interagir avec la surface de l'ARNr (ARN ribosomique) chargée négativement alors que certains autres résidus sont impliqués dans la liaison avec des protéines ribosomiques. Ces résidus conservés sont nécessaires au recrutement de RACK1 au ribosome puisque les mutations, par exemple, des résidus Arg36, Lys38 et Asp109 inhibent la liaison de RACK1 au ribosome et sa fonction dans la régulation de la traduction chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sengupta et al., 2004).

Les résidus à la surface de RACK1 impliqués dans les interactions protéine-protéine peuvent participer à l'oligomérisation de la protéine. La phosphorylation de la Ser146 de RACK1 humaine conduit à la dimérisation de la protéine en formant des liaisons entre les pales 3 et 4 (Liu et al., 2007) contrairement à la phosphorylation de la Tyr248 chez *Arabidopsis thaliana* qui empêche l'homo-dimérisation des protéines RACK1A (Sabila et al., 2016). La protéine RACK1 humaine a principalement été identifiée comme un monomère en solution (Gonçalves et al., 2010) mais les structures cristallographiques provenant de la levure et d'*Arabidopsis thaliana* représentent RACK1 comme un homodimère. Chez la levure, la formation d'un feuillet β intermoléculaire impliquant les extrémités N- et C-ter de la protéine favorise la dimérisation de RACK1 (Yatime et al., 2011). La dimérisation de la protéine permet d'étendre la surface d'interaction de RACK1 avec de potentiels partenaires. La structure cristallographique d'*Arabidopsis thaliana* RACK1A a permis d'identifier que des séquences enfouies dans le cœur de l'hélice au niveau de la pale 4 peuvent potentiellement être exposées au solvant pour fournir de nouvelles surfaces d'interaction qui ne sont pas disponibles à l'état de monomère (Ullah et al., 2008). La dimérisation de RACK1 permet par exemple de contrôler l'activité des canaux ioniques comme le récepteur NMDAR (N-methyl D-aspartate receptor) au niveau de l'hippocampe (Yaka et al., 2002, 2003). RACK1 peut également interagir avec d'autres protéines contenant des motifs WD, comme c'est le cas de l'hétérodimère entre RACK1 et G β qui est impliqué dans la transduction du signal (Thornton et al., 2004).

C. Modifications post-traductionnelles régulant l'activité de RACK1

Des modifications post-traductionnelles peuvent aussi influencer les interactions entre RACK1 et ses partenaires protéiques. De nombreuses phosphorylations sur des résidus tyrosines sont nécessaires à la liaison de certains partenaires protéiques comme FAK, PP2A ou Src (Kiely et al., 2009, 2008; Chang et al., 2001). Certaines modifications peuvent aussi modifier l'activité et la stabilité de RACK1. C'est le cas de la O-GlcNAcylation (O-linked β -N-

acetylglucosaminylation) sur le résidu Ser122 de RACK1 dans les hépatocytes qui favorise sa stabilité, sa localisation au ribosome et son interaction avec la PKC β II, le tout conduisant à l'activation de la traduction d'oncogènes responsables de la tumorigenèse du carcinome hépatocellulaire (CHC) (Duan et al., 2018).

Grâce à sa conformation structurelle ainsi qu'à des modifications post-traductionnelles, RACK1 peut interagir avec de nombreuses protéines qui sont impliquées dans différentes voies de signalisation et peut jouer des rôles différents en fonction de l'expression tissu-spécifique des enzymes de modifications post-traductionnelles et de l'expression des partenaires d'interaction.

II. Rôle de RACK1 dans l'homéostasie et le stress

A. Rôle de RACK1 dans la signalisation

1. *Interaction avec des protéines contenant des motifs d'ancrage spécifiques*

La structure de RACK1 lui permet d'interagir avec plus de 80 partenaires protéiques différents de façon directe ou indirecte dans de larges complexes protéiques et dans différents compartiments cellulaires. RACK1 contient de multiples sites de liaisons protéiques qui facilitent son interaction avec des protéines contenant des motifs spécifiques d'ancrage, tels que les domaines C2 des PKC, SH2 des protéines Src et Fyn, ainsi que des domaines d'homologie avec la plekstrine (PH) des protéines dynamines et p120GAP (Adams et al., 2011). RACK1 agit sur ses partenaires d'interaction en induisant leur translocation, activation ou inhibition, la formation ou la séparation de complexes protéiques ainsi que leur dégradation ou stabilisation (Figure 3).

RACK1 a été premièrement décrite comme une protéine d'ancrage de la PKC β II (Ron et al., 1994) et interagit spécifiquement avec son domaine C2 (McCahill et al., 2002). RACK1 se lie uniquement avec la forme active de la PKC β II pour stabiliser sa conformation et ainsi faciliter l'accessibilité à son substrat (Ron et al., 1999; Stebbins and Mochly-Rosen, 2001) (Figure 3D). RACK1 joue le rôle de protéine « navette », l'interaction avec la PKC β II entraîne la translocation des deux protéines pour permettre à la kinase de phosphoryler son substrat dans le site subcellulaire approprié (Figure 3A). RACK1 est un acteur important de la localisation et de l'activité fonctionnelle de la PKC β II. La localisation intracellulaire des protéines de signalisation comme la PKC est importante pour permettre de réguler des complexes protéiques impliqués dans la cascade de transduction du signal et ainsi réguler des fonctions physiologiques comme l'apoptose, la prolifération cellulaire et la conformation de l'actine dans le cytosquelette (Ron et al., 1994). Lorsque RACK1 est associée au ribosome, le recrutement de la PKC β II permet de contrôler l'initiation de la traduction canonique via la phosphorylation des facteurs d'initiation eIF4G et eIF3 (eukaryotic initiation factor) (Dobrikov et al., 2018a). De plus, RACK1 couplée avec la PKC β II promeut la phosphorylation d'eIF4

induisant préférentiellement la traduction de gènes impliqués dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses du CHC (Ruan et al., 2012).

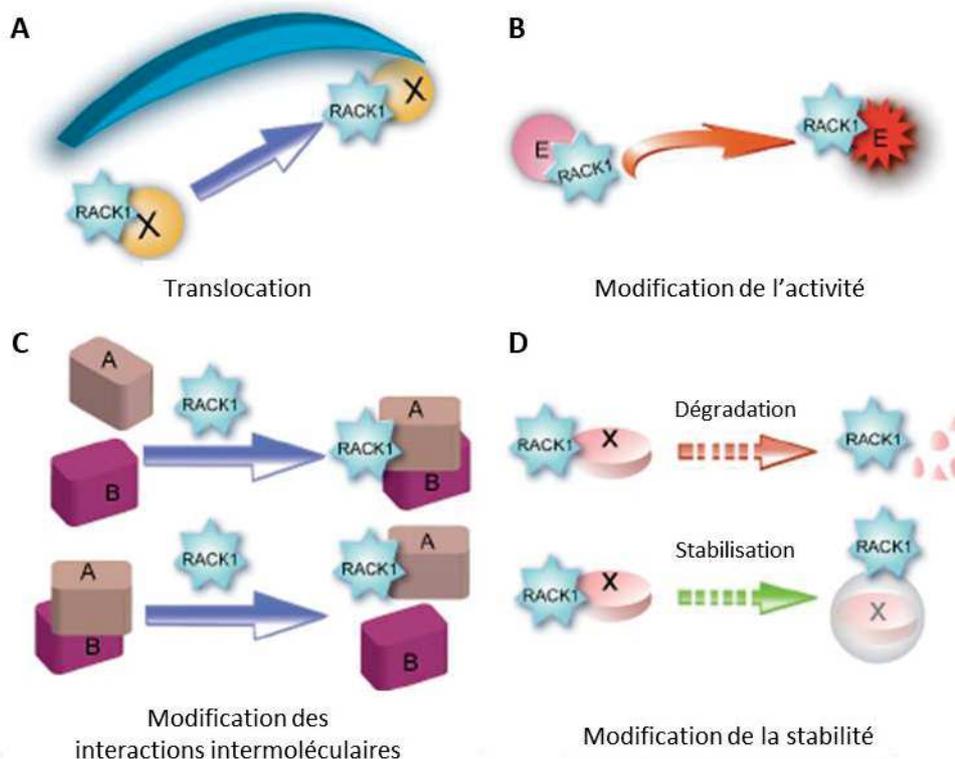


Figure 3. Les différents effets de RACK1 sur ses partenaires d'interaction.

(A) RACK1 peut transloquer ses partenaires d'un site subcellulaire à un autre. (B) RACK1 peut moduler l'activité enzymatique de ses partenaires en induisant leur activation (« E » abrégé pour « enzyme »). (C) RACK1 régule les interactions intermoléculaires en induisant l'association ou la dissociation de complexe. (D) RACK1 peut moduler la stabilité de ses partenaires en entraînant leur dégradation ou au contraire en favorisant leur stabilité. Figure adaptée de Li et Xie, *Oncogene*, 2015.

Le deuxième motif d'ancrage de liaison à RACK1 le plus étudié est le domaine SH2 se trouvant plus particulièrement dans la tyrosine kinase Src. Il a été décrit que les formes sauvages de RACK1 et de la protéine Src co-immunoprécipitent dans des cellules CHO (chinese hamster ovary cell) alors que des mutations dans le domaine SH2 de Src empêchent les protéines de co-immunoprécipiter (Chang et al., 2001). Des mutants de RACK1 ont permis d'identifier que RACK1 est un substrat pour la protéine Src. Src phosphoryle les résidus Tyr228 et Tyr246 de RACK1 qui sont hautement conservés et sont localisés sur la sixième répétition WD ce qui favorise l'interaction entre les deux protéines (Chang et al., 2002; Yaka et al., 2002). En contraste de son rôle avec la PKC, RACK1 séquestre la protéine Src et joue le rôle d'inhibiteur de son activité kinase (Miller et al., 2004) (Figure 3B). Src est décrite comme un proto-oncogène impliqué dans la croissance, la différenciation et l'adhésion cellulaire (Chang et al., 2002), en régulant l'activité de Src, RACK1 est directement impliquée dans ces fonctions cellulaires. Il apparaît que l'inhibition de l'activité de Src par RACK1 est dépendante du type cellulaire. Par exemple, dans le cancer du côlon la surexpression de RACK1 ralentit la croissance et induit l'apoptose en inhibant l'activité kinase de Src. RACK1 bloque l'activation

de Src dans la voie de survie cellulaire Akt ce qui conduit à la translocation dans le noyau du facteur de transcription FOXO3 et à l'induction de gènes critiques de l'apoptose et aussi de l'inhibiteur p27 induisant l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Mamidipudi et al., 2007; Mamidipudi and Cartwright, 2009). Au contraire, la surexpression de RACK1 régule positivement l'activité de Src via la phosphorylation du résidu Tyr416 ce qui favorise la croissance des cellules de neuroblastomes et de gliomes (Lu et al., 2012; Peng et al., 2013).

RACK1 ne possède pas d'activité catalytique mais joue le rôle de cofacteur enzymatique pour ses partenaires (Ron et al., 1999). Via des motifs spécifiques d'ancrages comme C2 (PKC β II) ou SH2 (Src), RACK1 interagit avec des protéines qui sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation. RACK1 joue alors un rôle direct dans la transduction du signal ainsi que dans des fonctions physiologiques critiques.

2. Rôle pléiotropique de RACK1 dans des fonctions physiologiques majeures

L'expression de RACK1 est essentielle dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans le développement, la migration, la prolifération et l'adhésion cellulaire et les voies de réponses au stress cellulaire qui sont des fonctions critiques dont la dérégulation peut conduire au développement de pathologies.

i. Le développement

Le rôle critique de RACK1 dans le développement des vertébrés a été décrit dans différents organismes. RACK1 est un régulateur de la voie de signalisation canonique Wnt et non-canonique appelée aussi PCP (planar cell polarity) (Li et al., 2011) qui contrôle les processus de division cellulaire orientée, de polarisation et d'extension des cellules pendant la gastrulation ainsi que l'orientation des cellules épithéliales pendant le développement des vertébrés (Keller, 2002). La voie de signalisation PCP partage des composants moléculaires avec la voie Wnt canonique médiée par la β -caténine dont le récepteur membranaire Frizzled (Fz) qui active une cascade d'évènements conduisant à la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la transduction du signal (Axelrod et al., 1998).

Chez l'amphibien *Xenopus*, RACK1 contrôle la fermeture du tube neural, une étape clé du développement embryonnaire. RACK1 induit la relocalisation de la protéine Dsh (dishevelled) à la membrane via son interaction avec la PKC δ 1, et permet l'interaction entre Dsh et le récepteur transmembranaire PKT7 (protein tyrosine kinase 7) qui agit en tant que corécepteur de Wnt activant la voie de signalisation PCP (Wehner et al., 2011) (Figure 4A). Chez le poisson zèbre, RACK1 interagit directement avec la protéine transmembranaire Vangl2 (van-gogh-like 2) et induit sa relocalisation à la membrane ainsi que son interaction avec Rac1 pour réguler les jonctions adhérentes (Li et al., 2011) (Figure 4B). RACK1 a été identifiée comme un régulateur positif de la voie PCP tout en atténuant la voie de signalisation Wnt canonique. L'inhibition de la voie Wnt a aussi été observée chez la souris où RACK1 favorise la dégradation

de la β -caténine par le protéasome lors du développement du cervelet (Yang et al., 2019) (Figure 4C).

Les voies de signalisation Wnt et PCP contrôlent la prolifération, la migration et la résistance à la mort cellulaire suggérant que la dérégulation de l'expression de composés impliqués dans ces voies peut conduire à la progression du cancer (Daulat and Borg, 2017). Il a été identifié que RACK1 stabilise le complexe de destruction de la β -caténine ce qui inhibe la signalisation de la voie canonique Wnt et permet de diminuer le pouvoir tumoral de cellules issues de cancer gastrique (Deng et al., 2012).

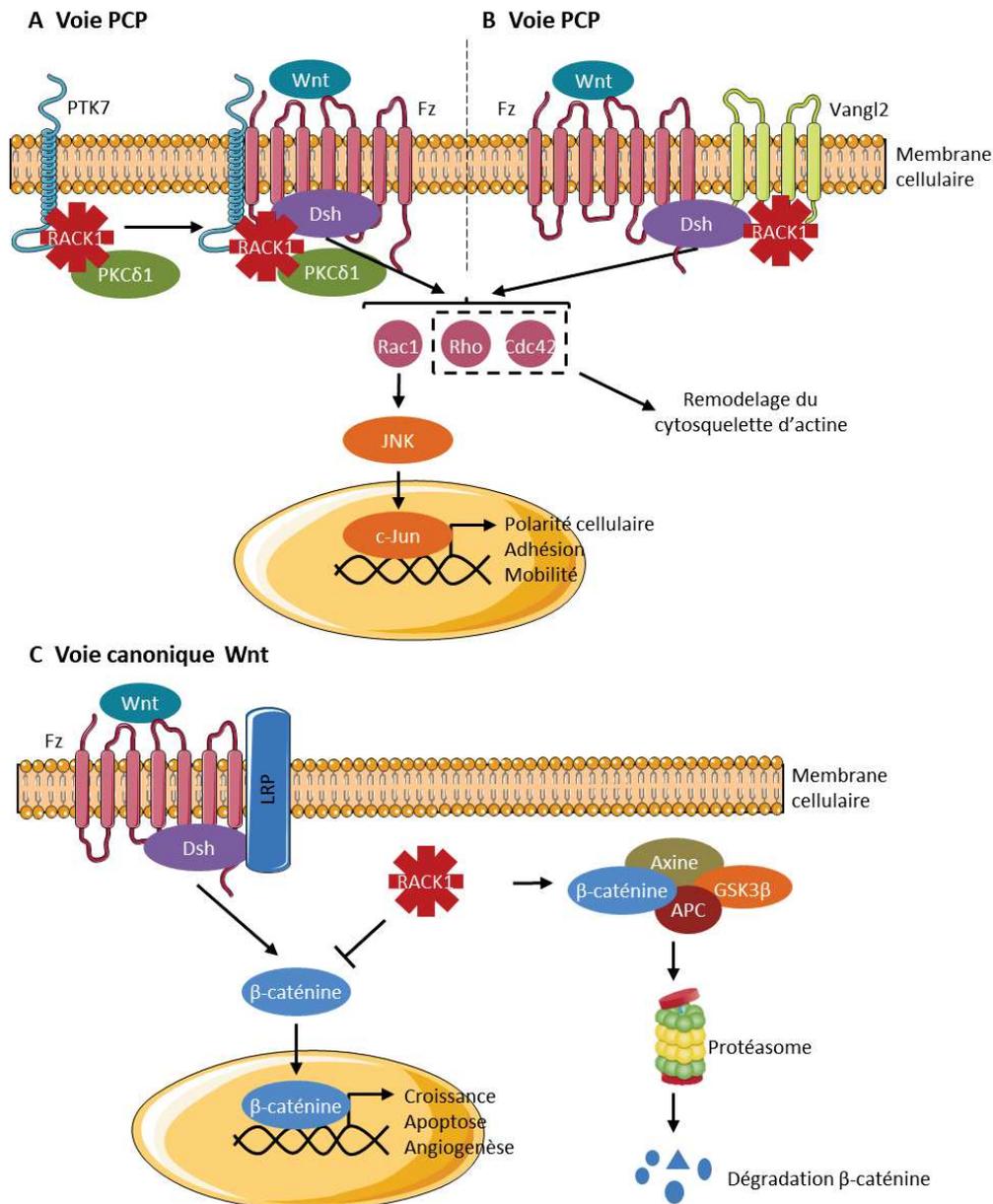


Figure 4. RACK1 régule les voies de signalisation Wnt/PCP.

(A) RACK1 interagit avec le récepteur transmembranaire PTK7 ce qui permet de recruter Dsh via l'activité de la PKC δ 1. (B) RACK1 permet la relocalisation de la protéine transmembranaire Vangl2 ce qui induit l'activation de la protéine Dsh. Dsh activée permet la transduction du signal et la transcription de gènes impliqués dans la PCP. Figure adaptée de Ganier et al., *Medecine sciences*, 2020. (C) RACK1 inhibe la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en favorisant la dégradation de la β -caténine par le protéasome. Figure adaptée de Yang et al., *PNAS*, 2019.

ii. Croissance cellulaire

La croissance cellulaire est régulée par de nombreuses voies de signalisation impliquant RACK1.

L'association de la PKC β II activée à RACK1 induit le transport du complexe RACK1-PKC β II vers la membrane plasmidique où RACK1 se localise à proximité de Src (Chang et al., 2002). RACK1 joue, à la fois, le rôle de substrat et de partenaire de liaison de Src. Src phosphoryle RACK1 pour permettre la formation du complexe Src-RACK1 ce qui inhibe l'activité kinase de la Src Associated in Mitosis 68 (Sam68), une protéine impliquée dans la progression du cycle cellulaire. L'inhibition de Src est importante au point de contrôle du cycle cellulaire G1 (Miller et al., 2004). Il a été décrit qu'une surexpression de RACK1 dans cellules NIH 3T3 séquestre Src dans sa forme inactive ce qui réduit la phosphorylation de Stat3 conduisant à une baisse de la transcription de myc et de la cycline D1 ayant pour conséquence un arrêt partiel en phase G1 du cycle (Mamidipudi et al., 2004). De plus, dans des cellules HT-29 dérivées du cancer du côlon, l'inhibition de l'activité de Src par RACK1 maintient le complexe Cyclin-Dependent Kinase 1 (CDK1)/Cycline B dans un état activé ce qui empêche la sortie en mitose et entraîne une cytostase (Mamidipudi et al., 2007) (Figure 5A).

A l'inverse, RACK1 a également un rôle régulateur positif sur la prolifération cellulaire. RACK1 interagit avec MKK7 (MAP Kinase Kinase 7), une des kinases impliquées dans la voie de signalisation JNK (Jun N-terminal Kinase) (Guo et al., 2013) et régule son activité via la PKC activée. L'activation de la voie de signalisation MAPK induit la prolifération des cellules (López-Bergami et al., 2005) (Figure 5B). RACK1 est aussi un régulateur de la prolifération via la modulation de l'activité d'AR (Androgen Receptor). AR est un récepteur nucléaire impliqué dans le cancer de la prostate qui active la transcription de gènes de prolifération et de différenciation cellulaire en réponse aux androgènes. AR peut être régulé par les androgènes mais aussi par des voies de signalisation impliquant des protéines kinases. Il a été identifié que RACK1 interagit avec AR et joue le rôle de protéine adaptatrice en facilitant l'association entre Src et AR ce qui permet la phosphorylation du résidu Tyr534 d'AR (Kraus et al., 2006). La formation du complexe RACK1-Src-AR ainsi que la phosphorylation d'AR joue un rôle dans l'activation de la transcription régulée par les hormones ainsi que dans la croissance cellulaire (Figure 5B). Le silencing de RACK1 inhibe la croissance induite par la stimulation d'androgènes via la baisse de la phosphorylation d'AR et stimule la transcription de PSA (prostate-specific antigen) dans les cellules cancéreuses de la prostate qui sont traitées avec des androgènes (Kraus et al., 2006). RACK1 est alors un médiateur qui facilite la communication entre AR et ses partenaires de liaison tels que Src, ce qui améliore la phosphorylation de la Tyr534 et l'activité transcriptionnelle d'AR.

En fonction de ces partenaires, RACK1 peut jouer des rôles opposés dans la prolifération cellulaire en entraînant la cytostase ou en favorisant la prolifération cellulaire.

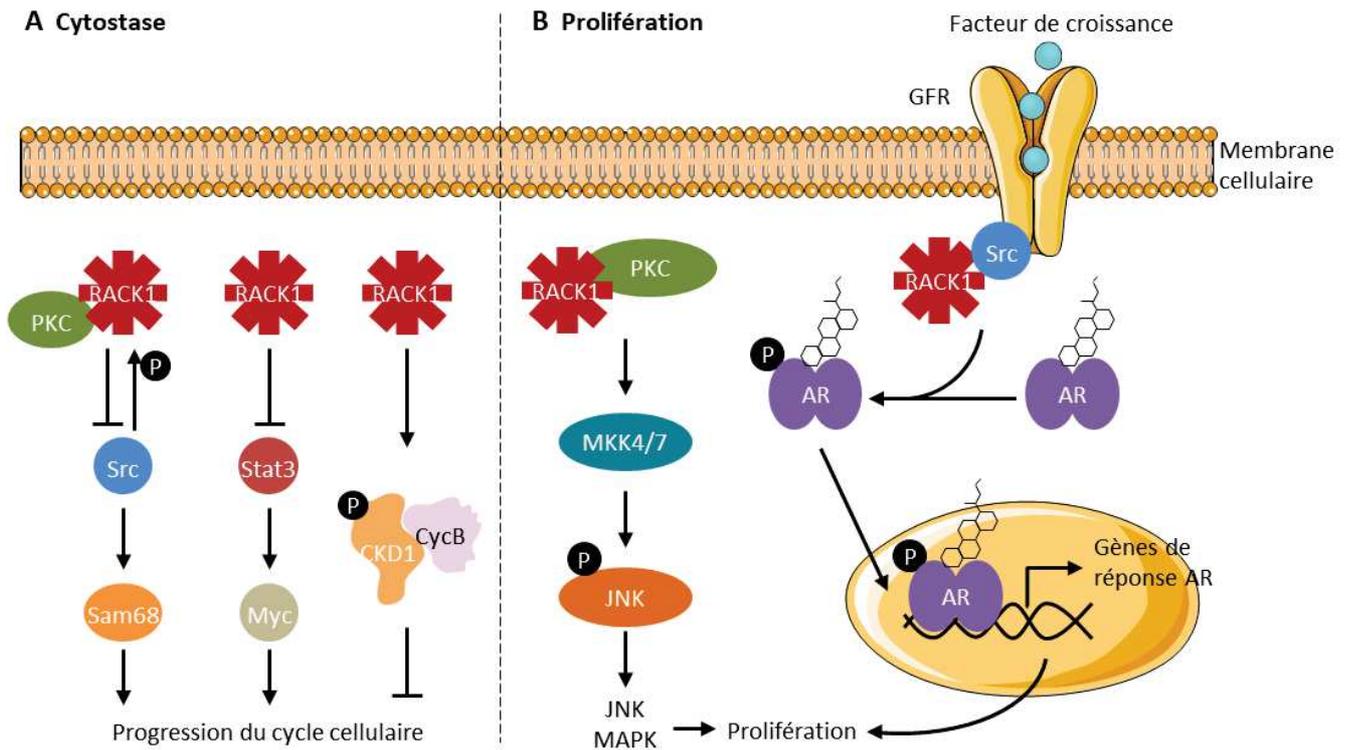


Figure 5. RACK1 joue des rôles opposés dans la croissance cellulaire.

(A) RACK1 empêche la croissance cellulaire en inhibant Src et myc, ou en maintenant actif le complexe CDK1/CycB pour prévenir la progression du cycle cellulaire. (B) RACK1 améliore la prolifération cellulaire en favorisant les activités de la voie MAPK/JNK et AR. Figures adaptées d'Einhorn, BioSciences Master Reviews, 2013.

iii. Adhésion et migration cellulaire

RACK1 s'associe avec des protéines de signalisation impliquées dans des processus dynamiques tels que la migration, l'adhésion et la propagation cellulaire (Adams et al., 2011). Dans le processus de migration cellulaire, le rôle de RACK1 est médié par sa capacité à se lier à des séries de kinases et de phosphatases qui affectent la phosphorylation et l'activité d'autres partenaires de RACK1 ou d'autres complexes protéiques contenant RACK1 mais aussi par son interaction avec le domaine cytoplasmique de certains récepteurs de surface (McCahill et al., 2002). RACK1 est décrit comme un médiateur de la propagation cellulaire en établissant des contacts entre la matrice extracellulaire (MEC) et les récepteurs des facteurs de croissance au niveau des sites d'adhésion (Hermanto et al., 2002). RACK1 peut s'associer avec le récepteur IGF-IR (insuline-like growth factor receptor) qui régule la prolifération, la survie, la différenciation et la transformation cellulaire. RACK1 interagit avec les résidus Tyr1250 et Tyr1251 de l'extrémité C-ter d'IGF-IR et module l'activation de la voie Akt/PI3K en réponse à l'insuline (Kiely et al., 2005). En absence de stimulation du récepteur, la Tyr302 phosphorylée de RACK1 s'associe avec phosphatase sérine/thréonine 2 (PP2A) qui est un régulateur négatif de la croissance et stabilise son activité. PP2A inhibe l'activité de Src qui est séquestrée par RACK1 dans un complexe formé avec Shp2 et la sous-unité 85 de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), ce qui régule négativement la voie Akt/PI3K (Kiely et al.,

2002). En réponse à IGF-I, PP2A se dissocie de RACK1 et perd son activité ce qui permet à Src de phosphoryler Shc et d'induire la migration cellulaire via l'activation des voies Akt/PI3k et Ras/MAPK (Legate et al., 2009) (Figure 6A). La libération de PP2A est essentielle à la prolifération et la migration cellulaire. Il a été décrit qu'une baisse d'expression de la protéine RACK1 diminue l'activité de PP2A et est associée à une augmentation de la migration des cellules cancéreuses dans le cancer du sein (Kiely et al., 2017). La Tyr302 de RACK1 étant un site de liaison en compétition avec PP2A et l'intégrine β 1, le relargage de PP2A facilite le recrutement de RACK1 à l'intégrine β 1 (Kiely et al., 2017, 2008). Les répétitions WD 5 et 7 de RACK1 ont été identifiées comme site de liaison aux intégrines β 1 et β 2 (Liliental and Chang, 1998).

Via son association avec les intégrines β , RACK1 a été identifiée dans des complexes sous-membranaires appelés adhésions focales (Cox et al., 2003a; Onishi et al., 2007). RACK1 a la capacité de se lier à des composés du cytosquelette comme la paxilline et ainsi de réguler l'assemblage des adhésions focales (Buensuceso et al., 2005; Cox et al., 2003a). Les adhésions focales sont de grands assemblages macromoléculaires dynamiques qui contiennent des composants mécaniques et de signalisation, elles sont le lien entre la cellule et la MEC, et sont formées après le regroupement des intégrines à la surface cellulaire. L'expression de RACK1 est essentielle à l'assemblage et au désassemblage de la paxilline dans les adhésions focales, car RACK1 empêche la phosphorylation des résidus Tyr31 et Tyr118 de la paxilline en inhibant l'activité de Src. Les cellules présentant une perte d'expression de RACK1 sont moins mobiles et ont des complexes focaux moins dynamiques. Dans ce cas, RACK1 est un régulateur assurant la dynamique de la paxilline pendant la migration via l'inhibition de l'activité de la Src (Doan and Huttenlocher, 2007).

Un autre régulateur clé de l'adhésion et de la migration cellulaire est la protéine FAK (focal adhesion kinase) qui est activée par phosphorylation en réponse aux facteurs de croissance, aux composants de la MEC et à la stimulation des intégrines. L'activité de RACK1 en tant que protéine adaptatrice de FAK est essentielle pour son activation par IGF-I et la stimulation par les intégrines (Kiely et al., 2009). En réponse à l'IGF-I, RACK1 s'associe à l'intégrine β 1 et régule l'activité de FAK. FAK se lie aux acides aminés hydrophobes se trouvant dans la deuxième répétition WD de RACK1. La phosphorylation du résidu Tyr52 de RACK1 par c-Abl entraîne un changement conformationnel de la protéine permettant la liaison entre RACK1 et FAK (Kiely et al., 2009). En réponse aux intégrines, la Tyr397 de FAK est phosphorylée ce qui génère un site de liaison SH2 permettant le recrutement des protéines appartenant à la famille Src. Src phosphoryle ensuite un deuxième site de phosphorylation de FAK pour augmenter l'activité kinase et la capacité de FAK à interagir avec d'autres protéines cibles telles que des récepteurs de surface ou des protéines du cytosquelette associées à la formation des adhésions focales (Onishi et al., 2007) (Figure 6B). La suppression de l'expression de RACK1 inhibe l'activité de FAK dans l'adhésion et la propagation cellulaire qui sont deux étapes essentielles à la migration cellulaire (Kiely et al., 2005, 2009; Onishi et al., 2007). RACK1 est un facteur clé dans la migration cellulaire par son interaction avec FAK et la régulation de son activité.

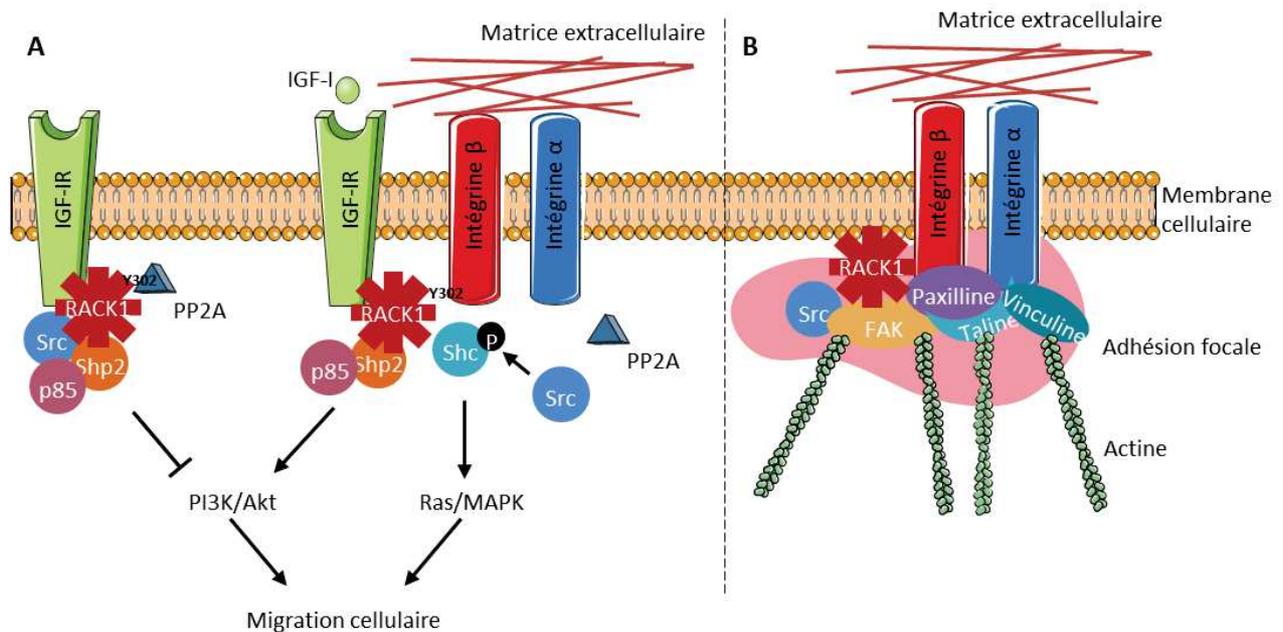


Figure 6. Rôle de RACK1 dans la migration et l'adhésion cellulaire.

(A) En absence de stimulation, RACK1 est associée à IGF-IR et PP2A ce qui inhibe la voie PI3K/Akt. En réponse à l'IGF-I, PP2A se dissocie de RACK1 ce qui permet le recrutement de RACK1 aux intégrines $\beta 1$ et induit l'activation des voies PI3K/Akt et Ras/MAPK. (B) RACK1 s'associe aux intégrines $\beta 1$ au sein des adhésions focales et permet leur assemblage via l'activation de FAK. Figure adaptée d'Adams et al., Cell Comm. & Signaling, 2011.

Le rôle de RACK1 comme protéine adaptatrice dans la migration cellulaire, qui est un processus central dans le développement embryonnaire et les réponses immunitaires, est bien établi. Un changement d'expression de RACK1 peut conduire à un défaut de migration et ainsi induire de graves conséquences comme un système immunitaire défaillant ou favoriser la carcinogenèse (Adams et al., 2011).

iv. Réponse au stress

Dans les paragraphes précédents nous avons décrit que l'expression de RACK1 était essentielle à la régulation de fonctions critiques dans des conditions physiologiques. RACK1 a aussi été identifiée comme un élément clé en réponse à de nombreux changements environnementaux comme le stress oxydatif, l'hypoxie ou la privation de nutriments. En effet, en réponse au stress cellulaire, RACK1 régule des fonctions comme l'apoptose, l'arrêt de la traduction, la survie cellulaire et l'autophagie.

En réponse au stress RACK1 a la capacité de changer de localisation subcellulaire permettant à certaines kinases comme la PKC de se retrouver dans le compartiment cellulaire approprié (Ron et al., 1999; Corsini et al., 2016b). Il a été décrit que le rôle de RACK1 en réponse au stress était dépendant du type de stress cellulaire (Arimoto et al., 2008). En effet, si l'on considère deux types de stress différents : l'un appelé stress de type 1 qui regroupe l'hypoxie, les chocs thermiques et l'arsénite, et l'autre appelé stress de type 2 comprenant les

rayons X et les drogues génotoxiques ; le stress de type 1 induit l'assemblage des granules de stress (GS) qui aura pour conséquence de mettre en pause la traduction des ARNm et permet la survie cellulaire en empêchant l'accumulation de protéines mal repliées, alors que le stress de type 2 active l'apoptose via les voies de réponse au stress p38, JNK, MAPK. La voie de réponse au stress MAPK appelée stress-responsive MAPK (SAPK) est composée de plusieurs réactions en cascades incluant la MAPK kinase kinase MTK1. Il a été montré que RACK1 est un médiateur dans la réponse à ces deux types de stress. En réponse au stress de type 2, plusieurs sites d'interaction de RACK1 s'associent à la MTK1 ce qui maintient MTK1 sous forme dimérique facilitant son activation par GADD45 et lui permet d'induire l'apoptose. En réponse au stress de type 1, RACK1 est séquestrée dans les GS via son interaction avec le ribosome et inhibe l'association RACK1-MTK1. En présence des deux types de stress cellulaires, la séquestration de RACK1 dans les GS régule négativement la réponse apoptotique en inhibant la voie de signalisation MTK1-SAPK. RACK1 est dans ce cas un facteur clé modulant les activités entre la voie de survie cellulaire liée à l'assemblage des GS et la voie de mort apoptotique MAPK en réponse au stress (Arimoto et al., 2008; Gandin et al., 2013) (Figure 7).

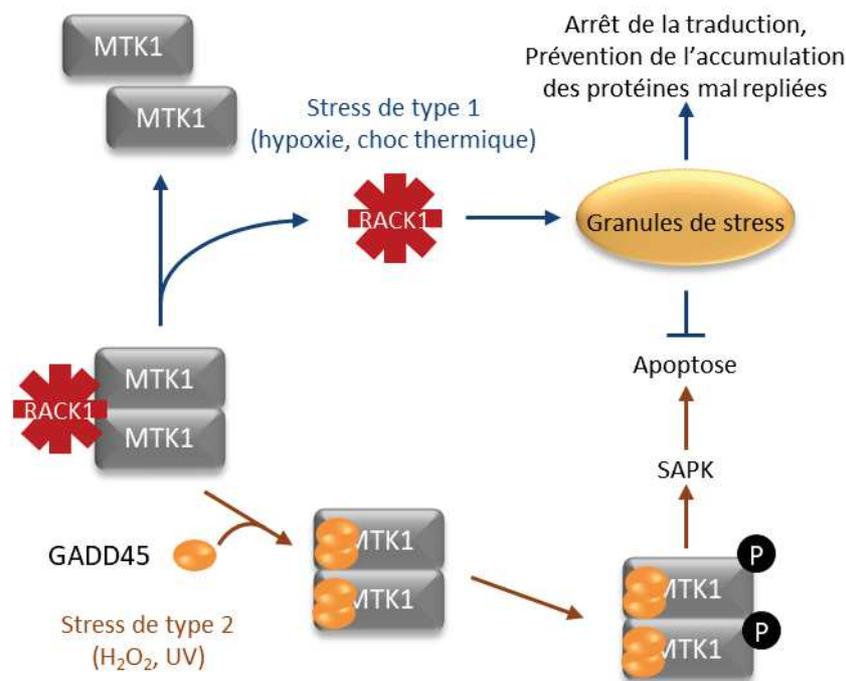


Figure 7. RACK1 facilite la communication croisée entre la formation des granules de stress et la voie SAPK.

En réponse à un stress de type 2 tel que le stress oxydatif, les rayons X, etc., RACK1 stabilise la dimérisation de la MAPK kinase kinase MTK1 facilitant l'association avec GADD45 ce qui conduit à l'autophosphorylation de MTK1, l'activation des SAPK p38, et JNK menant à l'apoptose.

En réponse à un stress de type 1 tel que l'hypoxie, RACK1 est séquestrée dans les granules de stress ce qui supprime l'activation de l'apoptose via MTK1. Figure adaptée d'Arimoto et al., Nature Cell Biology, 2008.

Dans les neurones lors d'un stress induit par une peur intense, on observe une surexpression du récepteur de l'acétylcholinestérase (AChE-R) qui interagit avec RACK1 et la PKC β II facilitant la plasticité synaptique et améliorant la mémoire contextuelle liée à la peur (Nijholt et al., 2004; Sklan et al., 2006). En réponse au stress oxydatif, RACK1 protège les neurones contre l'apoptose en formant un complexe avec DJ-1, un modulateur de la voie de survie Akt, mais une concentration excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut perturber le complexe. L'accumulation de ROS combinée à plusieurs mutations de la protéine DJ-1 codée par le gène *PARK7* sont liées au développement de la maladie de Parkinson. Il a été observé que le niveau d'expression de RACK1 et de DJ-1 était inférieur dans des cellules de souris modèle de la maladie de Parkinson que dans des cellules saines. DJ-1 et RACK1 forment un complexe de signalisation impliqué dans la protection neuronale en réponse au stress oxydatif et pourrait contribuer au développement de maladies neurodégénératives (Ma et al., 2014).

Un autre rôle clé de RACK1 dans la réponse au stress est son implication dans l'autophagie. L'autophagie est un mécanisme physiologique intracellulaire essentiel pour maintenir l'homéostasie des tissus et qui est conservé chez les eucaryotes. En réponse à la privation de nutriments, ou dans d'autres stress, la cellule dégrade les agrégats de protéines, les organelles endommagées et les lipides dans les lysosomes par une structure en double membrane appelée autophagosome. Il a été décrit chez la drosophile, que la privation de nutriments entraîne une augmentation de 4 à 5 fois de l'expression de RACK1 et que RACK1 est localisée dans des structures autophagiques précoces indiquant son implication dans la formation de l'autophagosome (Erdi et al., 2012). Dans des hépatocytes qui ont un niveau basal élevé d'autophagosomes et qui sont de bons modèles pour étudier la régulation de l'autophagie, un défaut de RACK1 conduit à une accumulation de lipides dans le foie (Zhao et al., 2015). La privation de nutriments active l'AMP activated protein kinase (AMPK) qui est un senseur clé de l'autophagie, l'AMPK phosphoryle à la fois la protéine Ulk mais aussi la Thr50 de RACK1. La phosphorylation de Thr50 augmente l'interaction directe de RACK1 avec le complexe Vps15-Atg14L-Beclin1 qui est un complexe régulateur clé de l'initiation et la progression de l'autophagie. RACK1 joue le rôle d'adaptateur pour l'assemblage du complexe et favorise ainsi l'initiation de l'autophagie (Zhao et al., 2015) (Figure 8). RACK1 a aussi été identifiée à d'autres étapes de l'autophagie comme l'élongation de la membrane. La répétition WD 2 de RACK1 interagit avec ATG5 une protéine appartenant au complexe E3-like ATG12-ATG5-ATG15 qui catalyse la conjugaison de la protéine MAP1LC3 aux lipides et contrôle la formation de la vésicule autophagique et son expansion (Erbil et al., 2016). Une étude récente a identifié la protéine FGF21 comme un régulateur de RACK1 dans l'autophagie. FGF21 est décrit comme un agent anti-athérosclérotique qui empêche l'accumulation des lipides. Lors d'une accumulation de cholestérol, FGF21 augmente l'expression de RACK1 dans des cellules spumeuses ce qui permet à RACK1 d'interagir avec l'ATG5 mais aussi de phosphoryler la Thr172 de l'AMPK pour ainsi activer l'autophagie, diminuer l'accumulation de cholestérol et prévenir l'athérosclérose (Xiaolong et al., 2020) (Figure 8).

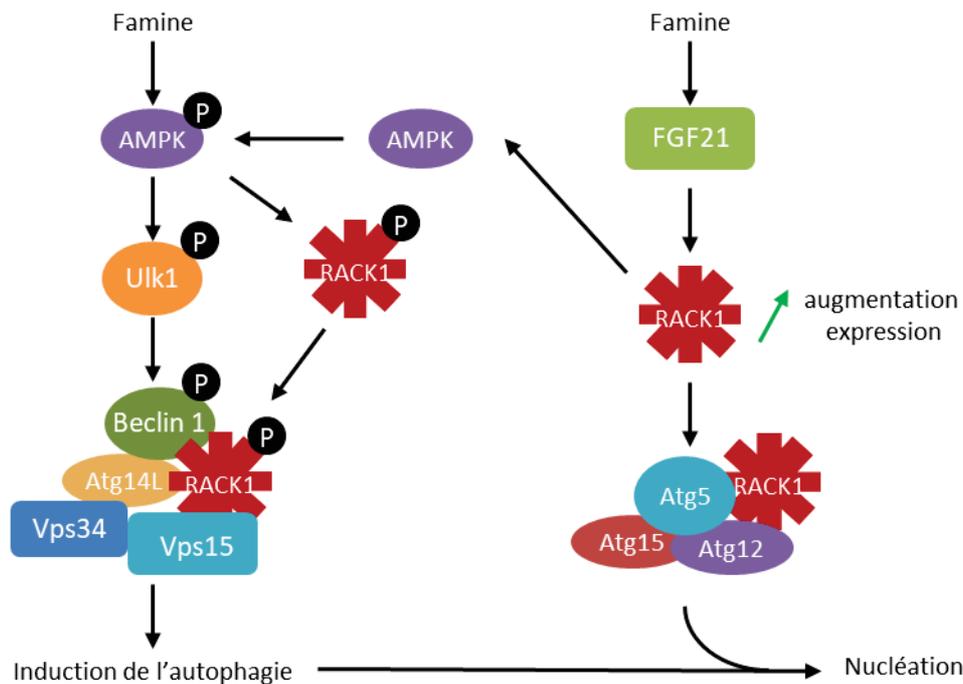


Figure 8. Rôle de RACK1 dans l'autophagie.

En absence de nutriments, RACK1 est impliquée dans différentes étapes de l'autophagie. RACK1 appartient au complexe Beclin1, Atg14L, Vps15 et Vps34 et active l'initiation de l'autophagie via l'AMPK. Le facteur FGF21 augmente l'expression de RACK1 qui va à la fois phosphoryler l'AMPK pour activer l'induction de l'autophagie et aussi participer au complexe Atg5, Atg15, Atg12 responsable de la formation de la vésicule autophagique.

Dans les différents exemples présentés, nous avons décrit que RACK1 peut agir en tant que substrat ou partenaire de liaison avec de nombreuses protéines impliquées dans différentes voies de signalisation régulant des fonctions physiologiques critiques et le stress. Un changement d'expression de RACK1 peut avoir des conséquences sur l'activité et la stabilité des protéines associées à RACK1 et ainsi entraîner le développement de nombreuses pathologies.

B. Rôle de RACK1 dans la traduction

RACK1 a été détectée dans divers compartiments cellulaires dont le noyau, le cytosol et le réticulum endoplasmique (Ron et al., 1999) où elle interagit avec un grand nombre de partenaires protéiques pour réguler différents processus biologiques (Adams et al., 2011). Dans le cytosol, RACK1 a été identifiée comme un composant du ribosome et plusieurs études ces dernières années ont décrit un rôle émergent de RACK1 dans la régulation de la traduction (Ceci et al., 2003; Majzoub et al., 2014; Nielsen et al., 2017; Dobrikov et al., 2018b).

1. Structure de RACK1 au ribosome

i. RACK1 est un composant de la petite sous-unité 40S du ribosome

La plupart des données concernant la structure tridimensionnelle de RACK1, proviennent d'études dans lesquelles RACK1 est liée au ribosome (Armache et al., 2010a; Ben-Shem et al., 2011; Chang et al., 2005; Gonçalves et al., 2010; Link et al., 1999; Sengupta et al., 2004). RACK1 a été identifiée comme étant associée au ribosome pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Link et al., 1999). Des études en spectrométrie de masse réalisées à la fois chez la levure et dans des extraits de lysats de cellules humaines ont montré que RACK1 est un composant de la petite sous-unité 40S mais pas de la grande sous-unité 60S du ribosome avec un ratio de 1:1 par rapport aux autres protéines ribosomiques (Link et al., 1999; Gerbasi et al., 2004) (Figures 9A et 9B). Par la suite, les structures cristallographiques de RACK1 révélées par Cryo-EM ont confirmé la localisation de la protéine dans le ribosome à la fois chez la levure (Ben-Shem et al., 2011; Spahn et al., 2004a; Taylor et al., 2009), les champignons (Sengupta et al., 2004), les plantes (Armache et al., 2010b; Rabl et al., 2011; Ullah et al., 2008) et chez l'Homme (Ruiz Carrillo et al., 2012; Spahn et al., 2004b) indiquant que son association avec la petite sous-unité 40S est conservée au cours de l'évolution. Ces différentes études ont permis d'identifier les interactions de RACK1 avec l'ARNr 18S et les protéines ribosomiques uS3, uS9 et eS17 (Figures 9C et 9D).

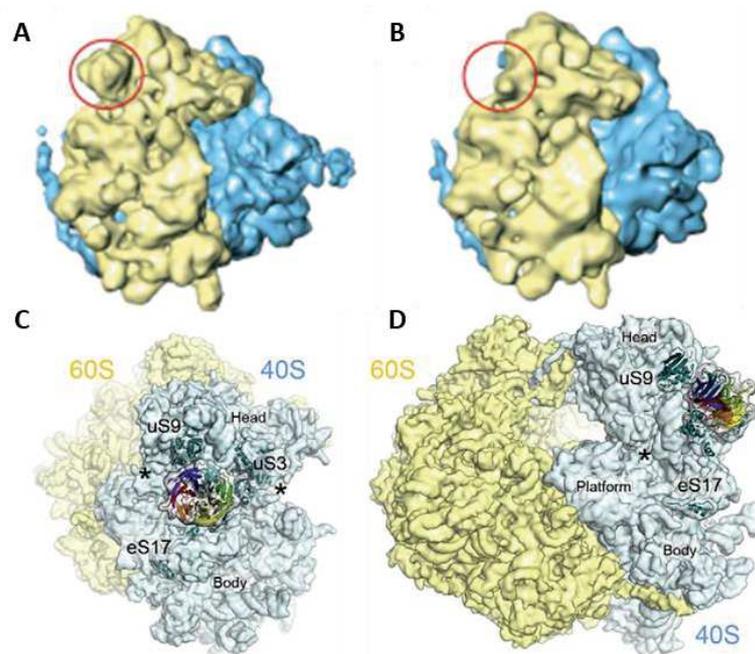


Figure 9. RACK1 est un composant de la petite sous-unité 40S du ribosome.

(A-B) Cryo-EM à une résolution de 11,7Å du ribosome mature 80S de *Saccharomyces cerevisiae* avec (A) et sans RACK1 (B). Figure adaptée de Sengupta et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2004. (C-D) Cryo-EM à une résolution de 3Å du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae*. Représentation en cartoon de RACK1 ou chaque pale a une couleur différente. RACK1 se trouve à l'arrière de la tête de la petite sous-unité 40S. Les astérisques représentent l'entrée et la sortie du tunnel de l'ARNm qui sont à proximité de RACK1. Les protéines ribosomiques uS3, uS9 et eS17 sont représentées en cartoon turquoise. Vu du dessus (C) et vu de côté (D). Figure adaptée de Nielsen et al., Cell. Signaling, 2017.

RACK1 adopte une structure en forme de coupelle où le plus grand bord fait face au solvant et le plus petit bord sert d'ancrage au ribosome sur les hélices 39 et 40 de l'ARNr 18S (Adams et al., 2011) (Figure 10C). RACK1 possède deux régions d'interactions contenant un grand nombre de résidus conservés chargés positivement comme la lysine et l'arginine qui permettent des interactions avec la surface de l'ARNr chargé négativement (Sengupta et al., 2004) (Figures 10E et 10F). La première région d'interaction est la boucle appelée « knob » qui se trouve entre les pales 6 et 7 qui s'associe avec l'hélice 40 de l'ARNr 18S (Figure 10C). Cette interaction ne semble pas être importante car sa délétion n'impacte pas l'association de RACK1 au ribosome, de plus sa longueur et sa séquence varie en fonction des espèces (Nielsen et al., 2017). Par contre, la seconde région se trouvant sur la pale 2 de RACK1 et qui interagit avec l'hélice 39 de l'ARNr 18S semble être plus importante pour l'association de RACK1 avec le ribosome (Figure 10D). En effet, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les mutations des résidus Lys87, Arg90 et Arg102 affectent la liaison au ribosome (Nielsen et al., 2017).

En plus des interactions de charges opposées entre la surface de l'ARNr 18S et RACK1, il existe aussi des interactions spécifiques entre RACK1 et les trois protéines ribosomiques uS9, uS3 et eS17 (Taylor et al., 2009; Armache et al., 2010b) correspondant aux protéines rpS16e, rpS3e et rpS17e d'après l'ancienne nomenclature (Ban et al., 2014). La protéine eS17 constitue une plateforme qui offre la plus grande surface d'interaction (environ 30%) avec RACK1. Les résidus à l'intérieur des pales 1 à 4 de RACK1 et notamment l'Arg38 forment des liaisons hydrogène et des ponts salins qui permettent de connecter RACK1 à eS17 et à l'ARNr 18S (Nielsen et al., 2017; Rabl et al., 2011) (Figures 10E et 10F). RACK1 interagit aussi avec la protéine uS9 (Figure 10B) et la protéine uS3 (Figure 10A) qui s'associe à la face opposée de RACK1 par rapport aux protéines uS9 et eS17 (Adams et al., 2011; Nielsen et al., 2017; Rabl et al., 2011).

Les modèles cristallographiques obtenus par cryo-EM et diffractions aux rayons-X montrent que la surface du haut de la structure de RACK1 est complètement bloquée quand RACK1 est liée au ribosome. En effet, les pales 1, 2 et 4 ne sont pas disponibles lors de l'association au ribosome alors que la face opposée et certains bords des pales 3, 5, 6 et 7 restent libres (Figure 10C) et peuvent servir de plateforme pour recruter des partenaires protéiques au ribosome (Adams et al., 2011; Nielsen et al., 2017; Rabl et al., 2011). Une analyse informatique associant deux structures cristallographiques indépendantes de *Saccharomyces cerevisiae* à basse résolution (2,9Å et 3,9Å) a permis d'identifier que RACK1 sous la forme oligomérique peut s'associer au ribosome (Yatime et al., 2011). Deux brins β appartenant aux pales 4 de deux monomères et se trouvant au cœur de l'hélice de RACK1 permutent vers l'extérieur et s'associent entre eux pour former un dimère (Figure 11). La dimérisation de RACK1 permet d'exposer une nouvelle surface au solvant qui peut être utilisée pour recruter de nouveaux partenaires au ribosome.

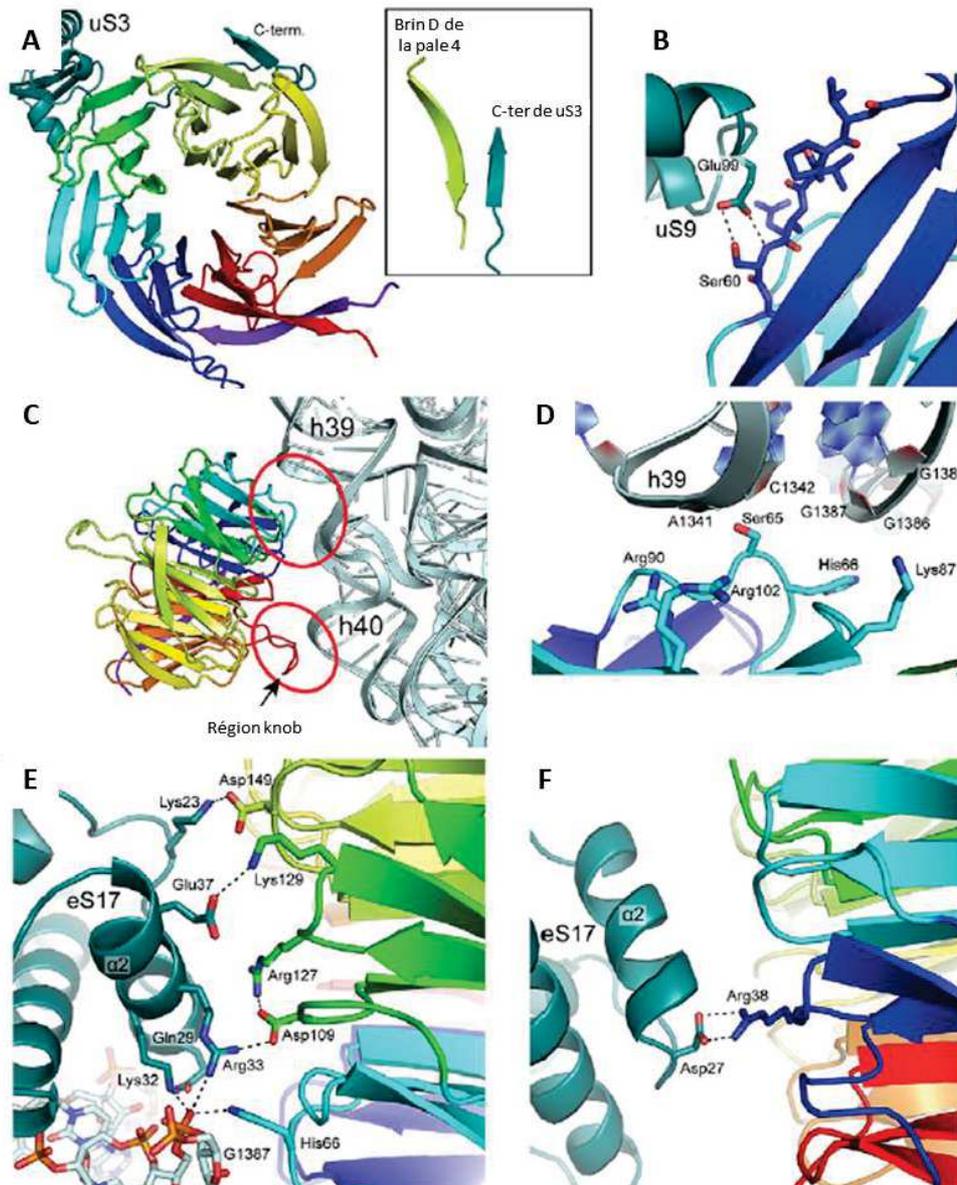
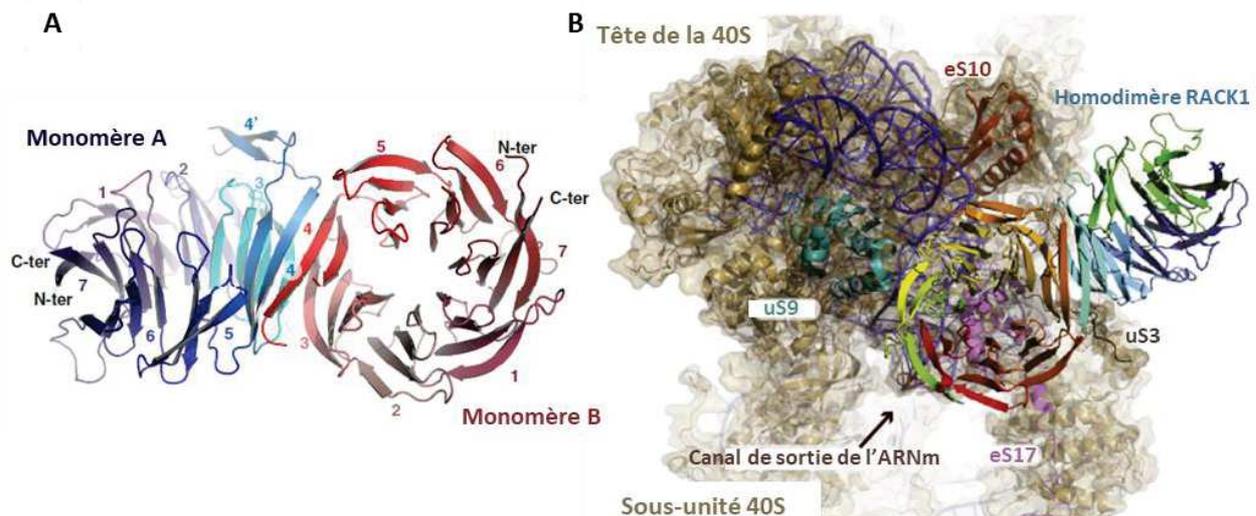


Figure 10. Interactions de RACK1 avec l'ARN ribosomique 18S et les protéines ribosomiques uS3, uS9 et eS17.

Cryo-EM à une résolution de 3Å du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae*. Représentation en cartoon de RACK1 où chaque pale a une couleur différente. Les protéines ribosomiques et l'ARNr 18S sont respectivement colorés en turquoise et en cyan clair. Les résidus ainsi que les bases de l'ARNr 18S impliqués dans les interactions sont représentés par des bâtonnets et sont étiquetés. (A) La région C-ter de la protéine ribosomique uS3 forme un feuillet β avec le brin D de la pale 4 de RACK1. (B) La chaîne latérale de la Glu99 d'uS9 forme des liaisons hydrogène (pointillés) avec la Ser60 de RACK1. (C) RACK1 s'associe aux hélices 39 et 40 de l'ARNr 18S via deux points de contacts entourés par deux cercles rouges. La boucle knob de RACK1 est marquée par une flèche. (D) Les résidus dans la pale 2 de RACK1 interagissent avec les deux brins de l'hélice 39. (E) Les résidus dans les boucles inter-brins des pales 1 à 4 de RACK1 interagissent avec les résidus de l'hélice- α 2 d'eS17. Les résidus Asp149 et Lys129 de RACK1 forment des ponts salins (pointillés) avec les Lys23 et Glu37 d'eS17. Les résidus Arg127, Asp109 et His66 de RACK1 forment un réseau de liaisons hydrogène (pointillés) avec l'Arg33, la Gln29 et la Lys32 d'eS17 mais aussi avec le nucléotide 1387 de l'ARNr 18S. (F) L'Arg38 de RACK1 forme deux liaisons hydrogène (pointillés) avec l'Asp27 d'eS17. Figure adaptée de Nielsen et al., Cell. Signaling, 2017.



ii. Mutations empêchant l'association de RACK1 au ribosome

Afin de comprendre le rôle de la liaison de RACK1 au ribosome, plusieurs mutants ciblant des résidus conservés et impliqués dans les régions d'interactions entre RACK1 et le ribosome ont été étudiés (Coyle et al., 2009; Nielsen et al., 2017). RACK1 étant impliquée dans des fonctions cellulaires critiques comme décrit dans l'un des précédents chapitres (II.A.2 Rôle pléiotropique de RACK1 dans des fonctions physiologiques majeures), son absence d'expression chez la levure est viable mais entraîne des défauts de croissance et de synthèse protéique (Singh et al., 2019), alors qu'au contraire, la déplétion totale de RACK1 est létale au niveau embryonnaire chez la souris (Gandin et al., 2013; Volta et al., 2013). Un mutant hétérozygote de RACK1 présente des défauts de pigmentation de la peau et de croissance cellulaire ainsi qu'une accumulation de ribosomes 80S inactifs et un défaut de synthèse protéique totale (Volta et al., 2013).

Dans le but d'étudier spécifiquement le rôle ribosomique de RACK1, plusieurs études ont utilisé des mutants de RACK1 empêchant spécifiquement la liaison au ribosome. Des mutants ciblant les résidus basiques conservés comme l'Arg38, la Lys40, la Lys62, la Lys87, l'Arg90 et l'Arg102 empêchent l'association de RACK1 au ribosome et présentent un défaut modéré à fort de liaison au ribosome. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, certaines mutations miment le phénotype de déplétion totale de RACK1 en augmentant la sensibilité des cellules à certaines drogues ou en affectant la synthèse de la paroi cellulaire ou l'élongation de la traduction. Cependant les mutations qui présentent le plus sévère défaut

de liaison au ribosome ne miment pas tous les phénotypes correspondant à l'absence de RACK1 suggérant que RACK1 ribosomique n'est pas nécessaire pour toutes les activités cellulaires chez la levure (Coyle et al., 2009). Il a été identifié que le double mutant pour les résidus Arg38 et Lys40 (R38D, K40E) situés au centre de la plateforme formée par la jonction entre les hélices 39 et 40 de l'ARNr 18S et la protéine eS17 présente le plus grand défaut de liaison au ribosome (Coyle et al., 2009) (Figure 12). Ce double mutant (DE) a été décrit dans plusieurs études chez la levure (Sengupta et al., 2004; Kuroha et al., 2010; Opitz et al., 2017; Singh et al., 2019). Comme chez la levure, le double mutant R36D,K38E (équivalent du mutant R38D, K40E de la levure) affecte la localisation de RACK1 au ribosome dans les cellules de mammifères (Romano et al., 2019; Duan et al., 2020). Dans le contexte du neuroblastome une baisse de la prolifération cellulaire a été observée pour le mutant DE (Romano et al., 2019), alors que dans des cellules de fibrosarcomes le double mutant diminue la traduction de façon globale et induit la traduction spécifique de gènes impliqués dans l'autophagie non-canonique (Kim et al., 2017).

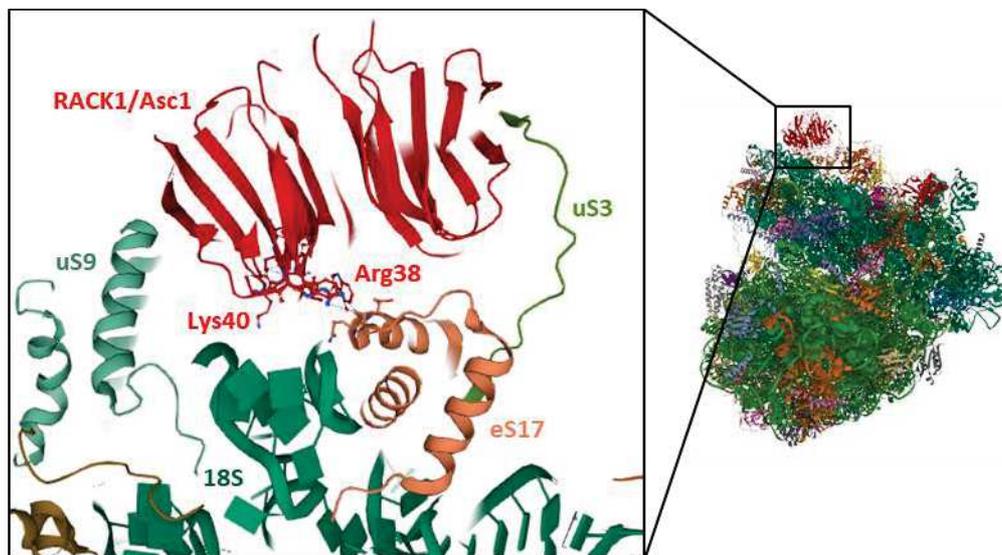


Figure 12. Interaction entre le ribosome et les résidus R38 et K40 de RACK1/Asc1.

Structure cristallographique de RACK1/Asc1 et du ribosome 80S de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à une résolution de 3Å. Les résidus arginine 38 et lysine 40 contribuent à l'association de RACK1/Asc1 à la protéine ribosomique eS17 et l'ARNr 18S de la petite sous-unité 40S du ribosome. Figure adaptée de Ben-Shem et al., Science, 2011.

Ces études ont montré qu'il est possible de découpler les fonctions de RACK1 dans la signalisation et celles dues à son interaction au ribosome tout en conservant un phénotype viable. De plus, les mutants empêchant l'interaction entre RACK1 et le ribosome entraînent des défauts de traduction suggérant que la localisation de RACK1 au ribosome est nécessaire, du moins pour partie, à sa fonction dans la cellule.

2. Rôle ribosomique de RACK1 dans la traduction

De nombreuses études ont observé que la perte d'expression de RACK1 est associée à un changement d'expression de certains transcrits. Il a notamment été décrit chez les levures que la déplétion de RACK1 peut moduler le niveau de traduction de certains ARN de façon opposée (Gerbası et al., 2004; Shor et al., 2003). Des souches de *Saccharomyces cerevisiae* possédant des allèles nuls pour le gène *Asc1* codant pour la protéine Asc1 homologue de RACK1 chez l'Homme, montrent une augmentation du niveau de traduction de certaines protéines suggérant un rôle de RACK1 dans la répression de la traduction (Gerbası et al., 2004); alors que chez *Schizosaccharomyces pombe*, la perte de RACK1 cause une diminution du niveau de certaines protéines impliquées dans la régulation du métabolisme de la méthionine (Shor et al., 2003). Chez la souris, la perte d'un allèle sur deux de RACK1 entraîne un défaut de la synthèse protéique totale (Volta et al., 2013). Ces différentes études montrent que RACK1 semble être directement impliquée dans la régulation de la traduction.

Il a été identifié que RACK1 régule la traduction à différents niveaux. Elle participe à la répression de la traduction de certains transcrits via la voie des microARN. RACK1 serait impliquée dans différents mécanismes moléculaires conduisant à la formation du complexe miRISC mature ainsi qu'à son recrutement au ribosome afin de réguler la traduction de certains ARNm cibles (Jannot et al., 2011; Otsuka et al., 2011; Speth et al., 2013). Plusieurs études ont montré que RACK1 régule le maintien de la qualité de la traduction empêchant la synthèse de protéines aberrantes. Lorsque le ribosome est arrêté sur un ARNm en cours de traduction, RACK1 stimule l'activation du complexe de contrôle de la qualité des protéines associées au ribosome (RQC) induisant le décrochage du ribosome et la dégradation du transcrit en cours de traduction (Ikeuchi and Inada, 2016; Ikeuchi et al., 2019; Kuroha et al., 2010). RACK1 participe aussi au maintien de l'intégrité du cadre ouvert de lecture lors de la collision de deux ribosomes (Wang et al., 2018). RACK1 est un acteur de la biogenèse de la petite sous-unité 40S, RACK1 a été identifiée dans les premières particules cytoplasmiques de la pré-sous-unité 40S humaine et participe à la maturation de l'ARNr 18S qui s'associe à des facteurs d'assemblages ainsi qu'à des protéines ribosomiques pour former la petite sous-unité 40S (Larburu et al., 2016). Par sa localisation dans la petite sous-unité 40S, RACK1 a été identifiée comme régulant l'activité du ribosome et plus particulièrement l'initiation de la traduction (Nielsen et al., 2017).

i. RACK1 régule l'initiation de la traduction

La localisation de RACK1 à l'arrière de la tête de la sous-unité 40S, à proximité du tunnel d'entrée et de sortie de l'ARNm (Nielsen et al., 2017; Nilsson et al., 2004; Sengupta et al., 2004) lui confère un rôle dans la régulation de la traduction (Figure 9C). Lorsque RACK1 est associée au ribosome, une partie de la surface de la protéine est libre, exposée au solvant et peut servir de plateforme d'interaction à de nombreuses protéines. Par sa proximité avec l'ARNm, RACK1 peut interagir avec des facteurs d'initiation pour les recruter au ribosome mais

aussi se lier avec des partenaires kinases pour phosphoryler des protéines associées à l'ARNm (Angenstein et al., 2002). L'une des protéines d'interaction de RACK1 est la PKC β II, qui a la capacité de se lier aux ribosomes pour moduler le niveau de traduction globale. En effet, la stimulation de la PKC β II augmente le ratio polysome/80S qui peut être inversé par l'inhibition de la liaison RACK1-PKC β II. De plus, l'abolition de l'interaction entre RACK1 et la PKC β II réduit l'incorporation de la méthionine suggérant que RACK1 est un facteur clé pour le contrôle de la traduction médiée par la PKC β II, notamment dans l'initiation de la traduction (Grosso et al., 2008a). Il a été identifié que les ribosomes natifs hébergent des PKC actives qui permettent la phosphorylation de substrats associés au ribosome comme les facteurs d'initiation et les protéines de liaison à l'ARNm (Grosso et al., 2008b). RACK1 coordonne la signalisation de la PKC et l'activité du ribosome. RACK1 recrute la PKC active au ribosome afin de moduler l'activité des facteurs d'initiation de traduction (Ceci et al., 2003; Dobrikov et al., 2018b).

Plusieurs études ont montré que RACK1 interagit et/ou régule l'activité de plusieurs facteurs d'initiation (eIF) intervenant à différentes étapes de l'initiation de la traduction que ce soit dans l'assemblage du complexe de pré-initiation 48S ou dans la formation du ribosome mature.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'extrémité C-ter du domaine c/NIP1-PCI d'eIF3 interagit directement avec les pales 1 et 3 de RACK1 et la déplétion de RACK1 affecte l'association d'eIF3 avec la sous-unité 40S. Le domaine PCI pouvant aussi former des liaisons non-spécifiques avec l'ARN, dans cette configuration RACK1 forme un pont intermoléculaire entre eIF3, la sous-unité 40S et probablement l'ARN 18S (Kouba et al., 2012) et ainsi participe à la formation du complexe de pré-initiation 43S (PIC 43S) lors de l'initiation de la traduction (Figure 13). Parallèlement à la formation du PIC 43, il a été identifié chez la levure, que RACK1 interagit avec la boucle fermée que forme l'ARNm avec les facteurs eIF4E, eIF4G et PAB1 lors de la circularisation de l'ARNm (Thompson et al., 2016). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la spectrométrie de masse a permis de montrer que RACK1 co-purifie avec eIF4G et eIF3b (Sengupta et al., 2004) suggérant que RACK1 peut intervenir dans les interactions entre eIF3/eIF5 et eIF4G/eIF4B formant le PIC 48S. Au vu de l'implication de RACK1 dans différentes étapes de l'initiation de la traduction, il a été observé chez la levure qu'un mutant nul de RACK1 perturbe la traduction globale (Thompson et al., 2016). La délétion du gène de RACK1 entraîne une augmentation du nombre de complexes d'initiation bloqués sur l'ARN indiquant un défaut dans l'initiation de la traduction (Chantrel et al., 1997).

Chez l'Homme, l'interaction de RACK1 avec des facteurs d'initiation de la traduction a aussi été observée en réponse à certains stimuli. RACK1 régule l'interaction entre les facteurs eIF4G et eIF3 via l'activité de la PKC β II en réponse au TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Dobrikov et al., 2018a, 2018b). RACK1 associée à la PKC β II module les interactions intramoléculaires entre des régions non-structurées d'eIF4G qui contrôlent la liaison entre eIF4E et eIF3 (Dobrikov et al., 2018a). Il a été proposé qu'au début de l'initiation de la traduction, les facteurs eIF4A, eIF4E et eIF3 sont associés à eIF4G et qu'en réponse à un stimulus comme l'activation de la voie Raf-ERK1/2, le complexe RACK1-PKC β II phosphoryle les résidus Ser1093 d'eIF4G et Ser1364 d'eIF3 ce qui libère eIF4G (Dobrikov et al., 2018b). La phosphorylation d'eIF4G est réversible et est impliquée dans la traduction induite par la voie

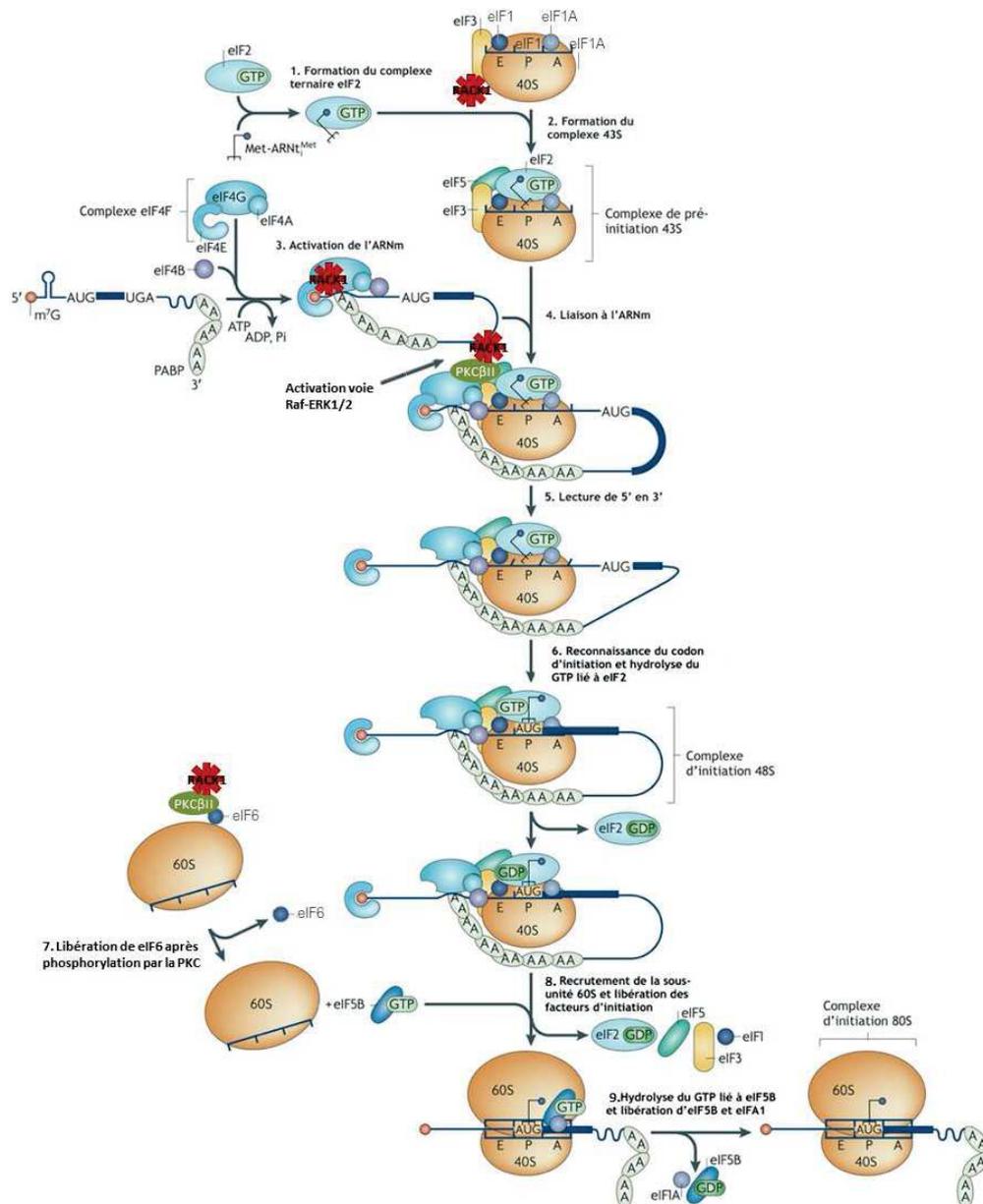


Figure 13. Rôle de RACK1 dans l'initiation de la traduction coiffe-dépendante chez les eucaryotes.

RACK1 intervient à différentes étapes de l'initiation de la traduction qui est divisée en 8 étapes différentes. (1) Formation du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNT^{Met}, (2) qui s'associe avec la petite sous-unité 40S et les facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5A formant le complexe de pré-initiation 43S. RACK1 est associée au facteur eIF3 et favorise la formation du complexe 43S. (3) En parallèle, l'ARNm se lie au complexe eIF4F (eIF4A, eIF4E, eIF4G,) et eIF4B en 5' et avec la PABP en 3' pour permettre sa circularisation, (4) avant de s'associer avec le complexe de pré-initiation 43S. RACK1 permet le recrutement d'eIF4E à l'ARNm. RACK1 module l'interaction entre eIF4G et eIF3 par leur phosphorylation médiée par la PCKβII en réponse à la voie d'activation Raf-ERK1/2. (5) La région 5'UTR de l'ARNm est lue de 5' en 3' par le complexe 43S, (6) jusqu'à la reconnaissance du codon d'initiation ce qui induit la formation du complexe 48S et l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 par eIF5. (7) La PKCβII associée à RACK1 phosphoryle eIF6 pour libérer la grande sous-unité 60S, (8) qui est recrutée sur le complexe 48S par l'action d'eIF5B induisant la libération des facteurs eIF2, eIF3, eIF4B, eIF4F et eIF5. (9) L'hydrolyse du GTP lié à eIF5B induit la libération d'eIF1A et d'eIF5B-GDP permettant la formation du ribosome mature 80S fonctionnel. Figure adaptée de Jackson et al., Mol. Cell Biology, 2010.

de signalisation Raf-ERK1/2 et permet l'induction des transcrits sensibles à l'ester phorbolique comme la cyclooxygénase 2 (Cox-2) ou la traduction de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante (p21^{Cip1}). Dans cette étude, RACK1 a été décrite comme un support moléculaire pour la PKC β II permettant de coordonner la réponse traductionnelle à l'activation de la voie PKC-Raf-ERK1/2.

En réponse à certains stimuli RACK1 régule aussi la formation du ribosome mature 80S qui est la dernière étape de l'initiation de la traduction. RACK1 a été identifiée comme un partenaire d'interaction directe du facteur eIF6 qui contrôle l'assemblage des deux sous-unités du ribosome (Guo et al., 2011; Nilsson et al., 2004; Sengupta et al., 2004; Ceci et al., 2003; Rollins et al., 2019). Le facteur eIF6 est associé à la grande sous-unité 60S mais pas au ribosome mature 80S. eIF6 permet de stabiliser la grande sous-unité mais joue aussi le rôle d'inhibiteur en empêchant son association avec la petite sous-unité. Il a été décrit chez l'Homme que la surexpression d'eIF6 entraîne un blocage de la formation du ribosome mature 80S et un défaut de traduction (Ceci et al., 2003). Ces deux effets peuvent être inversés par la surexpression de RACK1 et la stimulation de la PKC β II qui conduisent à la phosphorylation du résidu Ser236 d'eIF6 entraînant sa libération et la formation du ribosome mature 80S (Ceci et al., 2003) (Figure 14A). Un autre rôle de RACK1 dans la régulation d'eIF6 et indépendant de la phosphorylation par la PKC β II a été décrit. RACK1 s'associe avec eIF6 via la boucle knob entre les répétitions WD 6 et 7. Malgré des différences de séquences entre les espèces, les charges négatives dans la boucle knob ont été conservées et l'interaction entre eIF6 et RACK1 a été identifiée au cours de l'évolution (Ceci et al., 2003; Guo et al., 2011; Rollins et al., 2019). Il semble que la composition en acides aminées de la boucle soit optimisée pour réguler les interactions de RACK1 avec eIF6. Des mutants dans la boucle knob comprenant des résidus chargés, non-chargés ou des délétions montrent que l'interaction entre RACK1 et eIF6 ne semble pas être directe mais que la boucle régule la force ou la dynamique des interactions avec eIF6. La plasticité des séquences dans boucle confère à RACK1 de multiples fonctionnalités dans le contrôle de la traduction. En réponse à certains stimuli entraînant une surexpression de RACK1 ainsi qu'un changement de charge dans la boucle knob, RACK1 s'associe fortement avec eIF6 empêchant son relargage de la grande sous-unité 60S ce qui perturbe l'assemblage du ribosome mature et entraîne un défaut de traduction (Rollins et al., 2019) (Figure 14B). La perte de fonctionnalité de RACK1 ou d'eIF6 impacte la réponse traductionnelle à certains stimuli ainsi que la traduction de certains sous-ensembles de transcrits (Gandin et al., 2008; Volta et al., 2013). Ainsi en contrôlant l'activité d'eIF6 à travers la boucle knob, RACK1 peut contribuer à la régulation de la traduction dans un contexte biologique spécifique.

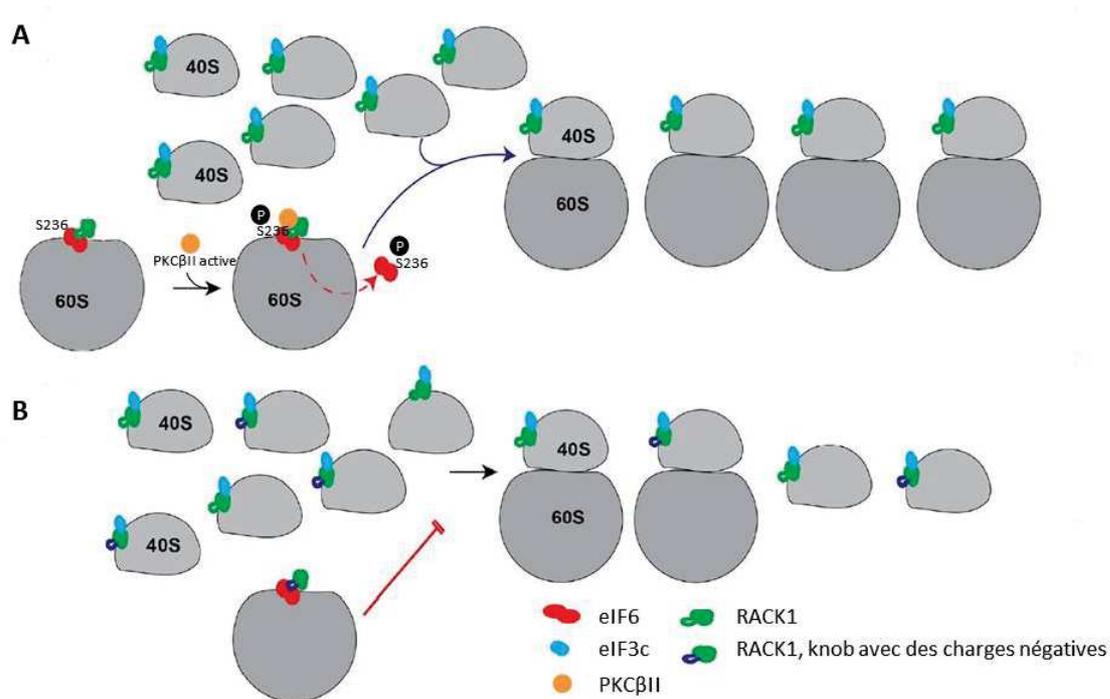


Figure 14. RACK1 régule l'activité d'eIF6.

(A) Dans des conditions normales, la majorité de RACK1 est liée à la petite sous-unité 40S du ribosome et une petite fraction de RACK1 se lie à eIF6. Sur la grande sous-unité 60S, RACK1 recrute la PKC β II qui phosphoryle la Ser236 et libère eIF6 permettant l'association des deux sous-unités et la formation du ribosome mature. (B) En réponse à des stimuli, un changement de charge dans la boucle knob permet à RACK1 de stabiliser l'interaction entre eIF6 et la sous-unité 60S ce qui empêche l'assemblage du ribosome 80S et diminue la traduction. Figure adaptée de Rollins et al., *J. of Cell Science*, 2019.

Dans ces exemples, nous avons vu que RACK1 peut contrôler l'interaction entre le ribosome et des facteurs d'initiation, ainsi que moduler leur recrutement et/ou leur activité à l'aide de la PKC β II. RACK1 régule ainsi différentes étapes de l'initiation de la traduction (Figure 13). L'association de RACK1 avec les facteurs eIF4G et eIF4E qui sont impliqués dans la reconnaissance de la coiffe suggèrent un rôle de RACK1 dans la régulation de la traduction coiffe-dépendante. A ce jour, le rôle de RACK1 dans la traduction globale chez l'Homme n'a pas été établi, quelques études ont montré qu'en réponse à certains stimuli RACK1 joue un rôle dans la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques impliqués dans la croissance tumorale ou dans la réponse à l'activation de la voie PKC-Raf-ERK1/2 (Ruan et al., 2012; Dobrikov et al., 2018b). De plus, RACK1 régule l'activité des facteurs canoniques eIF3 et eIF4G qui peuvent être impliqués dans la traduction coiffe-dépendante et -indépendante (Jackson et al., 2010). En réponse à certains stimuli, il a été suggéré que RACK1 puisse moduler l'initiation de la traduction coiffe-dépendante et -indépendante via l'activité de la PKC β II et ainsi jouer un rôle dans la réponse adaptative de la synthèse protéique en induisant spécifiquement la traduction de certains ARNm.

ii. RACK1 régule la traduction d'ARNm spécifiques

RACK1 peut réguler la traduction d'ARNm spécifiques que ce soit par la reconnaissance d'éléments spécifiques que contiennent les transcrits ou le contrôle de l'activité de protéines associées à certains ARNm.

Chez la levure, il a été identifié que RACK1 régule un mécanisme d'initiation de la traduction dépendante de la longueur des ARNm (Thompson et al., 2016). RACK1 semble nécessaire à la traduction efficace des ARNm ayant un petit cadre de lecture via son association avec la boucle fermée que forme l'ARNm avec le complexe eIF4F et la protéine lors de la circularisation de l'ARNm. La déplétion de RACK1 perturbe spécifiquement la traduction de protéines mitochondriales et ce défaut de traduction peut être mimé par un mutant non fonctionnel d'eIF4G. Les ARNm courts codent pour des protéines cytoplasmiques, ribosomiques ou mitochondriales qui sont impliquées dans des différentes fonctions physiologiques. RACK1 semble alors participer à un mécanisme d'initiation de la traduction dépendant de la longueur de la boucle qui est optimisée pour permettre la traduction efficace de certains gènes dans le but de maintenir des fonctions physiologiques critiques (Thompson et al., 2016).

RACK1 contrôle la traduction de transcrits contenant dans leur extrémité 5' une région riche en arginine appelée 5' poly(A)-leaders. Ce rôle de RACK1 est lié à la fonctionnalité de sa boucle knob où les charges négatives sont utilisées par certaines espèces pour contrôler et augmenter la traduction d'ARNm spécifiques ayant une région 5' poly(A)-leaders. En effet, les charges présentent dans la boucle knob génèrent des forces électrostatiques qui sont organisées dans la structure tridimensionnelle et peuvent probablement remodeler le tunnel de sortie de l'ARNm pour accueillir des structures inhabituelles comme les 5' poly(A)-leaders (Rollins et al., 2019).

La fonctionnalité de RACK1 à réguler la traduction d'ARNm spécifiques provient aussi de sa capacité à recruter d'autres kinases à la surface du ribosome comme Src. Bien que l'interaction de RACK1 et Src au ribosome n'a jamais été montrée, lorsque RACK1 est associée au ribosome les sites d'interaction à la protéine Src, les résidus Tyr228 et Tyr246, restent accessibles. RACK1 peut alors s'associer à Src et moduler son activité à proximité du canal de sortie de l'ARNm sans interférer avec l'association des deux sous-unités du ribosome et la liaison à des ligands fonctionnels comme l'ARNm et l'ARNt (Sengupta et al., 2004).

RACK1 peut aussi recruter certains transcrits au ribosome via son interaction avec des protéines possédant un domaine KH de liaison à l'ARN. Par exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, RACK1 est essentielle à la liaison de Scp160 avec le ribosome (Baum, 2004). Par sa localisation, RACK1 recrute Scp160 et les ARNm associés sur la petite sous-unité 40S du ribosome à proximité du tunnel d'entrée de l'ARN (Figure 15).

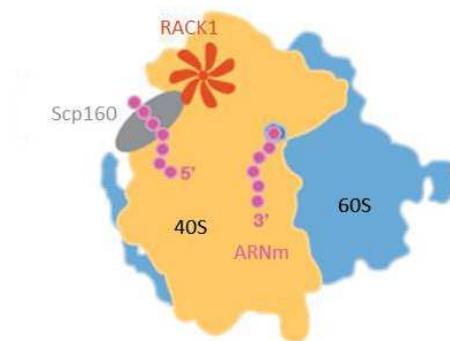


Figure 15. Rôle de RACK1 dans la traduction d'ARN spécifiques associées à Scp160.

RACK1 recrute des protéines de liaison spécifique à l'ARNm sur le ribosome, comme la Scp160 qui est associée à l'ARNm. Figure adaptée de Nilsson et al., EMBO reports, 2004.

RACK1 régule la traduction de l'ARNm β -actine qui est associé à la protéine zipcode binding protein 1 (ZBP1) et qui réprime sa traduction. Lorsque le complexe ZBP1- β -actine s'associe à RACK1 au niveau du ribosome, RACK1 recrute la protéine Src qui phosphoryle à la fois le résidu Tyr246 de RACK1 et une tyrosine de ZBP1 ce qui permet de libérer la β -actine de ZBP1 et d'initier sa traduction. La protéine ZBP1 permet de transporter la β -actine jusqu'aux points de contacts qui sont des sites de traduction locaux de la β -actine. La dynamique d'interaction de RACK1 avec Src et ZBP1 permet la régulation spatiale de la traduction de la β -actine (Ceci et al., 2012). Il a été proposé que RACK1 soit un facteur clé dans le contrôle de la localisation de la traduction (Nilsson et al., 2004). RACK1 pourrait recruter la machinerie de traduction dans des sites subcellulaires dans lesquels un fort taux de synthèse protéique a été observé (Sengupta et al., 2004). Par exemple, RACK1 est localisée au niveau des adhésions focales et pourrait recruter le ribosome à la membrane à travers ses interactions avec la β -intégrine. Il a été décrit que les interactions entre le ribosome et la membrane n'empêchent pas le ribosome de s'associer à des ligands fonctionnels comme l'ARNt, l'ARNm et les facteurs d'élongation. Le ribosome peut alors entrer en phase d'élongation de la traduction et synthétiser de nouveaux peptides à proximité de la membrane (Nilsson et al., 2004). RACK1 pourrait par exemple, réguler la quantité de fibre d'actine au niveau des adhésions focales (Cox et al., 2003b) en contrôlant spécifiquement la localisation de la traduction de la β -actine.

III. Rôle de RACK1 dans les pathologies

Compte tenu de l'implication de RACK1 dans des fonctions cellulaires critiques, l'expression de RACK1 est dérégulée dans de nombreuses pathologies (Adams et al., 2011). Comme décrit plus haut, RACK1 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et notamment dans les voies de l'inflammation, c'est pourquoi il n'est pas surprenant que son expression puisse moduler la progression du cancer ainsi que le microenvironnement tumoral (Li and Xie, 2015). RACK1 a également été identifiée comme participant à la réponse inflammatoire suite à une infection virale (Bi et al., 2018; Lee et al., 2019; Liu et al., 2019) et comme un facteur d'hôte nécessaire à la réplication virale, plus précisément RACK1 est une molécule clé impliquée dans la traduction IRES-dépendante de plusieurs virus (Majzoub et al., 2014).

A. Infection virale

RACK1 a été décrite comme impliquée dans l'infection virale de nombreux virus, comme par exemple le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Gallina et al., 2001), le virus responsable de la maladie des oreillons (Kubota et al., 2002), le virus influenza A (Demirov et al., 2012), le virus de la peste porcine classique (CSFV) (Zhang et al., 2014), les virus de l'hépatite C et B (VHB, VHC) (Jia et al., 2014; Majzoub et al., 2014), le virus de la Paralysie du Cricket (CrPV) (Majzoub et al., 2014; Kuhn et al., 2017) et le virus de la bursite infectieuse (IBDV) (Lin et al., 2015). Il a été montré que RACK1 est impliquée à différents niveaux de l'infection virale. En effet, RACK1 a été identifiée comme un facteur clé de la réplication et de la traduction de l'ARN viral, qui sont des étapes critiques du cycle de vie des virus et qui impliquent des interactions avec des facteurs de la cellule hôte.

1. *Rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux*

Comme décrit dans le chapitre précédent (II.B.2. Rôle ribosomique de RACK1 dans la traduction) RACK1 est une protéine ribosomique de la petite sous-unité 40S, localisée à proximité du tunnel d'entrée de l'ARNm pouvant interagir avec des facteurs d'initiation de la traduction (Nielsen et al., 2017). Récemment, il a été décrit que RACK1 était un facteur d'hôte nécessaire à la traduction de l'ARN des virus VHC et CrPV par un mécanisme coiffe-indépendant non canonique (Majzoub et al., 2014). En condition de stress comme une infection virale, la cellule se défend en réprimant la traduction coiffe-dépendante et en autorisant la traduction coiffe-indépendante utilisée par les virus pour contourner la machinerie traductionnelle canonique et produire les protéines virales avec un minimum de protéines cellulaires (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). En effet, le génome viral de nombreux virus tels que le poliovirus (PV), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), le virus de l'hépatite C (VHC) ou le virus de la paralysie du cricket (CrPV), est traduit avec l'aide d'éléments structuraux spécifiques appelés Internal Ribosomal Entry Site (IRES) qui sont localisés dans la région 5' UTR du génome et permettent de recruter le ribosome sur l'ARN viral. Depuis sa découverte, la régulation de la traduction IRES-dépendante a été considérée comme une étape critique de l'infection virale, avec des effets importants sur la virulence, le tropisme tissulaire et la pathogénicité (Komar and Hatzoglou, 2015).

i. Définition de la traduction IRES-dépendante

Les IRES sont des séquences régulatrices de taille variable allant de 200 nucléotides chez les insectes à 450 nucléotides chez les picornavirus qui sont localisées à l'extrémité 5' de certains ARN. Les IRES sont des régions fortement structurées dont les structures secondaires et tertiaires sont complexes, comportant des tiges-boucles et des pseudo-nœuds qui permettent de recruter le ribosome. En effet, les IRES ont été premièrement décrits comme

une « piste d'atterrissage » pour le ribosome (Pelletier and Sonenberg, 1988). De multiples interactions ARN-ARN et/ou ARN-protéines permettent de recruter le ribosome directement sur l'ARN pour initier la traduction sans la coiffe (Filbin and Kieft, 2009; Yang and Wang, 2019).

Les premiers IRES ont été identifiés chez les *Picornaviridae* comme PV (Pelletier and Sonenberg, 1988) et EMCV (Jang et al., 1988). En plus des virus à ARN, les IRES ont été découverts dans le génome d'autres virus comme les rétrovirus (Berlioz and Darlix, 1995), les virus à ADN (Kang et al., 2013) et dans des ARNm cellulaires (Coldwell et al., 2000; Cho et al., 2007). De nombreux IRES ont été identifiés chez des virus pathogènes comme le VHC (Tsukiyama-Kohara et al., 1992), le VIH (Buck et al., 2001) et le virus pied-main-bouche (FMDV) (Belsham and Brangwyn, 1990). Tous ces IRES sont de séquences différentes mais possèdent des structures secondaires similaires et peuvent initier la traduction en utilisant les mêmes mécanismes moléculaires. Contrairement à la plupart des ARNm cellulaires classiques qui ont besoin de nombreux facteurs d'initiation pour assurer la traduction des transcrits, la traduction IRES-dépendante s'affranchit d'un certain nombre de facteurs d'initiation de la traduction canonique, en adoptant des mécanismes plus simples donnant un avantage traductionnel aux virus par rapport aux ARNm cellulaires (Niepmann, 2013). Certains IRES nécessitent toutefois des facteurs canoniques d'initiation de la traduction (eIF) et des facteurs non-canoniques appelés IRES-transacting factor (ITAF). Généralement, les IRES ayant les structures les plus repliées sont ceux qui ont besoin de moins de facteurs protéiques (eIF et ITAF) pour promouvoir leur traduction (Yang and Wang, 2019). En fonction de la structure de l'IRES et du nombre de facteurs d'initiation canoniques (eIF) et non-canoniques (ITAF), les IRES ont été classés en quatre catégories allant du type I au type IV (Kieft, 2008) (Figure 16).

Les IRES de type I appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et ont été retrouvés seulement chez les *Enterovirus* et les *Rhinovirus*, par exemple PV et le rhinovirus humain de type 2 (HRV2) (Pelletier and Sonenberg, 1988; Anderson et al., 2007). L'IRES le mieux caractérisé de type I est celui de PV, qui est composé de 743 nucléotides et contient des éléments ARN qui peuvent être regroupés en six domaines distincts (I à VI) (Lee et al., 2017; Mailliot and Martin, 2018) (Figure 16A). Le domaine I est critique pour la réplication des brins positifs et négatifs d'ARN alors que les domaines II à VI sont responsables de l'activité IRES. Pour promouvoir l'initiation de la traduction de manière efficace et recruter le ribosome sur l'ARN viral, les IRES de type I ont besoin de tous les facteurs d'initiation de la traduction (eIF) à l'exception de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E. Les IRES de type I sont les seuls ayant besoin du mécanisme de balayage du ribosome afin d'initier la traduction. Le ribosome se fixe sur un site d'entrée qui se trouve sur un codon AUG localisé aux positions 586-588, puis il balaye l'ARN sur 160 nucléotides pour atteindre un second codon AUG en position 743 et ainsi initier la traduction à partir de ce point (Lozano and Martínez-Salas, 2015). L'IRES de PV contient des motifs ARN spécifiques essentiels à sa structure globale mais aussi au recrutement de facteurs canoniques et non-canoniques tels que PTB1 (Kafasla et al., 2010) et PCBP2 qui sont impliqués dans la réplication et la traduction de PV (Perera et al., 2007). Certaines interactions entre l'IRES et les eIF sont modulées par des ITAF. En effet, des ITAF peuvent contrôler l'interaction spécifique entre le domaine V de l'IRES PV et eIF4G et eIF4A (Sweeney et al., 2014; Mailliot and Martin, 2018).

Les IRES de type II ont un mécanisme d'action similaire aux IRES de type I, ils ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes. Les IRES de type II ont été identifiés dans la famille des *Picornaviridae* dans les genres *Cardiovirus* (EMCV) et *Aphthovirus* (FMDV) (Jang et al., 1988; Belsham and Brangwyn, 1990). Les deux IRES EMCV et FMDV partagent la même similarité de topologie, la même taille (439 nucléotides pour EMCV et 445 nucléotides pour FMDV), mais aussi la même organisation en cinq domaines (I à V) dont les séquences ne sont pas identiques (Lozano and Martínez-Salas, 2015) (Figure 16B). Le domaine I est requis pour la réplication virale alors que la fonction de l'IRES est déterminée par les domaines II à V (Gao, 2016). Les IRES de type II possèdent deux codons AUG mais pour EMCV seul le deuxième codon est utilisé comme codon d'initiation alors que pour FMDV les deux codons sont très proches l'un de l'autre et génèrent deux cadres de lecture ouverts (Andreev et al., 2007). Le domaine V interagit à la fois avec eIF4B, PTB1 et d'autres protéines de liaison à l'ARN (López De Quinto et al., 2001; Kafasla et al., 2010).

Comme les IRES de type I, les IRES de type II possèdent un large domaine central et une jonction à quatre voies qui est similaire à la structure de l'ARNt et constitue le noyau de l'IRES. Les deux types d'IRES ont besoin de la Met-ARNt^{Met} et des mêmes eIF que pour l'initiation de la traduction canonique coiffe-dépendante à l'exception d'eIF4E ce qui permet aux picornavirus de promouvoir la traduction des ARN au détriment des ARNm cellulaires. Ils utilisent une forme clivée d'eIF4G dont un domaine se lie directement et spécifiquement à l'IRES au niveau d'une région adjacente au codon d'initiation ce qui permet de recruter eIF4A et promeut la liaison du complexe 43S à l'IRES (Lamphear et al., 1995; Lee et al., 2017). eIF4G est clivée pendant l'infection par la protéase 2A^{Pro} codée par l'ARN viral pour PV, alors que FMDV et EMCV expriment les protéases 3C^{Pro} et L^{Pro} respectivement. (Lamphear et al., 1995; Lloyd, 2006). La différence majeure entre les deux groupes est l'étape de balayage de l'ARN viral pour initier la traduction sur le deuxième codon AUG qui est nécessaire aux IRES de type I mais pas aux IRES de type II.

Les IRES de type III ont été identifiés dans la famille des *Flaviviridae* comme le VHC (Tsukiyama-Kohara et al., 1992) ou la peste porcine classique (CSFV), et sont aussi décrits chez certains membres des *Picornaviridae* comme l'entérovirus porcin 8 (PEV) ou le virus simien 2 (Belsham, 2009). La plupart des connaissances sur les IRES de type III ont été obtenues en étudiant le VHC c'est pour cela que cette classe d'IRES est aussi appelée IRES de type VHC. Au contraire des IRES de picornavirus de type I et II, les IRES de type III sont plus courts et forment une structure plus compacte (Figure 16C). Ils contiennent trois domaines (I à III) et un quatrième domaine (IV) pour l'IRES du VHC. Les domaines I et II sont impliqués dans la réplication virale alors que les domaines II à IV portent l'activité de l'IRES (Khawaja et al., 2015). L'IRES interagit directement avec la petite sous-unité 40S grâce à sa structure et recrute le ribosome sur le codon AUG en utilisant un nombre limité de facteurs d'initiation (eIF2, eIF3 et eIF5) ainsi que la Met-ARNt^{Met} pour initier la traduction (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Pestova et al., 1998).

Le dernier type d'IRES caractérisé est le système le plus simple jamais décrit, il s'agit du type IV. Les IRES de type IV appartiennent à la famille des *Dicistroviridae* et sont situés dans la région intergénique (IGR) entre deux cadres de lecture ouverts (Kerr and Jan, 2016). Ils ont été

originellement identifiés chez CrPV (Jan and Sarnow, 2002) qui est l'IRES de type IV le mieux connu à ce jour. L'IRES de CrPV_{IGR} est constitué d'une structure compacte de trois pseudo-nœuds (PKI à PKIII) et de nombreuses tiges-boucles qui interagissent directement avec la petite sous-unité 40S (Figure 16D). Les deux premiers domaines sont nécessaires pour la liaison efficace au ribosome avec les sous-unités 40S et 60S alors que le domaine PKI peut se replier de façon indépendante et est dispensable pour la liaison au ribosome mais est nécessaire à l'initiation de la traduction après la formation du complexe mature 80S (Spahn et al., 2004b; Lee et al., 2017; Mailliot and Martin, 2018). Les IRES de type IV ont un mécanisme d'action unique, ils peuvent se lier au ribosome en cours d'élongation en l'absence de tout facteur d'initiation y compris sans le complexe ternaire eIF2-Met-ARNT_i^{Met}-GTP, et initier la traduction de façon méthionine indépendante en utilisant un ARNT^{Ala} à la place d'un ARNT_i^{Met} (Niepmann, 2009; Wilson et al., 2000). Le domaine PKI mime la structure d'un duplex codon-anticodon entre l'ARNm et l'ARNT qui peut être chargé dans le site A du ribosome sans le complexe Met-ARNT_i^{Met} (Spahn et al., 2004b). Le facteur d'élongation eEF1A se lie à l'ARNT^{Ala} dans le site A et induit une pseudo-translocation pour que le ribosome soit dans un état compétent afin de continuer l'élongation (Fernández et al., 2014). Il est possible que la boucle 3 du domaine PKI participe au changement conformationnel de l'IRES pour faciliter l'étape de translocation (Ruehle et al., 2015).

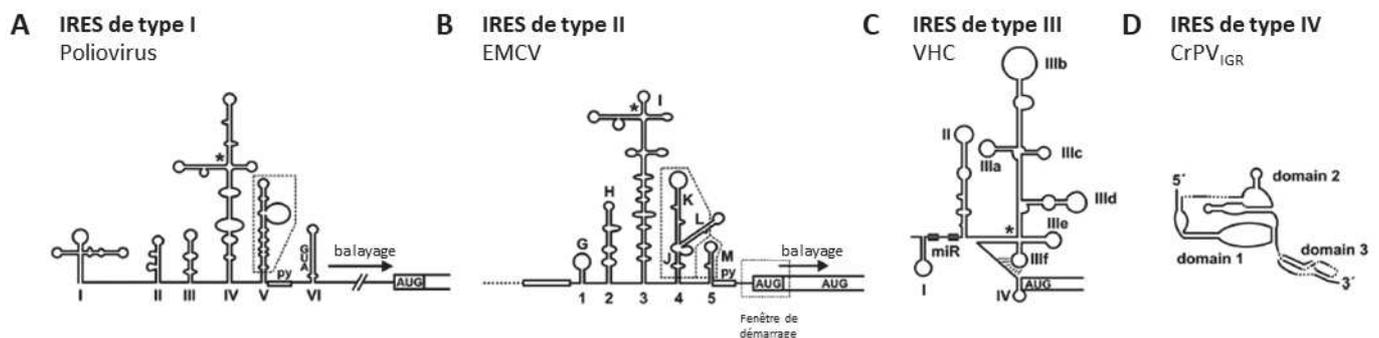


Figure 16. Structure des IRES de type I à IV.

Les quatre types d'IRES présentés sont respectivement PV (A), EMCV (B), VHC (C) et CrPV_{IGR} (D). Les différents domaines structuraux sont indiqués en chiffre romain pour EMCV (A) et VHC (C) et en chiffres arabes pour EMCV (B) et CrPV (D). Les domaines de liaison aux facteurs d'initiation sont indiqués par des lignes en pointillés. Les jonctions à quatre voies dans les domaines centraux sont marquées par des astérisques. Les éléments d'oligopyrimidines (py) sont indiqués par des rectangles. Dans l'IRES du VHC (C) les sites cibles spécifiques du miR122 (miR) sont indiqués par des rectangles noirs. Figure adaptée de Niepmann, *Biochemica et Biophysica Acta*, 2009.

Les IRES ont aussi été identifiés chez les ARNm cellulaires mais leur structure est moins bien caractérisée que celle des IRES viraux. Sous certaines conditions de stress (apoptose, stress, choc thermique, hypoxie, infection), la machinerie cellulaire est perturbée provoquant un arrêt brutal de la synthèse de la majorité des protéines. Cependant, certains gènes échappent à cette inhibition et sont capables d'utiliser la traduction IRES-dépendante pour maintenir l'expression de protéines impliquées dans des voies biologiques en réponse au

stress ou à l'infection. Les IRES cellulaires sont alors utilisés comme voie de secours pour la traduction de certains ARNm clés. En effet, le premier IRES cellulaire a été identifié en 1991 dans la région 5'UTR de l'ARN de BiP, une protéine impliquée dans la réponse au choc thermique (Macejak and Sarnow, 1991). A ce jour il est estimé qu'environ 10% des ARNm des mammifères contiennent des éléments qui fonctionnent comme des IRES (Landry et al., 2009; Weingarten-Gabbay et al., 2016) et qui sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires : expression génique (c-Jun, YAP1, La), réponse au stress (c-myc, Apaf-1, cat-1), cycle cellulaire (VEGF-A, p58, CDK inhibitor 27) (Pérard et al., 2010). Ceci implique que la traduction coiffe-indépendante induite par l'IRES peut jouer un rôle important dans des conditions de stress cellulaire.

Actuellement le rôle de RACK1 dans la traduction des ARNm cellulaires médiée par les IRES n'a pas encore été décrit dans la littérature mais son rôle dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux a été identifié par notre laboratoire (Majzoub et al., 2014).

ii. RACK1 est un facteur d'hôte nécessaire à la traduction IRES-dépendante

Ces dernières années, RACK1 a été identifiée comme un ITAF, un facteur d'hôte nécessaire à la traduction IRES-dépendante des virus VHC et CrPV (Majzoub et al., 2014). Chez la drosophile, il a été montré que RACK1 est nécessaire à la traduction et en conséquence à la réplication du virus de la drosophile C (DCV) et de CrPV appartenant à la famille des *Dicistroviridae* ; et que la déplétion de RACK1 n'impacte ni la viabilité, ni la prolifération des cellules mais diminue la charge virale de DCV et CrPV. Dans le cas de l'IRES CrPV_{5'} qui se comporte comme un IRES de type III contrairement à l'IRES CrPV_{IGR}, le silencing de RACK1 induit une baisse de la réplication qui peut être restaurée par RACK1 sauvage mais pas par les mutants D108Y (Kuroha et al., 2010) et R38D,K40E (Coyle et al., 2009) qui empêchent la liaison de RACK1 au ribosome. A l'inverse, le silencing de RACK1 lors de l'infection par le FHV (flock house virus), ou le VSV (virus de la stomatite vésiculaire), deux virus utilisant un mécanisme de traduction coiffe-dépendant, n'impacte pas la production virale (Mailliot and Martin, 2018). De la même manière, chez l'Homme, le silencing de RACK1 dans des cellules d'hépatocarcinomes humains Huh7.5.1 induit une diminution de l'infection par le VHC et de la production de virions. Ces résultats suggèrent que RACK1 ribosomique est nécessaire à la réplication du virus et intervient dans le mécanisme d'initiation de la traduction IRES-dépendante des virus VHC, DCV et CrPV.

Par spectrométrie de masse, RACK1 a été identifiée au sein du complexe formé par le facteur d'initiation eIF3 et l'IRES du VHC qui est associé à la petite sous-unité du ribosome 40S (Kieft et al., 2001; Yu et al., 2005). Bien qu'il n'y ait pas de liaison directe entre RACK1 et l'IRES du VHC (Figure 17A), il a été identifié qu'un domaine périphérique d'eIF3, qui est nécessaire à la traduction IRES-dépendante du VHC (Kieft, 2008) est en contact avec RACK1 (Hashem et al., 2013; Sun et al., 2013) (Figure 17B). Cela suppose que ce domaine pourrait être le lien fonctionnel entre RACK1 et la traduction IRES-dépendante. Plusieurs sous-unités d'eIF3 ne sont pas directement impliquées dans la liaison de l'IRES avec le ribosome mais sont critiques

pour initier la traduction de façon efficace, comme par exemple eIF3j. En effet, la sous-unité eIF3j n'est pas nécessaire pour la viabilité des hépatocytes mais est indispensable à la réplication du VHC médiée par l'IRES, il en est de même pour l'activité de l'IRES de CrPV_{5'} chez la drosophile (Majzoub et al., 2014). eIF3j régule l'accès des transcrits au niveau du tunnel de l'ARNm, et doit être enlevé pour permettre au codon AUG de l'IRES de se placer dans le site P du ribosome (Fraser et al., 2009). Ce mouvement est conforté par le fait que la sous-unité se trouve en périphérie du complexe eIF3 facilitant sa dissociation (Sha et al., 2009). De plus, son activité peut être régulée post-traductionnellement par phosphorylation (Sha et al., 2009). RACK1 pourrait agir en tant que protéine de support pour recruter des enzymes modifiant eIF3j dans le but de permettre l'accès de l'ARNm contenant l'IRES au tunnel d'entrée de la sous-unité 40S (Majzoub et al., 2014). De plus, une étude récente a décrit que l'association de RACK1 avec la PKC β II permet de phosphoryler les facteurs d'initiation eIF4G1 et eIF3a et de moduler la traduction coiffe-indépendante des entérovirus contenant un IRES de type I (Dobrikov et al., 2018b). Au cours de ma thèse une autre étude a montré que la perte d'expression de RACK1 entraîne un défaut de traduction IRES-dépendante des virus PV et EMCV qui contiennent respectivement des IRES de type I et II (LaFontaine et al., 2020). Au regard de ces études, il semble que RACK1 puisse réguler la traduction coiffe-indépendante de virus contenant différents types d'IRES (I, II et III). Cependant les mécanismes moléculaires par lesquels RACK1 contrôle l'initiation de la traduction IRES-dépendante ne sont pas encore tous dévoilés à ce jour. Au regard de la proximité de RACK1 avec le tunnel d'entrée de l'ARNm et de son interaction avec plusieurs facteurs d'initiation (Nielsen et al., 2017; Dobrikov et al., 2018b), RACK1 pourrait réguler la traduction de différents types d'IRES dont l'initiation nécessiterait le recrutement de facteurs canoniques. Cependant le rôle ribosomique de RACK1 n'a pas été élucidé dans la traduction virale, peu d'études ont spécifiquement étudié le rôle de l'association de RACK1 au ribosome dans la traduction, il est possible que RACK1 puisse réguler la réplication virale via d'autres mécanismes dépendant de sa fonction de signalisation. De plus, le rôle de RACK1 dans la régulation de la traduction coiffe-dépendante et -indépendante des virus n'est pas clairement établie. Si quelques études ont montré que RACK1 régule la traduction IRES-dépendante de PV, EMCV, et du VHC (LaFontaine et al., 2020; Majzoub et al., 2014), une autre étude a montré que RACK1 peut réguler la traduction coiffe-dépendante de virus ADN contenant une région 5'-poly(A)-leader. En effet, une kinase de poxvirus phosphoryle les résidus sérines/thréonines au sein de la boucle knob de RACK1, transformant l'activité des ribosomes pour permettre la traduction spécifique des ARNm viraux contenant des 5'poly(A)-leaders (Jha et al., 2017).

En plus de son rôle dans la traduction des ARN viraux, RACK1 peut interagir directement des protéines virales pour réguler l'infection. Bien que les mécanismes d'action de RACK1 dans l'infection ne soient pas encore clairement établis, il a été identifié que RACK1 est impliquée dans la réplication virale à différents niveaux, que ce soit en régulant des fonctions physiologiques comme l'apoptose ou l'autophagie.

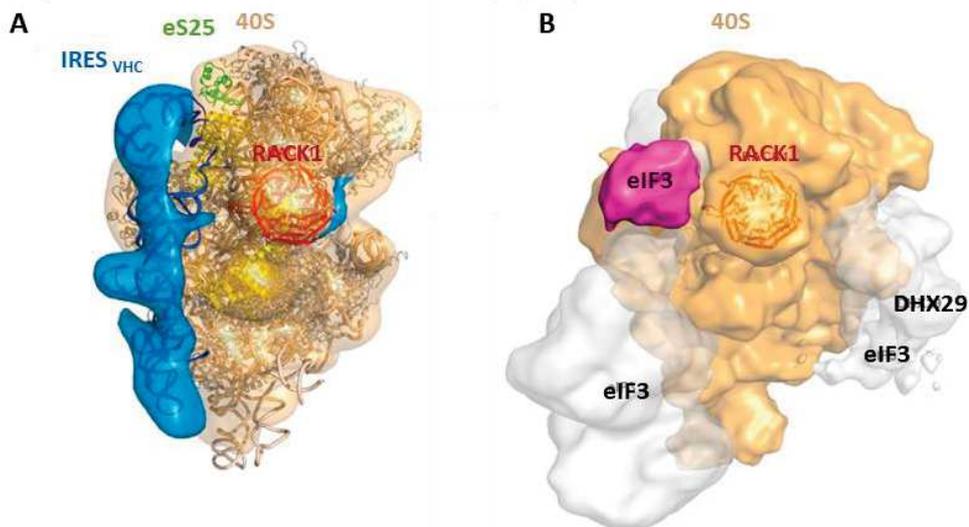


Figure 17. La position de RACK1 dans la sous-unité 40S peut être liée au rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante du VHC.

(A) Structure en cryo-EM de l'IRES du VHC associé à la petite sous-unité 40S à une résolution de 20Å (Spahn et al., 2001). RACK1 est représentée en rouge, les densités de la sous-unité 40S et de l'IRES VHC sont en brun et en bleu respectivement. Les protéines ribosomiques à proximité de l'IRES sont colorées en jaune (eS17, uS10, eS26, uS11, eS28) et en vert (uS25). (B) Structure en cryo-EM du complexe d'initiation 43S à une résolution de 11,6Å (Hashem et al., 2013). La densité de la sous-unité 40S est en brun, RACK1 est en rouge. Le domaine périphérique d'eIF3 en contact avec RACK1 est en violet. Les densités du domaine central d'eIF3, du facteur DHX29 et du second domaine périphérique d'eIF3 en contact avec DHX29 sont colorés en gris. Figure adaptée de Majzoub et al., Cell, 2014.

2. RACK1 est un facteur d'hôte impliqué dans la réplication virale

Lors des premières études s'intéressant au rôle de RACK1 dans un contexte viral, il a été identifié que RACK1 était capable d'interagir avec des protéines virales et par conséquent avait un rôle dans l'infection virale. Dans le cadre du virus influenza A, RACK1 se lie à la protéine de la matrice M1 et module sa phosphorylation (Reinhardt and Wolff, 2000) ce qui indique un rôle de RACK1 dans le bourgeonnement des particules virales (Demirov et al., 2012). L'interaction entre la protéine virale M1 et RACK1 est fortement conservée dans les différentes branches évolutives d'origines humaines, porcines et aviaires (Reinhardt and Wolff, 2000) suggérant que le rôle de RACK1 dans la libération du virus est dépendant de sa liaison à M1 (Demirov et al., 2012). Par la suite, RACK1 a été identifiée dans les interactomes des protéines virales NS5A du virus de la peste porcine (Zhang et al., 2014) et NS1 du virus de la Dengue (Hafirassou et al., 2017) par analyse double-hybride chez la levure, et par analyse protéomique en spectrométrie de masse. De plus, un criblage à haut débit siARN de l'interactome de NS1 a permis d'identifier RACK1 comme un facteur nécessaire à la réplication du virus de la Dengue (Hafirassou et al., 2017). RACK1 participe aussi à la réplication du virus du Nil occidental et du virus Zika, deux autres membres des Flavivirus (Hafirassou et al., 2017). D'un point de vue mécanistique l'interaction de RACK1 avec des protéines virales permet au virus de détourner RACK1 de ses fonctions cellulaires initiales au profit du virus et ainsi d'améliorer sa réplication.

RACK1 étant impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, il a été observé que RACK1 régule la réplication virale via différents mécanismes tels que l'apoptose, l'activation de la voie NF- κ B, l'activité de la PKC et l'autophagie. Ainsi, suite à l'infection par le virus de la bursite infectieuse (IBDV), la protéine virale VP5 interagit avec VDAC2 (voltage-dependent anion-selective channel protein 2) et RACK1 afin de former un complexe qui inhibe l'apoptose. Le virus détourne ainsi à son avantage le rôle anti-apoptotique de RACK1 pour favoriser la réplication virale dans les cellules hôtes (Lin et al., 2015). RACK1 s'associe également avec la protéine virale VP5 de MuV responsable des oreillons ce qui résulte en une inhibition de l'apoptose et une augmentation de la réplication virale (Kubota et al., 2002).

Il a été identifié que RACK1 est un régulateur positif de la voie de signalisation NF- κ B suite à l'infection par le virus PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) (Bi et al., 2018; Liu et al., 2019). Plusieurs études ont montré que l'infection par le PRRSV pouvait activer la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules Marc-145 (Fu et al., 2012; Luo et al., 2011). Les protéines virales activatrices de NF- κ B sont les protéines nucléocapside (N) (Luo et al., 2011), et NSP2 (Fang et al., 2012). Cependant, il existe des données controversées sur les interactions entre le PRRSV et la voie NF- κ B. Certaines études ont montré que les protéines NSP2 et NSP1a peuvent inhiber la signalisation de la voie NF- κ B en interférant avec le processus de poly-ubiquitination d'I κ B α (Luo et al., 2008; Sun et al., 2010). PRRSV a développé différentes stratégies pour activer ou inhiber NF- κ B pour son propre bénéfice à différentes étapes de son cycle de vie. Dans des cellules Marc-145, il a été montré que l'infection par le PRRSV induit la phosphorylation d'I κ B α et p65 conduisant à l'activation de la voie NF- κ B et que la surexpression de RACK1 induite par l'infection participe à cette activation. De plus, il a été identifié que la déplétion de RACK1 par siARN induit une baisse de la réplication du virus et de la charge virale mais ces observations ne semblent pas être dues à la désactivation de la voie NF- κ B mais à un mécanisme indépendant qui n'est pas élucidé à ce jour (Bi et al., 2018). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude, où la surexpression de RACK1 dans les cellules Marc-145 améliore la réplication de PRRSV et promeut l'activation de NF- κ B en régulant à la hausse l'expression de TRAF2 et sa phosphorylation (Liu et al., 2019).

L'activité adaptatrice de la PKC de RACK1 est impliquée dans le maintien de la charge virale du VIH (Gallina et al., 2001). Pendant l'infection par le VIH, RACK1 se lie à la protéine kinase Nef au niveau des membranes plasmiques et augmente la phosphorylation de Nef via l'activité de la PKC. La régulation de l'activité de Nef par RACK1 permet d'augmenter le pouvoir infectieux du virion. RACK1 contrôle au niveau post-traductionnel la phosphorylation de la protéine BZLF1 qui active la réplication du virus Epstein-Barr (EBV) et joue le rôle de protéine de support dans la régulation de la phosphorylation et permet de maintenir la balance entre la réplication latente et lytique (Baumann et al., 2000; Smith et al., 2000).

Dans le cadre de l'infection par le virus du VHC, RACK1 promeut la réplication virale en participant à l'activation de l'autophagie (Lee et al., 2019). Le VHC est un virus à ARN qui se réplique dans des organelles composées principalement de vésicules à double membranes (DMV) qui sont morphologiquement similaires aux autophagosomes (Romero-Brey et al., 2015). Pour contrecarrer le mécanisme de défense contre certaines infections virales, le virus utilise l'autophagie, qui est un composant du système immunitaire contre l'infection, pour sa

propre réplication (Shrivastava et al., 2011). La protéine virale non structurale NS5A interagit avec Vps34 et Beclin1 directement ou indirectement, et avec ATG14L de façon RACK1-dépendante. Ces interactions facilitent la formation du complexe de nucléation vésiculaire ATG14L-Becin1-Vps34-Vps15 en rapprochant les complexes Beclin1-ATG14L et Vps34-Vps15 (Lee et al., 2019). RACK1 favorise ainsi la formation du complexe ATG14L-Becin1-Vps34-Vps15 dans des conditions de privation de nutriments (Zhao et al., 2015). RACK1 est dans ce cas un facteur essentiel à l'infection permettant à NS5A de déclencher la formation des DMV en s'associant avec les composants du complexe de nucléation vésiculaire et permettre la réplication du VHC (Lee et al., 2019). De plus, certaines protéines de l'autophagie comme Beclin-1, Atg4B, Atg5 et At12 sont des facteurs proviraux nécessaires à la traduction de l'ARN entrant du VHC au moment de l'infection pour permettre d'initier la réplication du VHC mais ne sont pas requis une fois l'infection établie (Dreux et al., 2009).

B. Inflammation et cancer

Via son interaction avec de nombreux partenaires protéiques, RACK1 peut être impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et notamment celles régulant l'inflammation et ainsi établir un état inflammatoire favorable au développement de cancers (Xie et al., 2019).

RACK1 a également été décrit comme contribuant à la progression et la survie des cellules cancéreuses ainsi qu'à la résistance aux traitements de chimiothérapie (Ruan et al., 2012).

1. *RACK1 régule de nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'inflammation*

i. Régulation de la réponse immunitaire innée

Lors d'une infection virale mais aussi dans le cancer, la première voie de signalisation activée est la réponse immunitaire innée qui conduit à la production d'IFN. En réponse à une exposition chronique, les mécanismes de régulation de l'immunité innée peuvent favoriser la persistance des agents pathogènes ainsi que faciliter la progression tumorale (Snell et al., 2017). Il a été identifié que RACK1 est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire innée médiée par la voie RIG-I/MAVS (Xie et al., 2019). Suite à une infection virale, la protéine RIG-I (retinoic acid-inductible gene I) reconnaît le double brin d'ARN viral ce qui module le récepteur RIG-I dans sa conformation active. Le récepteur actif interagit avec MAVS (mitochondrial antiviral signaling) pour activer la réponse antivirale innée et notamment la production de l'interféron de type I (Kell and Gale, 2015). MAVS recrute les facteurs TRAF2/3/5/6 (tumor necrosis factor receptor-associated factors) via ses motifs de liaison à TRAF pour former les complexes MAVS-TRAF (Saha et al., 2006; Liu et al., 2013). Le complexe recrute les protéines TBK1 (TANK-binding kinase 1), IKK γ et IKK ϵ pour phosphoryler IRF3

(interferon regulatory factor 3) et IRF7 qui se transloquent dans le noyau pour activer les promoteurs de l'IFN- α et de l'IFN- β (Chan and Gack, 2015; Saha et al., 2006).

Il a été décrit que suite à l'infection par le virus de la fièvre épidémique bovine (BEFV) où l'expression de RACK1 est régulée à la hausse, RACK1 induit une surexpression de STUB1 (E3 ubiquitine ligase STIP1 homology and U-box containing protein 1) et augmente l'interaction entre STUB1 et MAVS ce qui promeut l'ubiquitinylation et la dégradation de MAVS par le protéasome. La dégradation de MAVS réduit les phosphorylations de TBK1 et d'IRF3 ce qui inhibe l'expression de l'IFN- β et la production d'IGS (interferon-stimulated genes) et ainsi augmente le pouvoir répliatif du virus (Zhang et al., 2021) (Figure 18B).

Dans une autre étude, lors de l'infection par le virus Sendai, il a été décrit que RACK1 empêche la formation des complexes MAVS-TRAF2, MAVS-TRAF3 et MAVS-TRAF6 (Xie et al., 2019). De plus, la surexpression de RACK1 inhibe la dimérisation d'IRF3 médiée par RIG-I, MAVS et TBK1 (Xie et al., 2019). En effet, RACK1 recrute la protéine PP2A pour déphosphoryler IRF3 ce qui empêche son activation et entraîne l'inhibition de la réponse inflammatoire innée de l'IFN de type I (Long et al., 2014) (Figure 18A). La baisse d'expression de l'IFN- β induit par la dégradation du complexe MAVS-TRAF conduit à une baisse de l'activité transcriptionnelle des promoteurs contenant un ISRE (interferon-stimulated response element) (Xie et al., 2019).

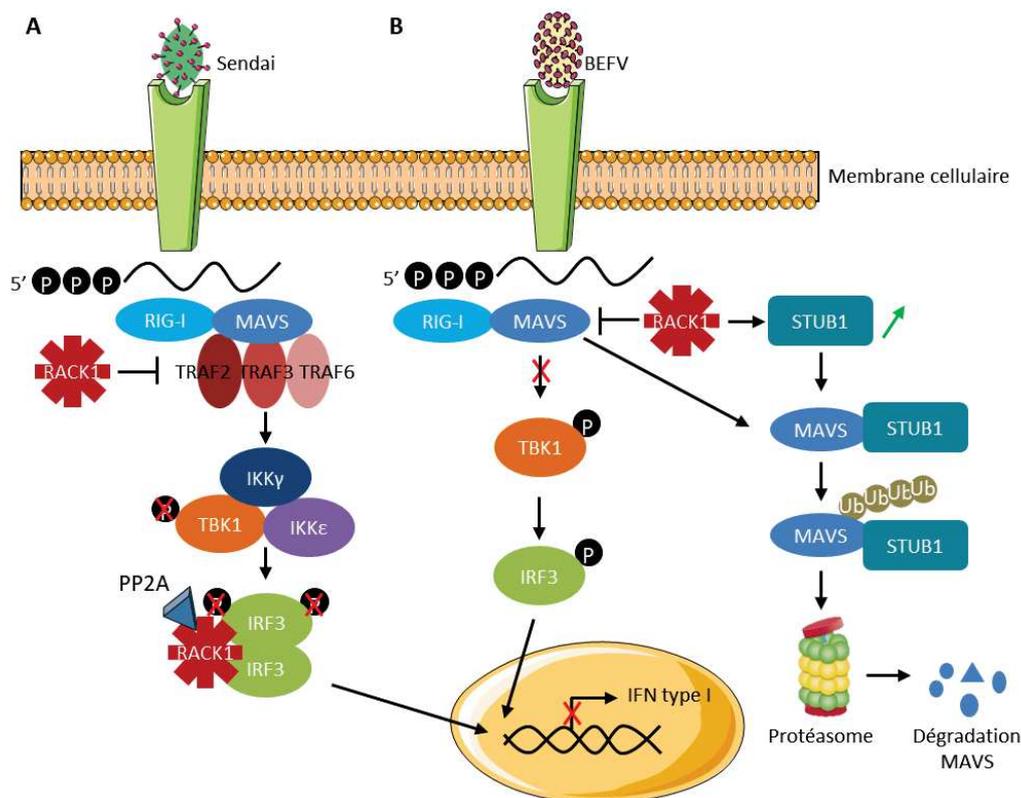


Figure 18. RACK1 atténue la réponse inflammatoire innée induite par l'activation de RIG-I.

(A) Suite à une infection par le virus Sendai, RACK1 empêche la formation du complexe MAVS-TRAF2/TRAF3/TRAF6, recrute la phosphatase PP2A qui déphosphoryle IRF3 et inhibe la dimérisation d'IRF3. (B) Suite à une infection par le virus BEFV, RACK1 augmente l'expression de l'ubiquitine ligase E3 STUB1, favorise l'association entre MAVS et STRUB1 ce qui entraîne la dégradation de MAVS par le protéasome et réduit l'activité de TBK1. Dans les deux types d'infections, l'activité de RACK1 entraîne une inhibition de l'expression de l'IFN de type I. Figure adaptée de Zhang et al., *Veterinary Microbiol.*, 2021.

RACK1 joue un rôle d'inhibiteur des voies de réponses pro-inflammatoires ce qui favorise les infections virales, mais peut aussi diminuer l'activation des défenses immunitaires dans d'autres contextes comme le cancer.

ii. Régulation de la réponse à l'interféron de type I

Des études ont montré un rôle direct de RACK1 dans la voie de signalisation de l'interféron de type I. L'IFN de type I active JAK (Janus tyrosine kinase) et STAT (signal transducer and activator of transcription) via son interaction avec des récepteurs spécifiques pour induire la production d'ISG. L'association de STAT1 avec le récepteur de l'IFN- $\alpha\beta$ est nécessaire pour la signalisation de l'IFN de type I, elle n'est pas directe mais médiée par RACK1 (Usacheva et al., 2001). RACK1 interagit avec la sous-unité longue β du récepteur IFN $\alpha\beta$ L et forme un complexe avec STAT1, Jak1 et Tyk2 (tyrosine kinase 2) (Haro et al., 2004). L'activation de Jak induit la phosphorylation du résidu Try194 de RACK1 ce qui transloque la protéine dans la région périnucléaire (Haro et al., 2004).

Dans des lignées de lymphocytes B, une mutation dans le site de liaison de RACK1 au récepteur IFN $\alpha\beta$ L induit une forte baisse de la phosphorylation de STAT1 et de STAT2 ce qui inhibe la réponse inflammatoire stimulée par l'IFN- α (Usacheva et al., 2001) (Figure 19A).

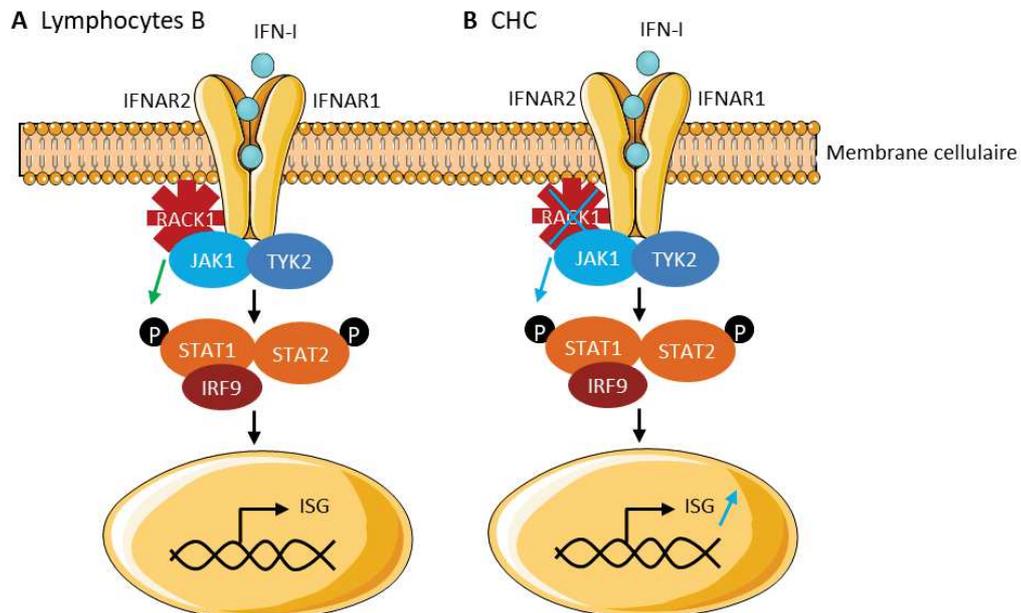


Figure 19. RACK1 régule la réponse inflammatoire de la voie de l'IFN de type I.

RACK1 s'associe le récepteur de l'IFN- α pour réguler la phosphorylation de STAT1 de manière positive ou négative en fonction du type cellulaire. (A) Dans des lignées de lymphocytes B, RACK1 active la réponse inflammatoire en phosphorylant STAT1 (flèche verte), (B) alors que dans les cellules Huh7, le silencing de RACK1 induit une augmentation de la phosphorylation de STAT1 (flèche bleue) en réponse à la stimulation par IFN- α .

Cependant, le rôle de RACK1 au sein d'une même voie de signalisation peut être opposé en fonction du type cellulaire étudié. Dans des données non publiées de notre laboratoire, il a été observé que la stimulation par l'IFN- α dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (Huh7) induit une phosphorylation de STAT1 plus forte et plus prolongée lorsque l'expression de RACK1 est éteinte, et que le knock-down de RACK1 ne modifie pas l'état basal de phosphorylation en absence de traitement (Figure 19B). Nos résultats suggèrent que dans les cellules hépatiques RACK1 pourrait fonctionner comme un régulateur négatif de la voie de l'IFN et favoriser le développement tumoral.

iii. Régulation de la réponse à l'insuline

La stimulation à l'insuline induit la formation d'un complexe multiprotéique composé de RACK1, des récepteurs IR (insulin receptor), IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor) et STAT3. La région N-ter des domaines WD 1 à 4 de RACK1 interagit avec IR, IGF-1R et STAT3 (Zhang et al., 2006). STAT3 est suractivée dans de nombreux types de cancers comme les cancers ovariens, la leucémie, les lymphomes, le cancer du poumon (Bowman et al., 2000; Buettner et al., 2002). STAT3 joue un rôle central dans le développement de tumeur à la fois de façon intrinsèque mais également en modifiant le microenvironnement tumoral pour favoriser l'immunosuppression (Huynh et al., 2019). La surexpression de RACK1 induit une augmentation de la phosphorylation de STAT3 ainsi que l'augmentation de l'expression des gènes associés favorisant ainsi la croissance tumorale (Zhang et al., 2006).

iv. Régulation de la voie de signalisation NF- κ B

RACK1 est un régulateur négatif de la voie de signalisation de NF- κ B qui s'associe physiquement avec le complexe IKK de façon TNF- α dépendante ce qui inhibe le recrutement du complexe IKK à TRAF2. La formation du complexe IKK-TRAF2 est une étape critique pour la phosphorylation d'IKK et l'activation du facteur de transcription NF- κ B déclenchée par TNF- α . La forte expression de TNF- α induit une réponse inflammatoire qui conduit à l'expression de nombreuses cytokines telles que TNF- α , IL-1 β , CXCL1 et CXCL2 via l'activation de NF- κ B. La stimulation de macrophages primaires péritonéaux de souris par TNF- α induit une augmentation de la production de TNF- α et CXCL1 lorsque l'expression de RACK1 est éteinte par transfection. Ces résultats indiquent que RACK1 contrôle négativement la réponse inflammatoire induite par la stimulation de TNF- α en régulant l'activation du complexe IKK (Yao et al., 2014) (Figure 20).

Il a été décrit récemment que RACK1 régule la voie NF- κ B et le devenir du cancer gastrique suite à l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), qui est un facteur majeur responsable du cancer gastrique (Malfertheiner et al., 2017). Une étude a montré que l'expression de RACK1 est diminuée suite à l'infection par *H. pylori in vivo*, par comparaison de tissus tumoraux et adjacents provenant de patients atteints de cancer gastrique. L'observation a été reproduite *in vitro* dans des cellules d'épithélium gastrique GES-1 cultivées

en présence d'une souche d'*H. pylori*. De plus, la baisse d'expression de RACK1 induit la surexpression de l'intégrine β -1 accompagnée de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B suivie par le relargage de cytokines pro-inflammatoires qui favorisent la progression de l'inflammation induite par l'infection vers la carcinogenèse (Hu et al., 2019).

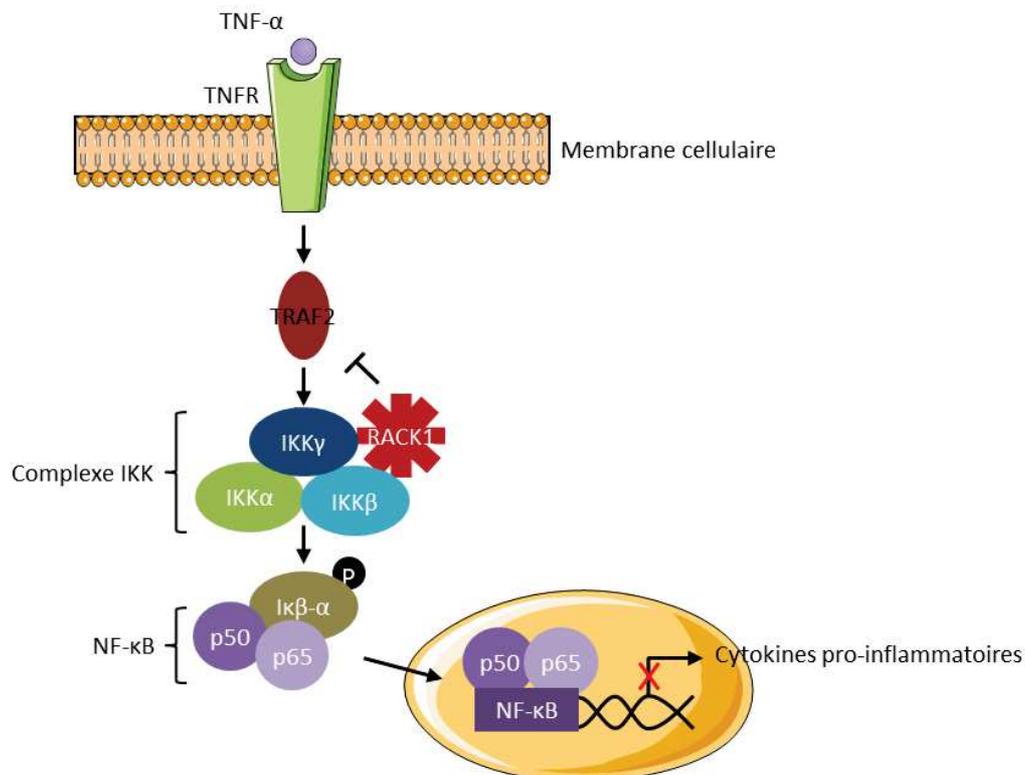


Figure 20. RACK1 est un régulateur négatif de la voie NF- κ B.

RACK1 s'associe physiquement avec le complexe IKK de façon TNF- α dépendante ce qui inhibe le recrutement du complexe à TRAF2 et induit une baisse de l'activation de NF- κ B et de la production de cytokines pro-inflammatoires.

v. Régulation de la signalisation de JNK/c-Jun

RACK1 a également été identifiée comme une protéine régulatrice de la voie ERK/JNK/c-Jun qui est activée dans un grand nombre de cancers (López-Bergami et al., 2007; Sato et al., 2015). En réponse à certains stimuli, la cascade de signalisation des MAPK est activée, les kinases MKK4 et MKK7 induisent la phosphorylation des résidus Thr183 et Tyr185 de JNK (López-Bergami et al., 2007). L'un des substrats clé de JNK est le facteur de transcription c-Jun dont la phosphorylation par JNK induit la formation du complexe c-Jun et c-Fos qui va activer des gènes contrôlant le cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Dans les mélanomes la suractivation de la voie ERK induit une augmentation de la stabilité de c-Jun ce qui conduit à la transcription de RACK1 dont le promoteur contient un élément de réponse à c-Jun. De plus, le degré d'activation de JNK peut être augmenté par RACK1 via le recrutement de la PKC activée qui phosphoryle le résidu Ser129 de JNK (López-Bergami et al., 2005) ce qui active c-Jun et ses cibles transcriptionnelles en aval, y compris la cycline D1 qui est surexprimée dans les mélanomes (López-Bergami et

al., 2007). RACK1 est alors impliquée dans une boucle de régulation positive de JNK par le contrôle de sa phosphorylation (Figure 21B).

L'un des autres substrats du complexe c-Jun-c-Fos est le gène permettant l'expression de la protéine TRIM45 (tripartite motif-containing) qui appartient à la famille des ubiquitines ligases. L'expression de TRIM45 est induite par des stimuli extracellulaires qui activent la voie de signalisation des MAPK. TRIM45 interagit avec RACK1 et empêche la formation du complexe RACK1-PKC. L'interaction de TRIM45 avec RACK1 forme une boucle de rétroaction négative de l'activation de JNK par RACK1 (Sato et al., 2015).

RACK1 régule aussi la stabilité du facteur de transcription c-Jun. Trois ubiquitines ligases dont Fbw7 (F-box and WD repeat domain-containing 7) sont importantes dans la dégradation de c-Jun. En absence de RACK1, Fbw7 forme un homodimère qui reconnaît les formes phosphorylées et non-phosphorylées de c-Jun et conduit à l'ubiquitinylation de c-Jun par Fbw7 et sa dégradation. En présence de RACK1, un hétérodimère se forme entre RACK1 et Fbw7 qui recrute uniquement les formes non-phosphorylées de c-Jun au complexe. RACK1 maintient la stabilité des protéines c-Jun phosphorylées par JNK ou d'autres kinases et ainsi permet l'activation des gènes régulés par le facteur de transcription c-Jun (Zhang et al., 2012) (Figure 21A). Dans le cancer et plus particulièrement le mélanome, à différents niveaux RACK1 a été décrite comme un régulateur positif de la voie ERK/JNK/c-Jun.

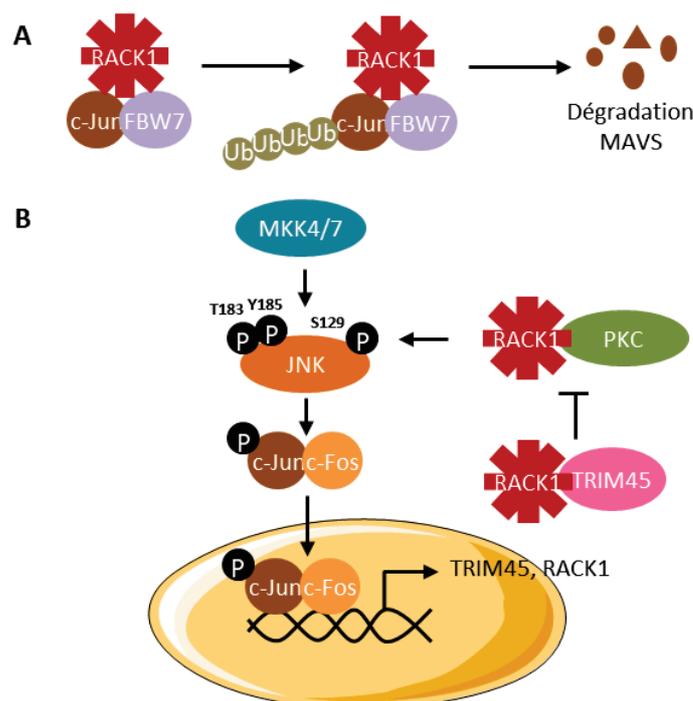


Figure 21. RACK1 est un régulateur positif de la voie JNK/c-Jun.

(A) RACK1 favorise l'interaction entre la forme non-phosphorylée de c-Jun et FBW7 qui induit l'ubiquitinylation de c-Jun et sa dégradation. (B) RACK1 interagit avec la PKC pour induire la phosphorylation du résidu Ser129 de JNK ce qui favorise sa phosphorylation par MKK4/7 et son activation. JNK activée phosphoryle le facteur de transcription AP-1 composé de l'hétérodimère c-Jun et c-Fos qui va induire l'expression de TRIM45 et RACK1. RACK1 est alors impliquée dans une boucle de régulation positive de JNK. Au contraire, la protéine TRIM45 séquestre RACK1 pour empêcher la formation du complexe RACK1-PKC formant une boucle de rétroaction négative de l'activité de JNK.

Dans notre laboratoire, dans des cellules Huh7 dérivées d'hépatocarcinomes humains où RACK1 est fortement exprimée, il a été observé que RACK1 régule négativement l'expression de la chimiokine CXCL10 via la régulation de la voie JNK (Thèse de Vincent Turon-Lagot, UMR_S1110, 2020). Dans ce cas, le silencing de RACK1 induit la surexpression et la suractivation de c-Jun, contrairement à ce qui avait déjà été observé dans des publications antérieures décrivant un effet positif de RACK1 sur la stabilité de c-Jun phosphorylée et sur l'activation de JNK (López-Bergami et al., 2005, 2007; Zhang et al., 2012). La perte d'expression de RACK1 conduit à l'activation d'une ou plusieurs voies inflammatoires menant à la surexpression de CXCL10. De plus, il a été observé une augmentation de la transcription du facteur de transcription p65 et sa relocalisation nucléaire lorsque l'expression de RACK1 est éteinte, indiquant l'activation de la voie NF- κ B. L'effet de RACK1 sur l'expression de CXCL10 pourrait alors être multifactoriel. Cette hypothèse a été confortée par l'analyse du transcriptome des cellules Huh7 où le silencing de RACK1 induit la surexpression de gènes impliqués dans la transduction du signal suite à l'activation de RIG-I ainsi que la surexpression de gènes identifiés comme des activateurs de la voie NF- κ B (Thèse de Vincent Turon-Lagot, UMR_S1110, 2020). RACK1 serait alors un régulateur négatif de la réponse inflammatoire innée de RIG-I ainsi que des voies de l'inflammation médiées par NF- κ B et c-Jun/JNK menant à une baisse d'expression de CXCL10 dans le CHC.

vi. Rôle de RACK1 dans l'inflammasome NLRP3

Un des mécanismes centraux qui contribue à l'inflammation dans les cellules immunitaires est médié par l'inflammasome qui agit comme un signal de détection de changements de l'homéostasie dans le cytoplasme. Une étude récente a identifié un rôle intrinsèque de RACK1 dans les macrophages et plus particulièrement dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Duan et al., 2020). L'inflammasome est un large complexe multiprotéique, intracellulaire qui se forme en réponse à une infection ou à de nombreux stress non infectieux et qui induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Martinon et al., 2002; Szabo and Petrasek, 2015). NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) est l'inflammasome le plus étudié à ce jour car il est activé dans de nombreuses pathologies comme les maladies auto-inflammatoires, la maladie d'Alzheimer, le diabète de type 2, la goutte et l'athérosclérose (Kelley et al., 2019; Swanson et al., 2019). L'inflammasome se forme en réponse à deux voies de signalisation distinctes. La première voie est activée par des cytokines ou par la détection de PAMP (pathogen-associated molecular patterns) par un TLR (toll-like receptor) ce qui induit l'activation de NF- κ B et l'expression de la protéine NLRP3 ainsi que des précurseurs Pro-IL-1 β et Pro-IL-18 (He et al., 2016). La deuxième voie est activée par différents stimuli comme l'ATP, des toxines, des pathogènes viraux, bactériens ou fongiques mais aussi par une altération de l'homéostasie ionique intracellulaire, un dysfonctionnement mitochondrial, ou la production de ROS (Kelley et al., 2019; Swanson et al., 2019). L'inflammasome NLRP3 est composé de 8 oligomères contenant chacun la protéine NLRP3, la Pro-caspase 1 et la protéine ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain). De nombreuses protéines additionnelles qui interagissent avec NLRP3 sont responsables de son activation et RACK1 a récemment été

identifiée comme l'une d'entre elles (Duan et al., 2020). RACK1 est un partenaire critique d'interaction avec les domaines NOD et LRR de la protéine NLRP3 et promeut la conformation active du complexe NEK7-NLRP3 ainsi que l'oligomérisation de NLRP3 dans les macrophages de façon *in vitro* et *in vivo* chez la souris et indépendamment de son activité ribosomique (Duan et al., 2020) (Figure 22). L'inflammasome NLRP3 actif induit la forme active de la Caspase-1 ainsi que la maturation et la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18 (Schroder and Tschopp, 2010). Il a été identifié que le silencing de RACK1 dans les macrophages abroge l'activation de la Caspase-1 et la libération d'IL-1 β en réponse aux stimuli d'activation de NLRP3. RACK1 est alors impliquée dans la réponse immunitaire innée en activant la conformation active de l'inflammasome NLRP3 et participe à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β dans les macrophages. Il est déjà bien établi que la sécrétion de cytokines par l'inflammasome participe à la pathogenèse du cancer. Cependant cette dernière décennie, un rôle conflictuel de l'inflammasome a émergé avec à la fois des effets antitumoraux et pro-tumoraux dépendant du type de cancer (Hamarsheh and Zeiser, 2020). Par son rôle intrinsèque dans les macrophages dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, RACK1 pourrait alors participer à la tumorigenèse du cancer.

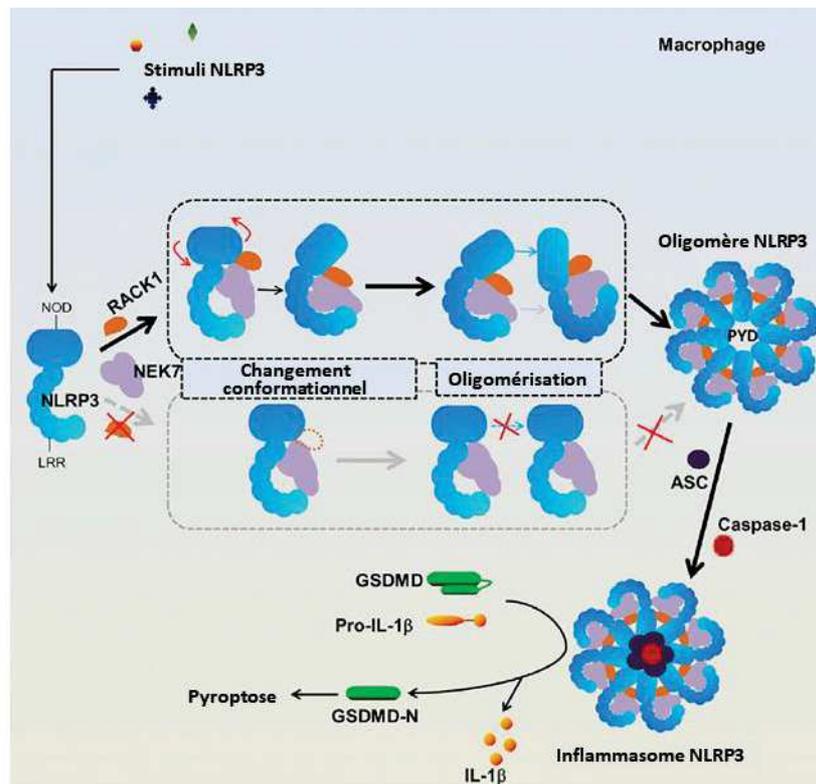


Figure 22. RACK1 est impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

RACK1 interagit avec les protéines NEK7 et NLRP3, favorise le changement conformationnel du complexe NLRP3-NEK7 pour permettre l'oligomérisation de NLRP3 et l'activation de l'inflammasome. Figure adaptée de Duan et al., Cell Reports, 2020.

En régulant de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire, nous avons vu dans les exemples précédents que RACK1 peut participer à la production et la sécrétion de cytokines qui peuvent influencer l'environnement tumoral et réguler la progression du cancer.

vii. Rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral

RACK1 a été identifiée comme un marqueur clé au développement du microenvironnement tumoral. Il a été décrit que l'expression de RACK1 était modulée en réponse aux composés de stéroïdes actifs et que via son activité d'adaptateur de la kinase PKC, RACK1 était impliquée dans l'expression et la sécrétion des cytokines TNF- α , IL-8, IL-1 β (Corsini et al., 2014). Il est bien connu que l'exposition à des perturbateurs endocriniens (EDC) est liée au risque de développement du cancer (Giulivo et al., 2016). Les EDC peuvent affecter directement la régulation et la progression des cellules cancéreuses via la modulation du microenvironnement tumoral. Etant une cible des EDC, RACK1 favorise les événements pro-inflammatoires, et peut alors être considérée comme un pont moléculaire entre le microenvironnement tumoral régulé par le système endocrinien et le système immunitaire inné (Buoso et al., 2020).

Une étude récente a identifié que RACK1 contrôle la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ce qui régule la polarisation des macrophages antitumoraux (M1) et pro-tumoraux (M2) dans le microenvironnement tumoral du cancer épidermoïde oral (OSCC) (Dan et al., 2020). Les macrophages se trouvent parmi les populations qui constituent le microenvironnement, ils sont activés par divers stimuli et se différencient en sous populations M1 antitumorale et M2 pro-tumorale. Leur recrutement et leur polarisation joue un rôle indispensable pour bloquer ou favoriser le développement de la tumeur (Ruytinx et al., 2018). Dans l'OSCC, la forte expression de RACK1 est associée avec un nombre élevé de macrophages M2 et un faible taux de survie cellulaire (Liu et al., 2018). La surexpression de RACK1 dans l'OSCC inhibe l'invasion et la migration des macrophages et favorise la polarisation des macrophages M2. RACK1 régule à la baisse le niveau d'expression des facteurs inflammatoires CCL5, CXCL10, IL-8 et CSF2 de façon NF- κ B dépendante et augmente le ratio M2/M1 au sein de l'environnement tumoral (Dan et al., 2020) (Figure 23). Le rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral du OSCC favorise alors la progression du cancer.

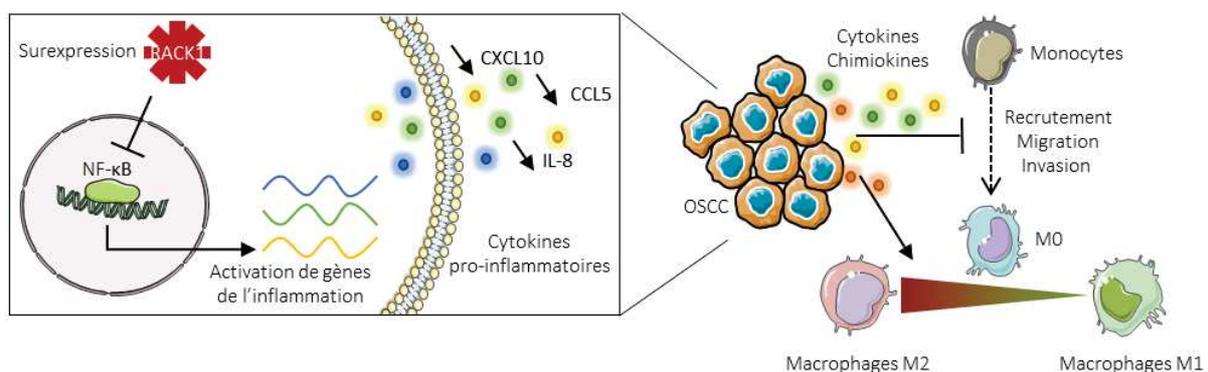


Figure 23. RACK1 est impliquée dans la polarisation des macrophages dans le microenvironnement du carcinome épidermoïde oral (OSCC).

RACK1 inhibe l'activation de NF- κ B ce qui régule l'expression et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et de chimiokines, et inhibe le recrutement des macrophages. RACK1 participe à l'état inflammatoire chronique dans le microenvironnement du OSCC ce qui favorise le développement de la tumeur. Figure adaptée de Dan et al., Mol. Oncology, 2020.

2. Rôle intrinsèque de RACK1 dans le cancer

i. RACK1, un nouveau marqueur de diagnostic dans le cancer

Dans plusieurs études, l'expression de RACK1 a été suivie chez des patients atteints de cancer du sein, du poumon, du foie ou de cancers épidermoïdes oraux, afin de déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression de la protéine et le stade clinique de développement de ces cancers (Li and Xie, 2015).

Dans le cancer du sein, l'expression des marqueurs Ki67, des récepteurs de l'œstrogène et de la progestérone, HER-2, est corrélée avec l'expression de RACK1, et sa surexpression favorise la prolifération et l'invasion des métastases *in vitro* et *in vivo* (Cao et al., 2010). Dans le cancer du poumon non à petites cellules, la surexpression de RACK1 est positivement corrélée avec le nombre de métastases (Shi et al., 2012).

Chez les patients présentant un adénocarcinome pulmonaire, la forte expression de RACK1 est significativement associée avec la différenciation de la tumeur (Zhong et al., 2013), la taille de la tumeur, l'état des ganglions lymphatiques et le stade pathologique du cancer (Nagashio et al., 2010).

La surexpression de RACK1 dans le cancer épidermoïde de l'œsophage favorise la croissance et la migration des cellules cancéreuses (Hu et al., 2013). Le marquage immunohistochimique de RACK1 et de Ki67 montre une corrélation entre l'expression de ces deux protéines dans les tissus de patients atteints de carcinomes épidermoïdes oraux (OSCC).

Dans les cellules de foie saines RACK1 est fortement exprimée et est fréquemment surexprimée dans les carcinomes hépatocellulaires (CHC) (Guo et al., 2013; Ruan et al., 2012). L'expression de RACK1 est associée à la progression clinique du cancer et est corrélée avec l'expression de Ki67, le niveau sérique de l' α -fœtoprotéine ainsi que le mauvais pronostic des patients atteints de CHC (Ruan et al., 2012).

Ces résultats indiquent que RACK1 peut être considérée comme un biomarqueur de mauvais pronostic clinique et que sa surexpression est impliquée dans la croissance, la progression tumorale ainsi que l'invasion métastatique (Li and Xie, 2015).

ii. RACK1 régule la progression du cancer

RACK1 interagit avec un grand nombre de partenaires protéiques qui sont impliqués dans la prolifération, l'adhésion, la transition épithélio-mésenchymateuse et la migration cellulaire qui sont des étapes clés à la progression des cellules cancéreuses (Adams et al., 2011). L'altération de l'expression de RACK1 dans de nombreux carcinomes humains est dépendante du type de cancers et confère à RACK1 un rôle inhibiteur ou activateur de certaines voies de signalisation (Li and Xie, 2015).

Lorsque RACK1 est surexprimée dans les cancers du CHC, du poumon ou dans les leucémies, son expression corrèle avec la croissance de la tumeur. RACK1 peut en effet réguler les voies de signalisation MKK7/JNK, PKCβII/eIF4E, PI3K, SHH et GSK3β pour permettre la croissance cellulaire (Ruan et al., 2012; Wu et al., 2013; Shi et al., 2012; Zhang et al., 2013) (Figure 24). Il a été observé que l'inflammation chronique contribue à la régulation à la hausse de l'activité de JNK dans les CHC ce qui contribue à la croissance tumorale (Hui et al., 2008; Mucha et al., 2009). Nous avons vu précédemment que RACK1 est une protéine impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation et peut notamment réguler la voie de JNK. Le niveau d'expression de RACK1 montre une corrélation avec l'activité de la voie de signalisation de JNK dans les tissus CHC et dans les lignées cellulaires issues de CHC (Guo et al., 2013). RACK1 peut interagir directement avec MKK7 et induire sa phosphorylation (Wang et al., 2015). L'interaction de RACK1 avec MKK7 facilite l'association entre MKK7 et JNK, et augmente l'activité du complexe ce qui favorise la prolifération des cellules CHC *in vitro*, la croissance tumorale *in vivo* mais aussi la résistance à l'apoptose (Guo et al., 2013).

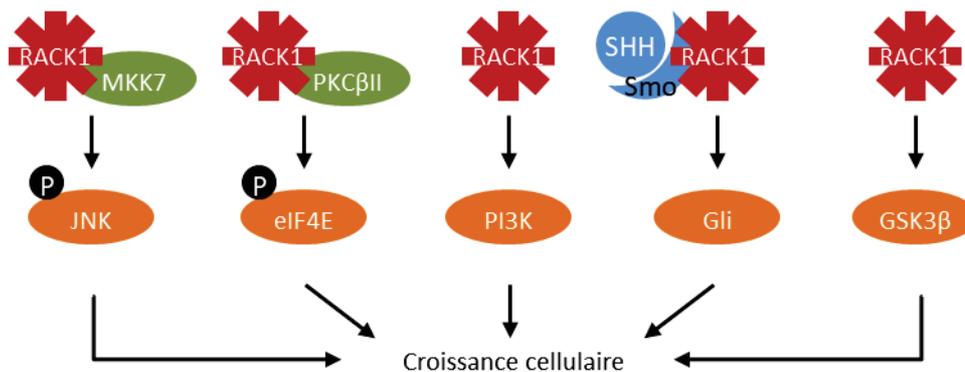


Figure 24. RACK1 régule positivement la croissance cellulaire.

RACK1 promeut la croissance cellulaire via les voies de signalisation de MKK7/JNK, PKCβII/eIF4E, PI3K, SHH (sonic hedgehog) et GSK3β. Figure adaptée de Li et Xie, *Oncogene*, 2015.

Dans le processus de développement de la tumeur, la dérégulation de la prolifération et la suppression de la mort cellulaire combinées fournissent une plateforme pour induire la tumorigenèse. Dans l'apoptose, RACK1 présente deux fonctions opposées selon les types de cancers et les conditions cellulaires (Li and Xie, 2015). RACK1 a un effet anti-apoptotique en promouvant l'ubiquitinylation et la dégradation des molécules pro-apoptotiques Fem1b et BimEL (Subauste et al., 2009; Zhang et al., 2008) (Figure 25A) ; mais aussi un rôle pro-apoptotique en favorisant l'oligomérisation de Bax, la dissociation du complexe Bax/Bcl-XL, en inhibant l'activation d'Akt par l'IGF-IR et Src, et en induisant l'expression pro-apoptotique de Bim de façon Src-dépendante (Kiely et al., 2002; Wu et al., 2010; Mamidipudi and Cartwright, 2009) (Figure 25B). Dans le CHC la surexpression de RACK1 conduit à la résistance accrue des cellules à la mort induite par TNF-α en supprimant la réponse aux ROS via la régulation de CBR1. Le silencing de RACK1 dans des cellules SMMC7721 issues de CHC augmente le niveau intracellulaire de ROS suite à la stimulation par TNF-α induisant la mort cellulaire (Zhou et al., 2016). Une autre étude récente a identifié que le silencing de RACK1 dans des cellules MHCC97-H dérivées de CHC induit une augmentation de l'expression du facteur pro-

apoptotique Bax conduisant à l'activation de l'apoptose (Zou et al., 2018). Ces résultats suggèrent que RACK1 protège les cellules de CHC contre la mort cellulaire en régulant différents mécanismes conduisant à l'inhibition de l'apoptose.

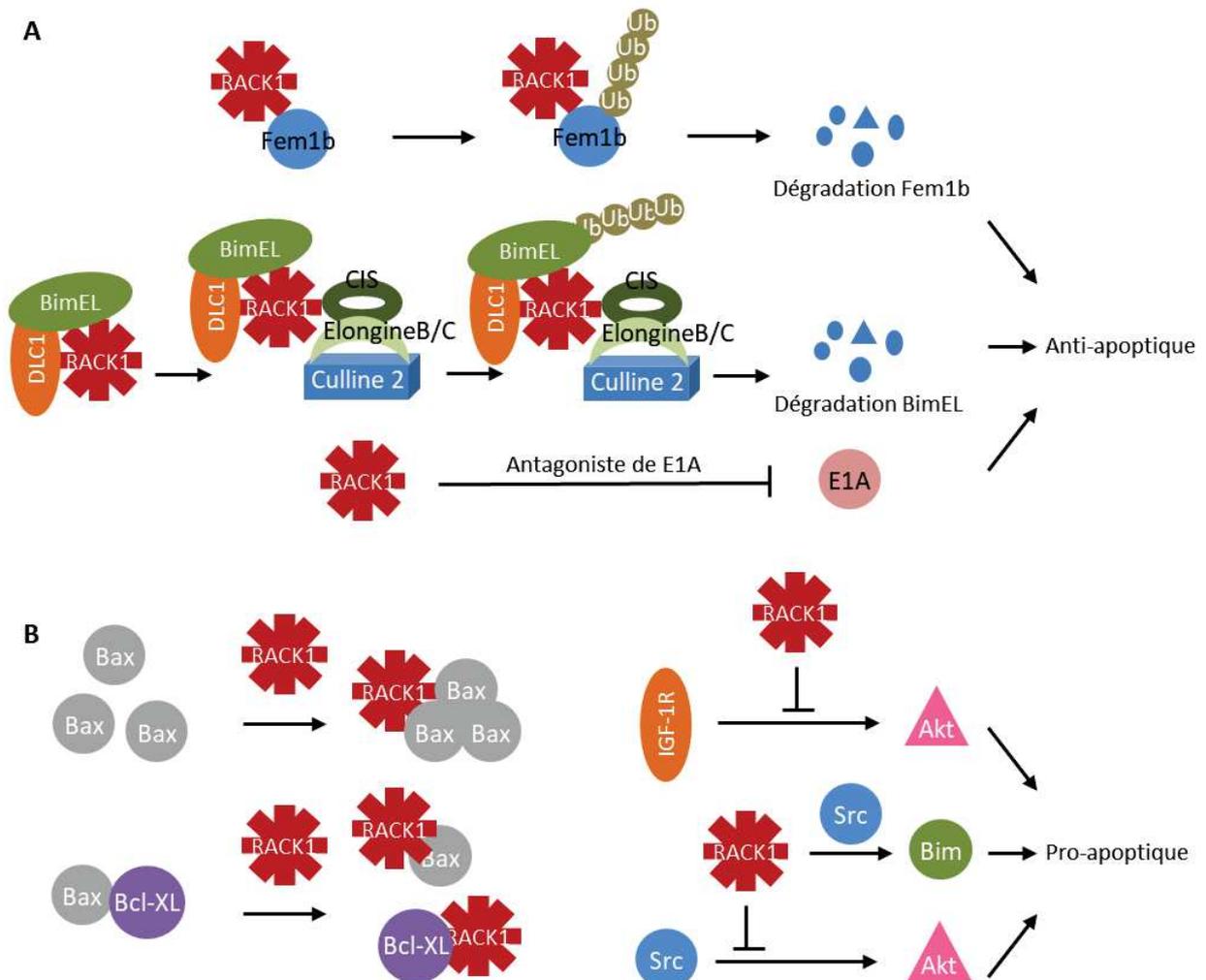


Figure 25. Rôles pro- et anti-apoptotiques de RACK1.

(A) RACK1 a un effet anti-apoptotique en promouvant l'ubiquitinylation et la dégradation des molécules pro-apoptotiques Fem1 et BimEL, ainsi que par son effet antagoniste sur E1A. (B) Au contraire, RACK1 a un effet pro-apoptotique en promouvant l'oligomérisation et la dissociation du complexe Bax/Bcl-XL, en inhibant l'activation d'Akt par l'IGF-1R et Src, ainsi qu'en induisant l'expression du facteur pro-apoptotique Bim de façon Src-dépendante. Figure adaptée de Li et Xie, *Oncogene*, 2015.

iii. RACK1 est impliquée dans la survie cellulaire et la chimiorésistance

En plus de participer à la progression du cancer, la régulation de l'apoptose par RACK1 peut aussi favoriser la résistance de certaines tumeurs aux médicaments anticancéreux. Les traitements de chimiothérapies sont des outils essentiels pour empêcher la progression du cancer et améliorer la survie et la qualité de vie des patients. La chimiorésistance dans

plusieurs tumeurs malignes est l'un des principaux défis de la chimiothérapie. Il a été observé que RACK1 était impliquée dans la résistance à certains traitements dans le cancer via la régulation de molécules liées à la résistance (Li and Xie, 2015). RACK1 a été identifiée comme un régulateur positif d'ABCG2 (ATP-binding cassette G2) qui est responsable de la résistance à plusieurs médicaments anticancéreux y compris la mitoxantrone, la topotecane et la 7-éthyl-10-hydroxycamptothécine (SN-38) (Ikebuchi et al., 2010). RACK1 favorise également la dégradation de facteurs pro-apoptotiques tel que BimEL, DLC1 et CIS dans des cellules traitées avec du paclitaxel induisant la résistance des cellules du cancer du sein (Zhang et al., 2008). Chez les patients atteints de CHC qui sont souvent diagnostiqués à des états avancés de la maladie et présentent une résistance accrue aux médicaments chimio-thérapeutiques (Ikeda et al., 2018), il a été identifié que RACK1 ribosomique peut préférentiellement induire la traduction de protéines impliquées dans la résistance au traitement (Ruan et al., 2012). Dans des cellules saines, il existe une coordination entre l'initiation de la traduction et la progression du cycle cellulaire, alors que la synthèse aberrante de protéines est associée avec la transformation tumorale et la survie des cellules cancéreuses (Silvera et al., 2010). Le contrôle de la traduction joue un rôle crucial dans le développement et la progression du cancer en régulant la synthèse protéique totale et la traduction spécifique d'ARNm impliqués dans la croissance et la survie cellulaire. Dans de nombreux cancers, il a été rapporté qu'un niveau aberrant de facteurs d'initiation contribue à la dérégulation du contrôle de la traduction (Silvera et al., 2010). La plupart des ARNm n'ont besoin que d'une quantité minimale du facteur d'initiation eIF4E pour être efficacement traduits alors qu'une activité élevée d'eIF4E augmente préférentiellement la traduction de certains ARNm possédant une longue région 5'UTR riche en G, C et qui codent pour des facteurs de croissance et de survie comme la cycline D1, MYC, ODC, VEGF, la survivine et BCL-2 (Mamane et al., 2007). Le niveau protéique de RACK1 est significativement corrélé avec l'expression de la cycline D1, MYC, la survivine et BCL-2. Il a été décrit que la déplétion de RACK1 ou l'expression du mutant R36D,K38E qui empêche l'association de RACK1 au ribosome (Coyle et al., 2009) atténue la traduction de la cycline D1, MYC, la survivine et BCL-2 (Ruan et al., 2012). RACK1 ribosomique couplée à la PKC β II promeut la phosphorylation d'eIF4E ce qui conduit à la traduction préférentielle de facteurs impliqués dans la croissance et la survie cellulaire. De plus, l'inhibition de la PKC β II ou la déplétion d'eIF4E atténue la résistance à la doxorubicine médiée par RACK1 *in vitro*. Ces résultats suggèrent que RACK1 au ribosome peut agir en tant que facteur contribuant à la croissance, à la survie des cellules ainsi qu'à la résistance à la chimiothérapie (Ruan et al., 2012). Cibler alors la fonction ribosomique de RACK1 permettrait à la fois de contrôler l'activité de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante d'ARN viraux mais aussi de réguler la traduction d'ARNm cellulaires impliqués dans la survie des cellules tumorales.

OBJECTIFS

Tout au long de mon introduction nous avons pu voir que RACK1 a la capacité d'interagir avec un grand nombre de partenaires protéiques impliqués dans différentes voies de signalisation rendant son activité critique pour de nombreuses fonctions fondamentales (Adams et al., 2011). De plus, RACK1 est un composant du ribosome situé à l'arrière de la tête de la petite sous-unité 40S (Larburu et al., 2016) et plusieurs études ont montré un rôle ribosomique de RACK1 dans l'initiation de la traduction (Nielsen et al., 2017). Précédemment, notre laboratoire a identifié RACK1 comme un facteur impliqué dans la traduction de protéines virales utilisant le mécanisme de traduction coiffe-indépendant aussi appelé Internal Ribosomal Entry Site (IRES) (Majzoub et al., 2014). En utilisant plusieurs modèles viraux, RACK1 a été identifiée comme un facteur clé nécessaire à la traduction IRES-dépendante de différents types d'IRES et pourrait être impliquée dans un mécanisme universel de traduction IRES-dépendante des ARN viraux. Les IRES ont aussi été décrits dans de nombreux ARNm cellulaires comme c-Src, MYC et p53 (Allam and Ali, 2010; Chappell et al., 2000; Yang et al., 2006) et permettent le maintien de la traduction des ARNm en réponse à différents stress y compris les dommages à l'ADN, la privation d'acides aminés, l'hypoxie ou le stress au réticulum endoplasmique.

En réponse à l'environnement cellulaire, l'expression de RACK1 est dérégulée notamment dans divers cancers ; par exemple dans le CHC la surexpression de RACK1 participe à la fibrogenèse (Liu et al., 2015). Il a été décrit que RACK1 au ribosome favorise la phosphorylation du facteur d'initiation eIF4E ce qui améliore la traduction de certains facteurs impliqués dans la croissance et la survie cellulaire tels que la cycline D1, MYC, VEGF et BCL-2, induisant la chimiorésistance (Ruan et al., 2012). Nous avons émis l'hypothèse que RACK1 au ribosome pouvait réguler la traduction IRES-dépendante d'ARNm cellulaires impliqués dans la progression tumorale et la chimiorésistance. Le premier objectif de ma thèse, a été d'étudier le rôle de la protéine RACK1 associée au ribosome dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux et cellulaires dans le but de valider RACK1 comme cible pour un large spectre de maladies IRES-dépendantes.

Considérant le rôle central de RACK1 dans des fonctions cellulaires critiques et que l'extinction totale de son expression est létale au niveau embryonnaire chez la souris (Volta et al., 2013), afin d'étudier spécifiquement le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante, nous souhaitons découpler sa fonction ribosomique de sa fonction cellulaire cytoplasmique. Le modèle mutant DE (R36D,K38E) a été décrit comme affectant la localisation de RACK1 au ribosome dans les cellules de mammifères (Duan et al., 2020; Ruan et al., 2012) et induit une baisse de la traduction de façon globale (Kim et al., 2017). L'un des objectifs principaux de ma thèse, a été de créer une lignée cellulaire possédant les deux points de mutations R36D et K38E de RACK1 dans des cellules humaines d'hépatocarcinomes Huh7 afin de valider RACK1 comme une cible thérapeutique.

En plus d'étudier l'implication de RACK1 dans la réplication virale via la traduction IRES-dépendante, nous souhaitons comprendre le rôle de RACK1 dans la réponse à l'inflammation induite par l'infection virale et le développement du cancer. Il a été décrit que RACK1 contribue à la progression tumorale et à la chimiorésistance (Ruan et al., 2012). Dans le modèle étudié au laboratoire, le CHC où la protéine RACK1 est surexprimée, nous avons

observé une augmentation de l'expression et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires CXCL10 et IL-8 lorsque l'expression de RACK1 est éteinte (Thèse de Vincent Turon-Lagot, UMR_S1110, 2020). Les cytokines peuvent agir en tant que signaux au sein du microenvironnement tumoral pour influencer le destin final de la tumeur. Les macrophages se trouvent parmi les populations qui constituent le microenvironnement, ils sont activés par divers stimuli et se différencient en sous-populations (M1 antitumorales et M2 pro-tumorales) pour bloquer ou favoriser le développement de tumeur (Ruytinx et al., 2018; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Dans le microenvironnement tumoral du CHC, les macrophages sont principalement polarisés en M2 et participent à l'inflammation chronique ainsi qu'à la progression de la tumeur (Yeung et al., 2015; Huang et al., 2021). Récemment, il a été décrit que la surexpression de RACK1 dans le cancer épidermoïde oral est associée à l'inhibition du recrutement des macrophages ainsi qu'à l'augmentation du ratio M2/M1 au sein de l'environnement tumoral favorisant la progression du cancer (Dan et al., 2020). Dans le second objectif de ma thèse, nous souhaitons comprendre le rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral du cancer du foie. Dans un premier temps, nous avons développé des outils nous permettant d'identifier les populations de type M1 et M2, ainsi que vérifier le rôle de RACK1 dans le microenvironnement du carcinome épidermoïde oral pour ensuite étudier son rôle dans le contexte du carcinome hépatocellulaire.

MATERIEL ET METHODES

Anticorps et réactifs

Anticorps

Pour les expériences de western blot l'anticorps monoclonal de souris RACK1 a été acheté chez Santa Cruz (#SC17757) ; l'anticorps de monoclonal de lapin β -actine a été acheté chez Cell Signaling (#8457L) ; les anticorps hFAB β -actine rhodamine (#12004163) et chèvre anti-lapin IgG StarBright Blue 700 (#1200162) ont été achetés chez Bio-Rad ; l'anticorps monoclonal anti-Flag de souris a été acheté chez Sigma-Aldrich (#F1804-200UG) ; l'anticorps polyclonal anti-RPS14 de lapin (#ab174661) a été acheté chez Abcam ; les anticorps HRP-conjugués-anti-souris (#71-036-146) et HRP-conjugués-anti-lapin (#711-036-152) ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch.

Pour le marquage en cytométrie, les anticorps souris anti-humain CD163-FITC (#563697), souris anti-humain CD206-APC (#550889), souris anti-isotype-FITC (#555909) et souris anti-isotype-APC (#555751) ont été achetés chez BD BioSciences ; les anticorps anti humain REA CD14-PerCP-Vio700 (#130-110-523), REA CD16-VioBlue (#130-113-396), REA CD32-PE (#130-116-599), REA CD40-APC-Vio770 (#130-110-949), REA CD86-PE-Vio770 (#130-112-288), REA CD163-PE-Vio770 (#130-110-523), REA CD209-APC (DC-SIGN) (#130-124-257), REA isotype contrôle-VioBlue (#130-113-442), REA isotype contrôle-PE (#130-113-438), REA isotype contrôle-PerCP-Vio700 (#130-113-441), REA isotype contrôle-PE-Vio770 (#130-113-440), REA isotype contrôle-APC (#130-113-434), REA isotype contrôle-APC-Vio770 (#130-113-435) ont été achetés chez Miltenyi. Les marqueurs de viabilité Zombie Yellow™ (#423103) et Zombie Green™ (#423112) ont été achetés chez BioLegend.

Réactifs

Les réactifs FuGENE® HD (Promega #E2311), Lipofectamine® 2000 (Invitrogen #11668-019) et ViaFect™ (Promega #E4982) ont été utilisés pour la transfection d'ADN. Le réactif RNAiMAX™ (Invitrogen #13778-150) a été utilisé pour la transfection d'ARN.

L'actinomycine-D (Sigma-Aldrich #A9415-2MG) a été utilisé dans l'analyse de la dégradation de l'ARNm. Le réactif MTT (Sigma-Aldrich #M5655), l'essai PrestoBlue Cell Viability (Invitrogen #A13261) ont été utilisés pour mesurer la cytotoxicité et la viabilité des cellules.

Les antibiotiques ampicilline (#A0166-56) et puromycine (#P833) ont été achetés chez Sigma-Aldrich ; les antibiotiques gentamicine (#15710-049) et blasticidine (#A1113903) ont été achetés chez Gibco.

Pour la différenciation et la polarisation des macrophages, les IL-4 (#130095-73), IL-13 (#130-112-409) et l'IFN- γ (#130-096-484) ont été achetés chez Miltenyi ; le LPS (#LPS25) a été acheté à Millipore ; le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) a été acheté auprès de MP Biovalley.

Le Dual-Luciferase® Reporter assay system (#E1910) a été acheté chez Promega et utilisé pour évaluer la traduction IRES-dépendante.

Culture cellulaire et bactérienne

Les cellules Huh7 et Huh7.5.1 sont des lignées de cellules dérivées de carcinomes d'hépatocytes humains. Les cellules Huh7 ont été cultivées dans du Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose enrichi en GlutaMAX™ (DMEM + GlutaMAX™ ; Gibco #61965-026) complété par 10% de sérum bovin foetal (FBS ; Dominique Dutscher) et des acides aminés non essentiels (Gibco #11140-050). Les cellules Huh7.5.1 ont été cultivées dans les mêmes conditions, avec addition de l'antibiotique gentamicine (50 µg/mL ; Gibco #15710-049). Les cellules Huh7 exprimant RACK1^{R36,K38} ou RACK1^{R36D,K38E} résistants au siRACK1 ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules Huh7, avec ajout de l'antibiotique puromycine (1 µg/mL ; Sigma-Aldrich #P8833). Les cellules HSC-3 sont une lignée humaine de cellules dérivées de carcinome épidermoïde oral, les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM + GlutaMAX™ (Gibco #61965-026) complété avec 10% de FBS (Hyclone). Les cellules THP-1 sont une lignée cellulaire monocytique humaine, les cellules ont été cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute 640 Medium enrichi avec du GlutaMAX (RPMI 1640 + GlutaMAX™ ; Gibco #61870-010) complété par 10% de FBS (Hyclone). Les cellules HEK293T sont une lignée cellulaire de rein embryonnaire humain, les cellules ont été cultivées dans le milieu DMEM (DMEM ; Gibco #42430-025) complété par 10% de FBS (Dominique Dutscher) et avec l'antibiotique gentamicine (50 µg/mL ; Gibco #1571-049). Toutes les cellules ont été maintenues à 37°C avec 5% de CO₂.

Les bactéries *Escherichia coli* OneShotTop10 chimiquement compétentes (Invitrogen #C4040003) et OneShot ccdB Survival 2 T1 compétentes (Invitrogen #A16460) ont été cultivées à 37°C dans du milieu LB ou sur des plaques contenant du LB agar.

Transfection d'ADN, d'ARN et transduction de lentivirus

Transfection d'ADN

Pour améliorer l'efficacité de la transfection, les cellules Huh7 ont été transfectées avec le plasmide pCRISPRbael-neonGreen à l'aide de différents réactifs : la Lipofectamine® 2000, le FuGENE® HD et le ViaFect™ selon les instructions du fabricant. Nous avons également testé l'électroporation, 4 millions de cellules Huh7 ont été resuspendues dans du PBS (Gibco #14190-094) et transfectées avec 10 µg de plasmide pCRISPRbael-neonGreen par un système d'électroporation (ECM 830 Electro Square Porator ; BTX Harvard Appareil). En parallèle, nous avons testé la Nucléofection, 200 000 cellules Huh7 ont été resuspendues dans 20 µL de solution cell line (Lonza #S-07683) dans une nucléocuvette de 16 puits (Lonza #V4XC-9064) et transfectées avec 0,4 µg de plasmide pCRISPRbael-neonGreen avec un 4D-Nucléofector™ (Lonza). Deux jours après la transfection, l'expression de la neonGreen a été évaluée par cytométrie en flux avec un MACSQuant X Analyzer (Miltenyi).

Transfection de siARN

Les siRACK1 (siARN GNB2L1 ; Ambion #s20341) et siCTRL (siCtl négatif #2 ; Ambion #AS026LD1) ont été transfectés à l'aide de la Lipofectamine RNAiMAX™ selon les instructions du fabricant. Sauf indication contraire, d'autres traitements ou analyses ont été effectuées trois jours après la transfection, et l'expression du gène cible a été évaluée par western blot.

Production et transduction de lentivirus

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec un mélange contenant le Gag/Pol, le VSV-G, le plasmide lentivirus et le CaCl₂ (Takara #S0875) ; le mélange a été ajouté goutte par goutte dans un tube de polypropylène contenant du HeBS (Takara #S0874). Un jour après la transfection, le milieu a été changé et 24 heures plus tard, le milieu conditionné a été recueilli, filtré et soit utilisé pour infecter les cellules, soit stocké à -80 °C.

Sur les cellules confluentes Huh7, le milieu a été remplacé par la production de lentivirus et changé 24 heures plus tard.

Essai de prolifération et de viabilité des cellules

Les cellules HSC-3 et Huh7 ont été cultivées dans des conditions de stress (privation de sérum). La prolifération des cellules a été évaluée en analysant leur capacité à métaboliser le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). La viabilité des cellules a été évaluée à l'aide du réactif PrestoBlue.

Clonage moléculaire et construction de plasmides

Plasmides IRES

Les plasmides contenant des IRES viraux (EMCV, FMDV, PV, VHC, HRV) et des IRES cellulaires (Apaf-1, BiP, c-myc, CAT-1, VCIP) ont été fournis par l'équipe de K. Hirasawa (Sciences biomédicales, Université Memorial de Terre-Neuve, Canada) et décrits dans (Licursi et al., 2011).

Plasmides CRISPR

Les plasmides pLentiGuide-Puro (Addgene #52963) et pCRISPRbael-neonGreen (Sanofi) ont été utilisés dans la stratégie CRISPR/Cas9 pour cloner les différents guides R36 et K38. Le plasmide pCRISPRbael-neonGreen a également été utilisé pour améliorer l'efficacité de transfection des cellules. Le plasmide pLentiGuide-Puro a été utilisé pour produire des lentivirus. Le plasmide pXPR-BRD111 (Addgene #78166) qui exprime la protéine Cas9 et a été utilisé en combinaison avec plasmide pLentiGuide-Puro.

Transformation bactérienne et amplification des plasmides

Les bactéries OneShotTop10 et OneShot ccdB ont été transformées respectivement avec des plasmides pLentiGuide-Puro et pCRISPRbael-neonGreen et sélectionnées avec un antibiotique ampicilline. Les bactéries transformées ont été purifiées à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel #740414.50) ou HiSpeed Plasmid Maxiprep (Qiagen #12663) selon les instructions du fabricant.

Clonage moléculaire des guides utilisés dans la stratégie de knock-in par CRISPR

Les plasmides pLentiGuide-Puro et pCRISPRbael-neonGreen ont été utilisés pour cloner les guides ciblant les deux régions R36 et K38 de RACK1. Les plasmides pLentiGuide-Puro et pCRISPRbael-neonGreen ont été respectivement digérés par les enzymes de restriction BsmBI (NEB #R0580L) et BaeI (NEB #R0580L), puis purifiés sur un gel 0,8% d'agarose et extraits du gel à l'aide d'un kit d'extraction Quick-Start Gel Extraction kit (Qiagen #28704) selon les

instructions du fabricant. Les ARN guides double brin (dgARN) ont été obtenus après hybridation de deux ARN guides simple brin (sgARN) (décrits dans le Tableau 1), puis ont été ligués dans les plasmides pLentiGuide-Puro et pCRISPRbael-neonGreen en utilisant la T4 DNA Ligase (Promega #M180B) avec un rapport de 1:3 (plasmide:dgARN). Les plasmides clonés ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction BsmBI et BaeI pour éliminer les plasmides dans lesquels le dgARN n'a pas été inséré, puis amplifiés dans des bactéries. Les séquences de tous les guides insérés ont été amplifiées par PCR sur colonies en utilisant la polymérase Phusion High Fidelity DNA (Thermo Scientific™ #F-530L) et un Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) comme thermocycleur, puis visualisées sur un ChemiDoc™ Imagine System (Bio-Rad) et analysées par séquençage en parallèle (Eurofins Genomics).

Construction et identification de lignées cellulaires mutantes

Choix des guides ayant la meilleure efficacité de clivage

Les cellules Huh7 ont été co-transfectées avec les plasmides pLentiGuide-Puro contenant les différents dgARN et pXPR-BRD111 ou en parallèle avec le plasmide pCRISPRbael-neonGreen en utilisant le réactif ViaFect™. Trois jours après la transfection, les cellules transfectées avec le plasmide pLentiGuide-Puro ont été sélectionnées par ajout des antibiotiques puromycine (2 µg/mL) et blasticidine (8 µg/mL), alors que les cellules exprimant la neonGreen (analogue de la GFP) ont été triées avec le trieur de cellules Tyto (MACSQuant). Dans les cellules sélectionnées, l'efficacité de clivage de chaque guide a été analysée à l'aide d'un kit de détection de clivage génomique GeneArt® (Invitrogen #A24372) selon les instructions du fabricant et analysée par électrophorèse à haute résolution (2100 Bioanalyzer® ; Agilent). La bande clivée a été quantifiée et le pourcentage d'efficacité calculé comme suit :

fraction clivée = somme des intensités des bandes clivées / somme des intensités des bandes clivées et parentales

efficacité de clivage = $1 - [(1 - \text{fraction clivée})^{1/2}]$

efficacité de clivage pour le contrôle = (somme des intensités des bandes clivées / somme des intensités des bandes clivées et parentales) x 100

Construction de lignées cellulaires mutantes avec la stratégie de knock-in par CRISPR

Pour générer la double lignée cellulaire mutante, nous avons décidé d'introduire séquentiellement les deux points de mutation. Nous avons produit en parallèle les deux lignées cellulaires mutantes contenant la mutation RACK1 R36D ou K38E. Les cellules Huh7 ont été co-transfectées avec le plasmide pLentiGuide-Puro contenant le guide ayant la meilleure efficacité de clivage, le plasmide pXPR-BRD111 et le ssODN correspondant (décrit dans le Tableau 2) avec le réactif ViaFect™ ou par transduction de lentivirus. Trois jours après la transfection, les cellules ont été sélectionnées en ajoutant les antibiotiques puromycine (2 µg/mL) et blasticidine (8 µg/mL). L'efficacité de clivage de chaque guide a été analysée à l'aide du kit de détection de clivage génomique GeneArt® et visualisée par électrophorèse à haute résolution (2100 Bioanalyzer® ; Agilent). La détection des mutations R36D ou K38E a été analysée par PCR, restriction enzymatique ou PCR par gouttelettes digitales (droplet digital PCR = ddPCR). Pour isoler individuellement les cellules contenant la mutation, nous avons

distribué une cellule par puits dans une plaque 96 puits contenant du milieu conditionné à l'aide d'un distributeur de cellules (SCP™ Cytex)

Caractérisation des mutants

PCR

Pour identifier les mutations présentes dans un pool de cellules ou dans une lignée cellulaire résultant de la sélection clonale, l'ADN a été extrait des cellules Huh7 à l'aide d'un kit d'extraction Quick-DNA extraction kit (ZYMO Research #D3012) selon les instructions du fabricant. L'ADN RACK1 contenant la mutation a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques aux mutations R36D ou K38E en utilisant la polymérase Phusion Master mix (Thermo Scientific™ #F531) dans un thermocycleur PCR Gene Amp 9700 (Applied Biosystem), puis visualisé sur un ChemiDoc™ Imagine System (Bio-Rad), et analysé par séquençage en parallèle (Eurofins Genomics).

Droplet digital™ PCR (ddPCR)

Pour définir l'état allélique des clones, un test de détection de modification du génome HDR par ddPCR (Bio-Rad) a été utilisé, comme décrit par (Hindson et al., 2011). Des ADN synthétiques contrôles contenant les mutations et des sondes spécifiques ciblant l'ADN mutant et l'ADN sauvage (WT) respectivement couplés aux fluorophores HEX et FAM ont été fabriqués à façon (Integrated DNA Technology). Le mélange de réaction de la ddPCR contient un Mastermix 2X ddPCR (Bio-Rad #186-3025), les amorces et les sondes 20X (concentrations finales de 900 et 250 nM respectivement) et l'ADN matrice digéré avec l'enzyme de restriction HaeIII (Thermo Scientific™ #FD0154). Le mélange a été capturé dans des gouttelettes d'huile (Bio-Rad) et les fragments d'ADN ont été amplifiés dans un thermocycleur conventionnel (C1000 touch Thermal Cycler ; Bio-Rad). Les conditions des réactions de PCR étaient les suivantes : 10 min à 95°C, 40 cycles composés de 30 s à 95°C, 5-6 min à 60°C, et une extension finale de 10 min à 98°C. Après la PCR, la plaque de 96 puits a été chargée sur le lecteur de gouttelettes QX200 (Bio-Rad) qui lit automatiquement les gouttelettes de chaque puits de la plaque (32 puits/h). L'analyse des données de ddPCR a été effectuée avec le logiciel QuantaSoft™ (Bio-Rad) qui accompagnait le lecteur de gouttelettes.

Enzyme de restriction

Pour identifier le pool de clones contenant la mutation unique R36D ou K38E, l'ADN génomique des cellules Huh7 a été extrait avec le kit Dneasy (Qiagen #69504) selon les instructions du fabricant. La région contenant le point de mutation a été amplifiée par PCR avec la polymérase Phusion Master mix, puis purifiée en utilisant le kit Quick-Start PCR purification (Qiagen #28106). Les fragments R36D et K38E ont été digérés respectivement par les enzymes de restriction EcoRV (FastDigest Eco321 ; Thermo Scientific™ #FD0303) et NheI (FastDigest ; Thermo Scientific™ #FD0974), puis visualisés sur un ChemiDoc™ Imagine System.

Profil de polysome

L'analyse du profil des polysomes a été effectuée comme décrit (He and Green, 2013) avec quelques optimisations. Les cellules Huh7 exprimant RACK1 exogène résistant au siRACK1 ont été transfectées avec des siRACK1. Trois jours après la transfection, les cellules ont été traitées ou non avec 100 µg/mL de cycloheximide (Acros Organics #357420010) directement dans le

milieu pendant 10 min à 37 °C. La lyse cellulaire a été optimisée en testant deux protocoles différents. Dans le premier, les cellules ont été conservées sur la glace, lavées dans du PBS contenant de la cycloheximide, grattées et récoltées puis centrifugées 5 min à 1 500 rpm et 4°C. Pour 1 g de culot, a été ajouté 1 mL de tampon de lyse contenant du HEPES-KOH pH7.6, du KCl, du MgCl₂, du NP-40, du DTT, un inhibiteur de RNase (Applied Biosystems #N8080119), de l'Halt protease (Thermo Scientific™ #78447) et de la cycloheximide (100 µg/mL). Dans le second protocole, les cellules ont été conservées sur la glace, lavées dans du PBS, grattées et récoltées. Pour une boîte de Pétri de 10 cm, les cellules ont été directement lysées dans 1 mL de tampon de lyse contenant du HEPES-KOH pH7.6, du KCl, du MgCl₂, du NP-40, du DTT, un inhibiteur de RNase, de l'Halt protease et de la cycloheximide (100 µg/mL à 1 mg/mL) et maintenues sur glace 5 min. Les cellules lysées ont été centrifugées 10 min à 13 000 rpm à 4°C et le volume équivalent de surnageant pour chaque échantillon a été stocké à -80°C ou chargé sur des gradients de sucrose linéaires 5-40% ou 5-45% obtenus grâce à un gradient maker (108 ; Biocomp) et contenant du sucrose, de l'HEPES-KOH pH7.4, du KCl, du MgCl₂, du DTT et de la cycloheximide (100 µg/mL à 1 mg/mL). Les gradients et les lysats ont été ultracentrifugés à 4°C dans un rotor à godets oscillants SW40 (Beckman Coulter) pendant 2h30 min à 37 000 rpm dans une ultracentrifugeuse Optima XE (Beckman Coulter). Les fractions ont été collectées, analysées à 260 nm à l'aide d'un moniteur UV (système de chromatographie Äkta Pure ; GE Healthcare) combiné à un piston (Brandel) afin d'identifier les pics 40S, 60S et 80S. Les protéines et les ARN des fractions collectées ont été extraits à l'aide du kit ARN/protéines Allprep (Qiagen #80404) selon les instructions du fabricant et stockés à -80°C. Les protéines extraites ont été concentrées à l'aide de tubes Amicon Ultra (10K ; Millipore #UFC801024) par centrifugation à 4 000 g pendant 20 min à 4°C. Les protéines ont été précipitées dans du TCA (10% ; Sigma-Aldrich #490-10), incubées sur glace pendant 1 heure, centrifugées 10 min à 13 000 rpm à 4°C. Les culots ont été lavés trois fois avec 96% d'acétone froid, centrifugés 10 min à 13 000 rpm à 4°C, séchés et resuspendus dans un tampon (Tris, LSB, DTT). L'expression de RACK1 et des protéines ribosomiques a été analysée par western blot.

Analyse de l'expression des protéines par western blot

Les cellules ont été lysées pendant 30 min à 4°C dans le tampon de lyse composé de tampon d'extraction cellulaire (Invitrogen #FNN001), de PMSF (Roche #10837091001) et d'inhibiteur de protéases cOMplete mini EDTA free (Roche #05892791001). Après 30 min de centrifugation à 13 000 rpm à 4°C, le surnageant a été recueilli et la concentration totale de protéines a été déterminée par un essai DC (Bio-Rad #500-0116) selon les instructions du fabricant en utilisant un Berthold (Mithras LB940) ou un PHERAstar® (BMG Labtech) comme spectrophotomètres. Des quantités égales de lysats protéiques ont été chargées sur des gels SDS-PAGE. Après migration, les protéines ont été transférées à l'aide du système de transfert Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad #1704150) sur des membranes de difluorure polyvinylidene (PVDF). Les membranes ont été bloquées dans 5% d'albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma-Aldrich) dans une solution de tris (TBS) avec 0,1% de Tween 20 pendant 1h, puis incubées avec les anticorps primaires pendant 1h ou toute la nuit.

L'expression des protéines RACK1, β -actine et RPS14 a été évaluée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-RACK1 monoclonal de souris, d'un anticorps anti-Flag monoclonal de souris, d'un anticorps anti- β -actine monoclonal de lapin, d'un anticorps anti- β -actine rhodamine hFAB et d'un anticorps anti-RPS14 polyclonal de lapin. Après des lavages dans du TBS-0,1% Tween 20, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires appropriés : l'anticorps HRP-conjugué-anti-souris, l'anticorps HRP-conjugué-anti-lapin et l'anti-lapin IgG StarBright Blue 700 (Bio-Rad #12004162). Pour les anticorps secondaires HRP, le signal a été observé par ajout du substrat Clarity western ECL (Bio-Rad #1705061). Les images ont été obtenues à l'aide du système ChemiDoc™ (Bio-Rad). Les bandes protéiques ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageLab (version 6.1.0 build 7 ; Bio-Rad).

Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative

L'ARN total des cellules Huh7 a été extrait à l'aide du system ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep (Promega #Z6012) et d'un kit Maxima First Strand pour RT-qPCR (Thermo Scientific™ #K1642) pour transcrire l'ARN en ADN complémentaire selon les instructions du fabricant. Le mix iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad #1725131) a été utilisé pour amplifier l'ADN complémentaire. L'expression de l'ARNm cible a été calculée à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalisée par l'expression de la GAPDH. Les amorces et les sondes TaqMan® pour détecter les ARNm GAPDH et CXCL10 ont été commandées chez Thermo Scientific™ (TaqMan® Gene Expression Assays).

Analyse de la traduction en utilisant un rapporteur luciférase

Pour les analyses de traduction médiée par les IRES, les cellules Huh7 traitées avec des siARN ont été transfectées avec des plasmides pRF (IRES viraux ou cellulaires) contenant les rapporteurs luciférase *Firefly* et *Renilla* en utilisant le réactif ViaFect™ selon les instructions du fabricant. La traduction de la *Firefly* est IRES-dépendante alors que la traduction *Renilla* est coiffe-dépendante. Deux jours après la transfection, les cellules ont été lysées et les activités luciférase ont été mesurées avec l'essai Dual-Luciferase en utilisant un Berthold (Mithras LB940) ou un PHERAstar® (BMG Labtech) comme luminomètres.

Polarisation des macrophages *in vitro* et identification des populations

Polarisation des macrophages *in vitro*

Les cellules THP-1 ont été cultivées et polarisées selon le protocole optimisé décrit par (Genin et al., 2015). Les monocytes THP-1 ont étéensemencés à 500 000 cellules/puits dans des plaques 6 puits et ont été différenciés en macrophages M0 avec 200 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) pendant 48 heures. Les macrophages M0 ont été polarisés en macrophages de type M1 par incubation de 20 ng/ml d'IFN- γ et 100 ng/mL de LPS pendant 24 heures, ou polarisés en macrophages de type M2 par incubation de 20 ng/mL d'IL-4 et 20 ng/mL d'IL-13 pendant 24 heures.

Pour l'essai de polarisation *in vitro* avec les surnageants des cellules HSC-3 ou Huh7, les macrophages M0 ont été polarisés avec un milieu conditionné basé sur le protocole décrit par (Dan et al., 2020). Les cellules HSC-3 ou Huh7 ont été transfectées avec des siARN, trois jours plus tard les surnageants ont été récupérés et filtrés (Steriflip ; Millipore) puis ajoutés sur les macrophages M0 pendant 24 heures.

Analyse des marqueurs de surface cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules THP-1 et les macrophages ont été lavés dans du PBS, récoltés après traitement à l'Accutase® (Corning #25-08-CI) et centrifugés 5 min à 1 500 rpm. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans du tampon de FACS (PBS complété par 2 mM d'EDTA et 0,5% de BSA), les cellules ont été marquées avec les anticorps appropriés pendant 15 min à température ambiante. Les cellules ont également été incubées avec l'isotype contrôle correspondant à chaque anticorps. Après incubation, du PBS a été ajouté et la suspension a été centrifugée 5 min à 1500 rpm. Après deux lavages dans du PBS, les cellules ont été incubées avec le marqueur de viabilité Dyes Zombie Yellow™ ou Zombie Green™ pendant 15 min à température ambiante dans du PBS pour discriminer la population vivante de la population de cellules mortes. Après incubation, du PBS a été ajouté et la suspension centrifugée 5 min à 1500 rpm. Deux lavages successifs dans du PBS ont été exécutés, puis les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde (PFA ; Electron Microscopy Sciences #15714-5). Après incubation, du PBS a été ajouté et une dernière centrifugation de 5 min à 1500 rpm a été effectuée avant de resuspendre les cellules dans du tampon de FACS. Des monomarquages sur des billes macs Comp Beads kit anti-REA (Miltenyi #130-104-693) ont été utilisés comme contrôles, ainsi que pour calculer la matrice de compensation. Le marquage des cellules a été analysé avec un cytomètre en flux, MACSQuant Analyzer X (Miltenyi), les pourcentages des cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence (FMI) ont été déterminés en utilisant les logiciels FlowJo™ (version 10.7 ; BD Biosciences) et FlowLogic™ (version 8.1; logiciel Inivai).

Analyse de la sécrétion de cytokines avec un test de billes multiplexées

Les surnageants de culture cellulaire ont été prélevés après 24 ou 48 heures de polarisation induite soit par l'ajout du milieu conditionné provenant des cellules HSC-3 ou Huh7, soit par l'ajout de LPS/IFN- γ pour les macrophages de type M1 ou d'IL-4/IL-13 pour les macrophages de type M2. L'analyse simultanée des cytokines IFN- α , IFN- γ , CCL3, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-12p70 a été effectuée avec un test de billes multiplexées MultiCyt® Qbeads® PlexScreen Secreted Protein Assay (10 protéines testées, fabrication à façon ; Sartorius) selon les instructions du fabricant dans un cytomètre en flux, iQue® (Intellicyt®). La concentration des cytokines a été calculée à l'aide de la courbe standard acquise dans chaque échantillon.

Analyses statistiques

Pour les essais de traduction IRES-dépendante, les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test Mann-Whitney non apparié. Pour l'analyse de l'expression de CXCL10, l'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test ANOVA à une voie Kruskal-Wallis. Pour les expériences de cytométrie, les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test

Mann-Whitney non apparié et d'un test ANOVA à une voie Kruskal-Wallis. Pour l'analyse de la viabilité des cellules par PrestoBlue, une analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test ANOVA à une voie. Pour les essais de prolifération cellulaire MTT, les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test ANOVA à une voie Kruskal-Wallis. Les valeurs *P* correspondent à : *, < 0,05 ; **, < 0,01 ; ***, < 0,001 ; ****, < 0,0001 ; ns signifie « non significatif ».

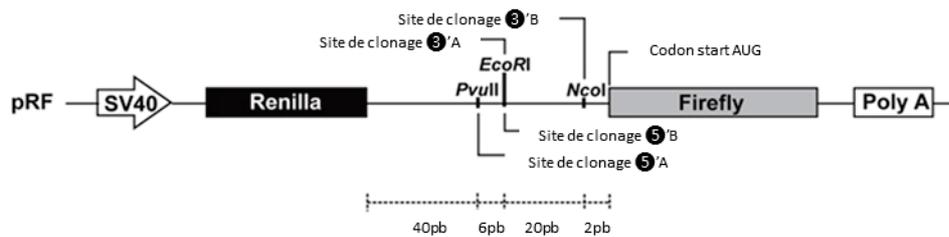
RESULTATS

PARTIE I. Rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante virale et cellulaire

I. La traduction IRES-dépendante des ARN viraux et cellulaires est médiée par l'expression de RACK1.

En utilisant comme modèle de traduction IRES-dépendante, les virus de l'hépatite C humaine (VHC) et le virus de paralysie du cricket (CrPV) dont les IRES appartiennent au type III, le laboratoire a identifié RACK1 comme un facteur clé impliqué dans la traduction virale médiée par les IRES (Majzoub et al., 2014). En montrant que RACK1 régule la traduction de deux virus différents, nous avons émis l'hypothèse que RACK1 pourrait être impliquée dans un mécanisme général de traduction virale médiée par les IRES. De plus, des IRES ont été trouvés dans différents ARN cellulaires comme p53, MYC, c-Src (Yang et al., 2006; Chappell et al., 2000; Allam and Ali, 2010) et permettent le maintien de la traduction des ARNm en réponse à divers stress, y compris les dommages à l'ADN, la privation d'acides aminés, l'hypoxie ou le stress au réticulum endoplasmique. Compte tenu du rôle de RACK1 dans la réponse au stress, nous avons émis l'hypothèse que RACK1 pouvait jouer un rôle dans la régulation de la traduction IRES-dépendante d'ARNm cellulaires. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de traduction *in vitro* dans des cellules Huh7. Dans notre modèle, nous avons utilisé un plasmide bicistronic luciférase dans lequel la traduction de la luciférase *Firefly* est sous le contrôle de différents IRES viraux ou cellulaires et normalisée par le rapporteur *Renilla* dont la traduction est coiffe-dépendante (Figure 26A). Nous avons observé une diminution significative de tous les IRES cellulaires (CAT-1, Apaf-1, c-myc, BiP, VCIP) et des IRES viraux (EMCV, FMDV, PV, VHC et HRV) après le silencing de RACK1 par rapport au silencing contrôle (Figure 26B). Dans le contrôle pRF, après silencing de RACK1 la traduction est légèrement diminuée de manière significative. Nous avons observé une variabilité entre les mesures, expliquant la différence entre les conditions siCTRL et siRACK1 pour pRF mais avec une valeur-p de 0,02 alors que dans les autres IRES la valeur-p était inférieure à 0,0001. La baisse d'expression de RACK1 a été confirmée par western blot (Figure 26D). Dans les cellules Huh7 exprimant RACK1 résistant au siARN, il n'y avait pas de différence translationnelle entre les conditions siCTRL et siRACK1, à l'exception d'une faible diminution de la traduction médiée par les IRES VCIP et FMDV (Figure 26C). Nous avons vérifié que RACK1 était bien exprimée dans les cellules résistantes au siRACK1 pendant le silencing par western blot (Figure 26E). Ces résultats ont confirmé que la diminution de traduction IRES-dépendante observée dans les cellules Huh7 était due à la baisse d'expression de RACK1. Nous avons conclu que RACK1 est impliquée dans la traduction IRES-dépendante cellulaire et virale pour CAT-1, Apaf-1, BiP, EMCV, PV, VHC et HRV et peut constituer une cible thérapeutique intéressante pour agir sur un large spectre de cibles virales et cellulaires.

A : Représentation schématique des constructions de rapporteurs bicistroniques



Site de clonage 5'A : IRES EMCV, FMDV, HRV, VHC et PV
 Site de clonage 5'B : IRES Apaf-1, BiP, CAT-1, c-myc et VCIP
 Site de clonage 3'A : IRES Apaf-1, BiP, CAT-1, c-myc, VCIP et VHC
 Site de clonage 3'B : IRES EMCV, FMDV, HRV et PV

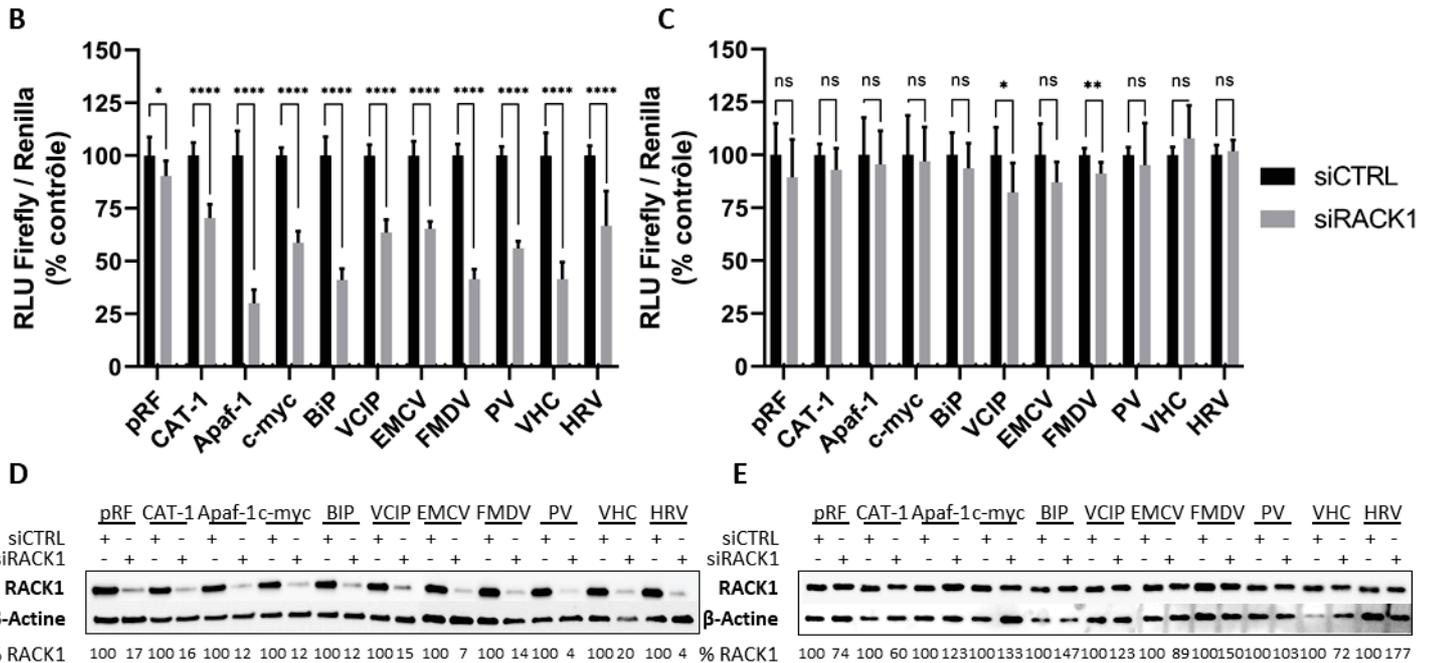


Figure 26. RACK1 régule la traduction IRES-dépendante d'ARN viraux et cellulaires.
 (A) Représentation schématique des rapporteurs bicistroniques contenant les différents IRES cellulaires (CAT-1, Apaf-1, c-myc, BiP, VCIP) et viraux (EMCV, FMDV, PV, VHC, HRV). La traduction du gène rapporteur de la *Firefly* est IRES-dépendante alors que la traduction de la *Renilla* est coiffe-dépendante. (B-C) Les activités luciférase de la *Renilla* et la *Firefly* ont été mesurées à l'aide de l'essai Dual-Luciferase Reporter (Promega). Les rapporteurs bicistroniques d'ADN ont été transfectés dans les cellules Huh7 (B) ou Huh7 exprimant RACK1 résistant aux siARN (C) après transfection d'un siCTRL ou siRACK1. Les valeurs représentent la moyenne ± SD normalisée par le contrôle de trois répliquats indépendants issus de trois expériences (n=3). (D-E) Western blot évaluant l'expression de la protéine RACK1 dans les cellules Huh7 (D) ou dans la lignée cellulaire Huh7 résistante aux siARN (E). Les valeurs représentent l'expression de RACK1 après normalisation à la β-actine. La significativité statistique a été déterminée par le test Mann-whitney non-apparié. Les valeurs P correspondent à : *, < 0,05 ; **, < 0,01 ; ***, < 0,001 ; ****, < 0,0001 ; ns signifie « non significatif ».

II. Découplage de la fonction ribosomique et de signalisation : construction d'un mutant RACK1 pour étudier l'interaction de RACK1 au ribosome

Afin de valider l'intérêt de la protéine RACK1 comme cible thérapeutique antivirale à large spectre, nous avons besoin de mieux comprendre son rôle dans la traduction IRES-dépendante. En effet, en plus de son rôle ribosomique dans l'initiation de la traduction, RACK1 possède des motifs WD, lui permettant d'interagir avec de nombreuses molécules impliquées dans différentes voies de signalisation cellulaire (Rodriguez et al., 1999). Son activité est donc critique pour de nombreuses fonctions fondamentales telles que le développement méiotique (McLeod et al., 2000), le système nerveux central (Angenstein et al., 2002), le cycle circadien (Robles et al., 2010), la croissance (López-Bergami et al., 2005) et la migration cellulaire (Kiely et al., 2009). Découpler le rôle ribosomique de RACK1 de son rôle dans la signalisation permettrait de définir une stratégie sûre et efficace de ciblage de la fonction ribosomique tout en préservant les autres fonctions cellulaires. Afin d'évaluer la faisabilité d'une telle approche et d'étudier spécifiquement le rôle de RACK1 au niveau ribosomique, nous avons développé deux stratégies basées sur des modèles génétiques cellulaires : l'une en CRISPR et l'autre en utilisant un modèle de surexpression.

A. Stratégie de knock-in sur la protéine RACK1 endogène par la technique du CRISPR/Cas9

1. Stratégie

Pour caractériser précisément le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante, nous avons projeté de créer un mutant RACK1 empêchant l'interaction au ribosome. Il a été décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que dans des cellules de mammifères que le double mutant RACK1^{R36D,K38E} empêche la liaison de RACK1 au ribosome et induit une diminution de la synthèse des protéines globales (Kim et al., 2017). Nous avons utilisé la technologie du CRISPR/Cas9 pour introduire des mutations ponctuelles R36D et K38E dans les cellules Huh7 (Figure 27). Notre objectif était de créer des cellules contenant l'un ou l'autre point de mutation et le double mutant puis d'analyser les phénotypes. L'analyse de l'ADN génomique de RACK1 montre que les deux cibles sont séparées par un intron de 1,3 kb, nous avons donc décidé d'utiliser des guides ciblant soit la région R36, soit la région K38. Après avoir vérifié la séquence de l'ADN génomique de RACK1 par PCR et séquençage (données non montrées) ; nous avons utilisé des outils bio-informatiques pour concevoir différents guides (cripor.tefor.net ; chopchop.cbu.uib.no). Ces outils prédisaient l'efficacité de clivage et le score off-target de chaque guide. Parmi les quelques séquences proposées, nous avons sélectionné sept guides R36 et six guides K38 coupant à une vingtaine de paires de base de la mutation (Tableau 1). Le site de clivage doit être proche de la cible pour permettre l'insertion des mutations par recombinaison homologe (HDR) avec une matrice d'ADN. Après avoir sélectionné les deux guides ayant la meilleure efficacité de clivage, nous avons introduit les

deux points de mutation par recombinaison homologue en utilisant deux donneurs d'oligodéoxynucléotides (ssODN) comme matrice.

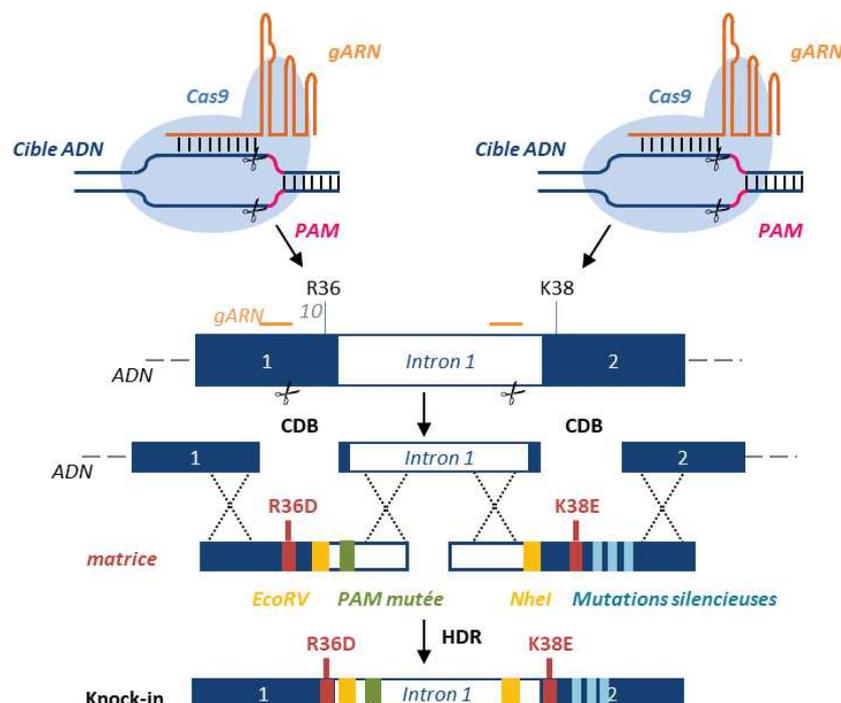


Figure 27. Stratégie de knock-in utilisant la technique CRISPR/Cas9 pour introduire les deux points de mutations R36D et K38E.

L'arginine 36 et la lysine 38 sont séparées par un intron de 1,3 kb dans la séquence d'ADN génomique ; séquentiellement deux guides différents ont été utilisés, l'un ciblant la région R36 et l'autre ciblant la région K38. Après cassure double brin (CDB) de l'ADN, deux donneurs d'oligodéoxynucléotides ont introduit les mutations par recombinaison homologue (HDR).

Guide	Séquence	PAM	Distance au site de clivage cible	Score d'efficacité	Nombre de off-target	Score MIT spec
R36g_6	TACGGACTAAGGTAGATTTC	AGG	+ 24 sens	37	53	83
R36g_8	GCCTCTCGAGGTACGGACTA	AGG	+ 13 antisens	49	9	99
R36g_9	CGCTACTACCCCGAGTTCC	CGG	- 25 sens	41	48	86
R36g_24	TTAGTCCGTACCTCGAGAGG	AGG	- 9 antisens	67	25	96
R36g_27	ACCTTAGTCCGTACCTCGAG	CGG	- 4 antisens	64	9	99
R36g_34	ATGATCTCTCCGCCTCTCG	AGG	+ 1 sens	59	57	91
R36g_39	CCTCTCCGCCTCTCGAGGTA	CGG	+ 6 sens	49	61	93
K38g_1	TAGATAAGACCATCATCATG	TGG	+ 14 sens	65	360	72
K38g_4	CATCATGTGGAAACTGACCA	GGG	+ 27 sens	78	211	71
K38g_6	TCATCATGTGGAAACTGACC	AGG	+ 26 sens	57	256	70
K38g_22	ATGATGGTCTTATCTAAAGG	AGG	- 13 antisens	67	122	78
K38g_25	ATGATGATGGTCTTATCTAA	TGG	- 8 antisens	48	161	77
K38g_78	ACCAGGGATGAGACCAACTA	TGG	+ 43 sens	60	111	85

Tableau 1. Séquences des guides ciblant les régions R36 ou K38 utilisés dans la stratégie de knock-in par CRISPR.

Différents guides ont été conçus avec les outils CRISPOR et CHOPCHOP (crispor.tefor.net ; chopchop.cbu.uib.no). Le score d'efficacité est prédit à l'aide de la version « Azimuth » basée sur les données produites par (Doench et al., 2016) et recommandé pour les guides exprimés dans les cellules utilisant un promoteur U6 ; plus le score d'efficacité est élevé, plus la prédiction de clivage est fiable. Le nombre off-target représente le nombre de cibles dans le génome sur lesquels peuvent s'apparier un guide en considérant jusqu'à quatre mésappariements. Le score de non-spécificité du MIT mesure l'unicité d'un guide dans le génome ; plus le score de spécificité est élevé, plus les effets off-target sont faibles.

2. Optimisation des méthodes de transfection

Afin de tester les différents guides, nous avons au préalable établi un protocole pour introduire la Cas9 et le guide CRISPR dans les cellules Huh7 qui ne sont pas facilement transfectables. Nous avons testé différentes méthodes transitoires de transfection (électroporation ou lipofection) avec un plasmide qui exprime la protéine GFP pour suivre l'efficacité de transfection. Nous avons analysé l'expression de la GFP par cytométrie en flux trois jours après la transfection. Nous avons comparé deux techniques d'électroporation : l'électroporation « classique » et la nucléofection. L'électroporation est une méthode de transfection physique qui applique un champ électrique aux cellules afin d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire permettant l'introduction de petites molécules (plasmides, siARN, anticorps). La nucléofection est une méthode de transfection basée sur l'électroporation qui utilise une combinaison de paramètres électriques, générés par un dispositif appelé Nucleofector™ avec des solutions spécifiques à chaque type cellulaire et permet le transfert d'une molécule directement dans le noyau des cellules. Nous avons observé 29% d'expression de la GFP avec la nucléofection alors que les cellules n'ont pas survécu à l'électroporation (Figure 28A). Ces résultats s'expliquent par le fait que l'électroporation est hautement toxique en raison des voltages élevés requis pour la transfection et induit une perte de viabilité cellulaire. En revanche, la nucléofection a été décrite comme étant une transfection très efficace dans les lignées cellulaires qui ont traditionnellement été décrites comme difficiles à transfecter par électroporation ainsi qu'avec d'autres méthodes non virales de transfection (Maasho et al., 2004).

Parallèlement, nous avons évalué l'efficacité de différents réactifs de transfection et avons réussi à augmenter le niveau d'expression de la GFP jusqu'à 96% avec le réactif ViaFect™ (Figure 28B, ratio 6:1). Dans cette condition, seules 41% des cellules ont survécu après la transfection (Figure 28C, ratio 6:1). Nous avons ajusté le ratio entre les quantités de réactif et d'ADN et avons conclu que le ratio 3:1 pour le réactif ViaFect™ donnait la meilleure efficacité de transfection en comparant l'expression de la GFP (73,8%) et la toxicité (33,4%) (Figure 28D). Nos résultats ont montré que le ratio 3:1 du réactif ViaFect™ est 2,5 fois plus efficace que la nucléofection (74% versus 29%). Nous avons donc utilisé le réactif ViaFect™ pour transfecter les guides avec les ssODN pour ainsi créer la lignée cellulaire contenant le mutant DE.

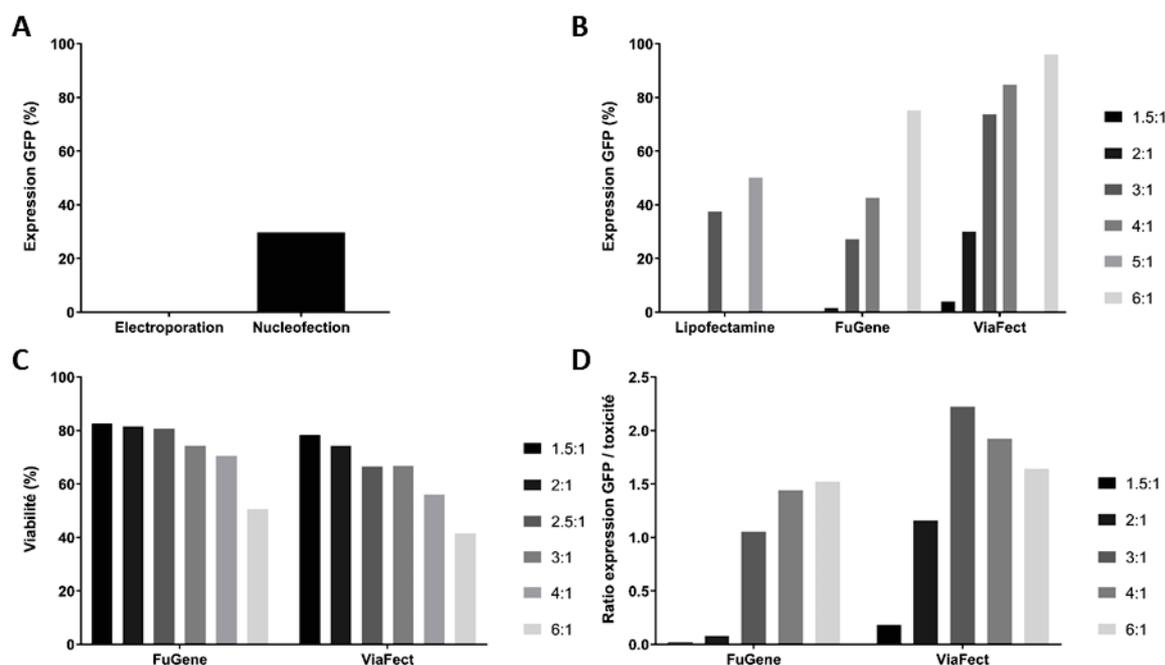


Figure 28. Optimisation de la transfection d'ADN dans les cellules Huh7.

Les cellules Huh7 ont été transfectées avec un plasmide exprimant la GFP. Différentes méthodes de transfection transitoires ont été comparées : électroperméabilisation par électroporation ou nucléofection (A), agents de transfection avec la Lipofectamine®, le FuGene® ou le ViaFect® (B). Différents ratio réactif:ADN ont été testés. Le pourcentage d'expression de la GFP (B) et la viabilité cellulaire (C) ont été mesurés par analyse de cytométrie en flux. (D) Le rapport entre le pourcentage d'expression de la GFP et la toxicité (1 – viabilité) a permis de définir l'efficacité de transfection. Les valeurs représentent la moyenne de trois réplicats indépendants issus d'une expérience (n=1).

3. Clonage des guides et conception des matrices contenant les mutations

Pour cibler les deux régions d'intérêt, nous avons cloné six guides et cinq guides ciblant respectivement les régions R36 et K38. Nous avons co-transfecté chaque guide avec un plasmide exprimant la protéine Cas9 pour créer des cassures double brin. Les mécanismes de réparation cellulaire ont créé des insertions ou des suppressions. Puis nous avons extrait l'ADN et amplifié les deux régions d'intérêt par PCR, après dénaturation et ré-hybridation, les mésappariements créés ont été reconnus et coupés par l'enzyme T7 endonucléase I pour produire deux bandes clivées. L'efficacité de clivage de chaque guide a été déterminée en calculant le rapport entre les bandes clivées et la bande parentale. Nous avons analysé l'efficacité du clivage de chaque guide pour sélectionner le meilleur (Figures 29A et 29B). L'efficacité de clivage de cinq des guides était trop faible pour être détectée (R36_g8, R36_g9, R36_g27, K38_g4 et K38_g22). Les deux guides R36_g6 et K38_g1 ont montré la meilleure efficacité de clivage avec respectivement 5,6% et 38% et ont été utilisés pour produire les lignées cellulaires mutantes de RACK1.

Les guides sélectionnés ont été clonés dans deux plasmides : l'un exprimant la protéine Cas9 ainsi que la protéine neonGreen, un analogue de la GFP, et un autre contenant une résistance

à la puromycine pour sélectionner les cellules transformées. Nous avons comparé l'efficacité de clivage des deux guides sélectionnés (R36_g6 et K38_g1) clonés dans les deux plasmides après sélection à la puromycine ou tri cellulaire basé sur l'expression de la neonGreen (Figure 29C). Nous avons observé une meilleure efficacité de clivage des guides provenant du plasmide exprimant la résistance antibiotique, 32% et 30% avec le plasmide puromycine comparé à 3% et 7% avec le plasmide neonGreen pour R36_g6 et K38_g1 respectivement. Nous avons utilisé uniquement les guides provenant des plasmides exprimant une résistance à la puromycine pour introduire les deux points de mutations.

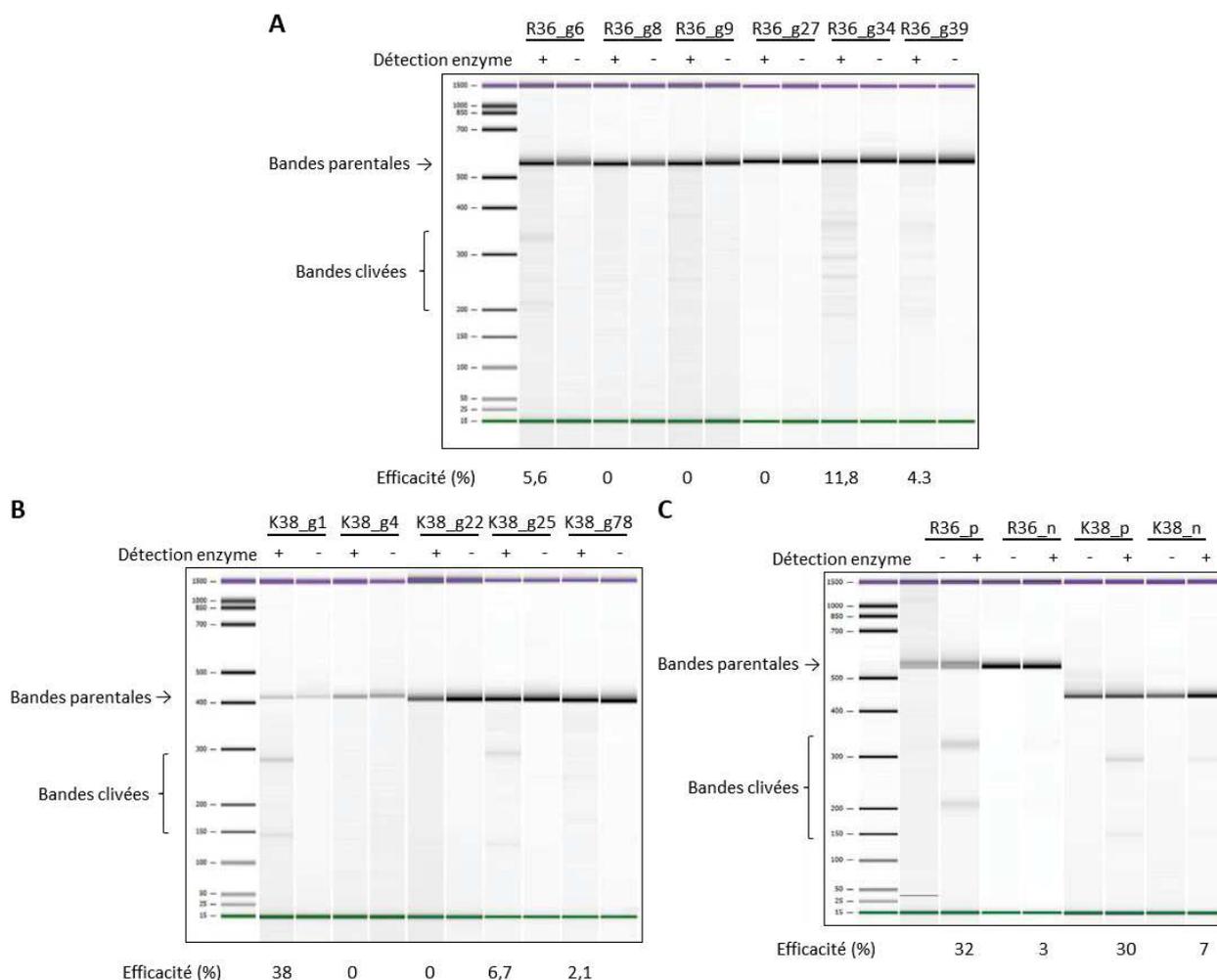


Figure 29. Évaluation de l'efficacité de clivage des guides.

(A-B) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec des guides ciblant les régions R36 (g6, g8, g9, g27, g34, g39) (A) et K38 (g1, g4, g25, g78) (B). Les tailles des bandes clivées attendues pour la région R36 sont : 207 et 329 pb (g6) ; 196 et 340 pb (g8) ; 159 et 377 pb (g9) ; 186 et 350 pb (g27) ; 184 et 352 pb (g34) ; 188 et 348 pb (g39). Les tailles des bandes clivées attendues pour la région K38 sont : 145 et 281 pb (g1) ; 158 et 268 pb (g4) ; 122 et 304 pb (g22) ; 126 et 300 pb (g25) ; 169 et 257 pb (g78). (C) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec les guides R36_g6 ou K38_g1 clonés dans des plasmides résistants à la puromycine (R36_p ou K38_p) ou exprimant la protéine neonGreen (R36_n ou K38_n). L'efficacité de clivage après sélection à la puromycine ou après tri des cellules exprimant la neonGreen a été analysée. Le clivage génomique a été observé avec le kit GeneArt® et analysé sur un Bioanalyzer®. Les bandes clivées ont été quantifiées et le pourcentage d'efficacité a été calculé comme suit :

$$\text{efficacité de clivage} = 1 - \left(1 - \frac{\sum \text{intensités des bandes clivées}}{\sum \text{intensités des bandes clivées et parentales}}\right)^{1/2}$$

Nous avons ensuite dessiné des oligodéoxynucléotides simple brin (ssODN) servant de matrice pour introduire les mutations ponctuelles R36D et K38E par recombinaison homologue (Tableau 2). Le ssODN R36D contient la mutation R36D (CGA → GAC), un site de restriction EcoRV et la PAM mutée. Nous avons muté la séquence PAM pour empêcher la Cas9 de couper les brins contenant la mutation R36D. Un site de restriction a été introduit pour identifier les clones contenant la mutation par digestion enzymatique. Trois ssODN différents contenant un site de restriction NheI ont été dessinés pour la mutation de K38E (AAG → GAA). Dans le cas des matrices K38E, nous n'avons pas été en mesure de muter la séquence PAM car nous ne pouvons pas modifier de façon silencieuse le codon correspondant à un tryptophane dans la séquence de RACK1 ; nous avons alors choisi d'introduire des mutations silencieuses dans les ssODN K38E1 et K38E2 afin d'empêcher l'hybridation entre le guide et la séquence RACK1 mutée.

ssODN	Séquence
R36D	cctct GAC ggtacggactaaggtagat Atcag Aaccg
K38E0	cttctgt GCTaGct cctttagat GaA accatcatcatgtggaaact
K38E1	cttctgt GCTaGct ccttcgta CGaA accatAatcatgtggaaact
K38E2	cttctgt GCTaGct cctttaga CGaA acAatcatAatgtggaaact

Tableau 2. Séquences des ssODN permettant d'introduire les mutations R36D et K38E utilisées dans la stratégie de knock-in par CRISPR.

Les nucléotides mutés sont en gras, les mutations R36D et K38E sont en rouge, les sites de restriction EcoRV et NheI en vert et en bleu respectivement, et la séquence PAM en violet. Les ssODN sont représentés sans leurs bras d'homologie.

4. Création des lignées cellulaires mutantes

Afin de créer les lignées cellulaires mutantes R36D et K38E avec les guides sélectionnés et les matrices dessinées, nous avons utilisé deux méthodes différentes de transfection/transduction. En effet, le plasmide résistant à la puromycine dans lequel nous avons cloné les différents guides et qui avait été sélectionné précédemment, est un plasmide lentivirus. Ce plasmide nous offrait l'opportunité soit de transfecter les guides de façon transitoire avec le réactif ViaFect™, soit de produire des lentivirus et de transduire les guides de façon stable. Nous avons utilisé parallèlement ces deux techniques puis comparé l'efficacité de clivage des guides (Figure 30). Nous avons co-transfecté le plasmide contenant les guides avec un plasmide exprimant la protéine Cas9 et les matrices d'ADN ssODN. En parallèle, nous avons transduit le lentivirus contenant les guides dans des cellules Huh7 exprimant de façon stable la protéine Cas9, et 24 heures plus tard nous avons transfecté les matrices ssODN avec le réactif ViaFect™. Nous avons analysé l'efficacité de clivage des guides après sélection à la puromycine et observé une meilleure efficacité de clivage dans les échantillons qui ont été transduits avec les lentivirus : 49% comparativement à 20% avec le réactif ViaFect™ pour le guide R36_g6 (Figure 30A) et de la même manière 37% versus 5%, 40% versus 6% et 35% versus 12% pour le guide K38_g1 transfecté respectivement avec les ssODN K38E0, K38E1 et K38E2 (Figure 30B). Ces résultats indiquent qu'il y a plus de chance de trouver des mutants obtenus par recombinaison homologue dans les pools de cellules qui ont été transduits avec les guides lentivirus.

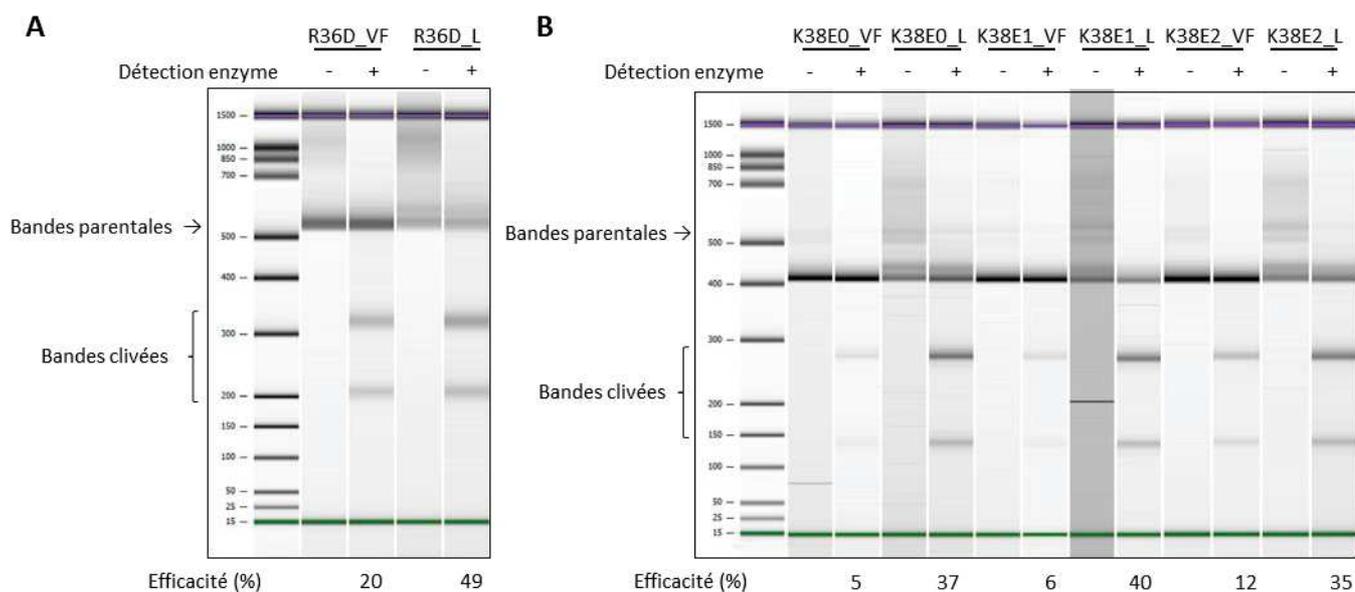


Figure 30. Évaluation de l'efficacité de clivage des guides dans les pools de mutants R36D et K38E.

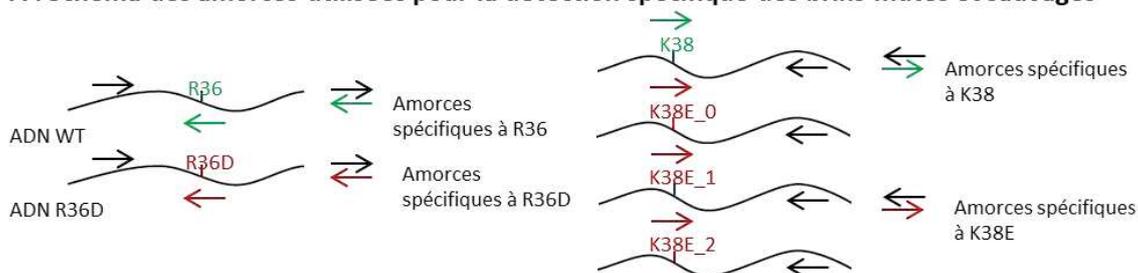
(A-B) Les cellules Huh7 ont été transfectées avec des guides R36_g6 (A) ou K38_g1 (B) provenant des plasmides résistants à la puromycine à l'aide du réactif ViaFect (VF) ou de lentivirus (L), et co-transfectées avec des ssODN (R36D, K38E0, K38E1 et K38E2). Les tailles des bandes clivées attendues pour les guides R36_g6 et K38_g1 sont respectivement de 207 et 329 pb, et 145 et 281 pb. Le clivage génomique a été observé avec le kit GeneArt® et analysé sur un Bioanalyzer®. Les bandes clivées ont été quantifiées et le pourcentage d'efficacité a été calculé comme suit :

$$\text{efficacité de clivage} = 1 - \left(1 - \frac{\sum \text{intensités des bandes clivées}}{\sum \text{intensités des bandes clivées et parentales}}\right)^{1/2}$$

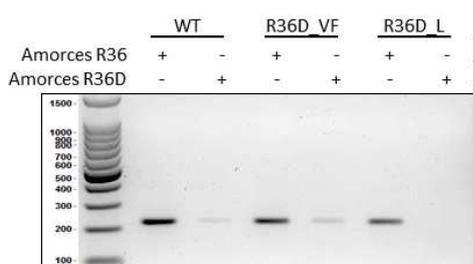
Nous avons voulu identifier les mutants dans les pools de cellules par PCR à l'aide de paires d'amorces qui amplifient spécifiquement l'ADN sauvage (WT) ou l'ADN muté (Figure 31A). Aucun produit de PCR n'a été observé lorsque nous avons amplifié l'ADN WT avec des amorces K38E confirmant que les amorces n'ont amplifié que l'ADN muté (Figure 31C). Nous avons conclu que les bandes visualisées dans des pools de cellules utilisant les paires d'amorces K38E0, K38E1 et K38E2 correspondent à la présence de mutants (Figure 31C). Nous avons détecté des bandes mutantes dans le pool R36D à partir d'une transfection transitoire, mais pas dans celui résultant de la transduction lentivirus (Figure 31B). Lorsque nous avons amplifié l'ADN sauvage avec des amorces R36D, nous avons pu voir une bande de faible intensité indiquant que cette paire d'amorce n'était pas complètement spécifique à l'ADN mutant. Nous avons testé différentes paires d'amorces et en avons identifié une qui amplifie uniquement l'ADN R36D (Figure 31F).

Parallèlement, nous avons digéré l'ADN extrait des pools R36D et K38E avec les enzymes EcoRV et NheI respectivement (Figures 31D et 31E). Alors que la digestion est effective dans les contrôles, nous n'avons pas observé de produits digérés pour les pools de mutants, reflétant très probablement le fait que la proportion d'ADN muté dans les pools était trop faible pour être détectée.

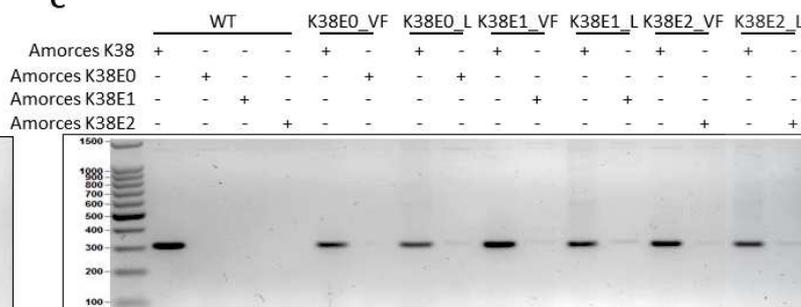
A : Schéma des amorces utilisées pour la détection spécifique des brins mutés et sauvages



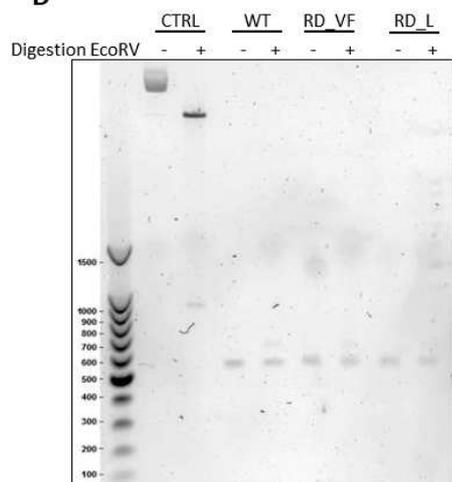
B



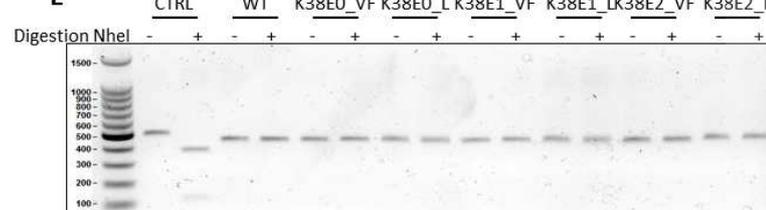
C



D



E



F

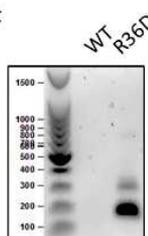


Figure 31. Méthodes de détection de la présence spécifique de mutants dans les pools de cellules transfectées avec les guides et les matrices ssODN.

Les cellules Huh7 ont été co-transfectées avec des guides utilisant le réactif ViaFect (VF) pour la transfection transitoire ou un lentivirus (L) pour la transfection stable avec les matrices ssODN R36D (B, D) ou K38E0, K38E1, K38E2 (C, E). (A-C) L'ADN génomique des cellules lysées a été amplifié par PCR à l'aide de paires d'amorces qui amplifient spécifiquement l'ADN WT (R36 ou K38), ou l'ADN muté (R36D, K38E0, K38E1 ou K38E2). Les tailles des produits de PCR amplifiés avec les amorces R36/R36D et K38/K38E0/K38E1/K38E2 attendues sont respectivement de 219 et 308 pb. (D-E) En parallèle, l'ADN génomique a été amplifié en utilisant des paires d'amorces amplifiant l'ADN WT et muté ; les échantillons ont été digérés avec l'enzyme EcoRV (D) ou l'enzyme NheI (E) pour R36D et K38E respectivement. L'ADN WT (536 pb pour R36 et 426 pb pour K38) a été utilisé comme contrôle négatif ; le plasmide neonGreen (9 927 pb) et le produit ERAP1 (483 pb) ont été utilisés comme témoins positifs pour la digestion EcoRV et NheI respectivement. Les tailles des bandes clivées par EcoRV et NheI attendues sont respectivement de : 882 et 9 045 pb (neonGreen), 207 et 328 pb (R36D) ; 114 et 369 pb (ERAP1), 115 et 311 pb (K38E). (F) L'ADN génomique des cellules Huh7 ainsi qu'un ADN synthétique pour la mutation R36D ont été amplifiés avec un deuxième lot de paires d'amorces qui amplifient spécifiquement l'ADN muté. L'ADN WT et l'ADN synthétique (179 pb) ont été utilisés comme contrôles négatif et positif respectivement. Les produits de PCR ont été analysés sur un gel contenant 1% d'agarose.

Pour isoler les cellules mutantes dans les pools de cellules Huh7 transfectées, nous avons créé une lignée cellulaire mutante à partir d'une cellule unique. Nous avons sélectionné le pool R36D résultant d'une transfection transitoire dans laquelle nous avons observé une efficacité de clivage de 20% du guide et détecté la mutation par amplification spécifique par PCR ; ainsi que les deux pools K38E0_L et K38E2_L transduits avec les lentivirus. Pour créer une lignée cellulaire mutante à partir d'une cellule unique, nous avons utilisé l'instrument automatisé Cytena™ qui distribue une cellule par puits. Nous avons préparé dix plaques de 96 puits pour chaque mutant et mis une cellule par puits. Nous avons optimisé les conditions de culture cellulaire à l'aide de milieu conditionné, et après prolifération cellulaire nous avons dupliqué les plaques. Une plaque a été congelée afin de remettre les cellules en culture ultérieurement, tandis que pour l'autre plaque l'ADN a été extrait afin de cribler les clones par PCR.

Pour identifier les mutants R36D ou K38E, nous avons utilisé des paires d'amorces qui amplifient spécifiquement les ADN R36D ou K38E_0 et K38E_2 respectivement. Nous avons utilisé des ADN synthétiques R36D, K38E_0 et K38E_2 comme contrôles positifs et l'ADN sauvage comme contrôle négatif pour confirmer que nous amplifions uniquement l'ADN muté. Pour le mutant R36D, nous avons détecté 11 clones pour lesquels les produits de PCR avaient la même taille que le contrôle positif sur les 431 clones testés. Et nous avons détecté 5 clones positifs avec les paires d'amorces amplifiant l'ADN K38E sur les 782 clones testés (données non montrées).

Pour confirmer ces résultats et définir l'état allélique des clones, nous avons utilisé la droplet digital™ PCR (ddPCR). Nous avons conçu des sondes qui se sont hybridées de façon compétitive avec un brin d'ADN sauvage ou un brin d'ADN muté. Ensuite, nous avons optimisé les conditions de ddPCR en testant différentes températures d'hybridation et le nombre de cycles de PCR (données non montrées). Nous avons vérifié la spécificité de chaque sonde en testant des échantillons contrôles ; il n'y avait que des copies WT dans l'échantillon sauvage et seulement des copies mutantes dans les échantillons d'ADN synthétique mutant appelés Gblocks (Figure 32). Le Gblock K38E a été conçu pour permettre l'hybridation des deux différentes sondes K38E reconnaissant l'ADN K38E0 et l'ADN K38E2. 11 clones R36D et 5 clones K38E ont été analysés, pour deux d'entre eux (R36D_1_12A, R36D_3_3G), le nombre de copies par microlitre était trop faible pour déterminer l'état allélique des clones (Figures 32A et 32B). Nous avons détecté uniquement de l'ADN sauvage pour les clones R36D_2_2B et K38E0_3_5H, et avons conclu que ces clones n'étaient pas des mutants. Pour les clones R36D_2_5B et R36D_3_1G, la ddPCR a montré que la mutation unique R36D a été introduite dans la moitié des allèles avec un pourcentage respectif de 42% et 55% des copies mutantes. Nous avons observé entre 20% et 33% de copies mutantes dans cinq clones R36D (Figure 32A) et environ 25% de copies mutées dans quatre clones K38E (Figure 32B). Ces résultats suggèrent que le nombre de copies de RACK1 dans les cellules Huh7 serait à minima de quatre. En effet, nous avons confirmé par ddPCR la présence de quatre copies de RACK1 dans les cellules Huh7 (données non montrées). Il a été observé dans divers caryotypes que les cellules Huh7 sont hétérogènes et que le nombre de chromosomes est variable, y compris pour le chromosome 5 contenant le génome de RACK1 (Kasai et al., 2018). Cette observation

pourrait augmenter la difficulté à obtenir une lignée cellulaire homozygote pour $RACK1^{R36D,K38E}$.

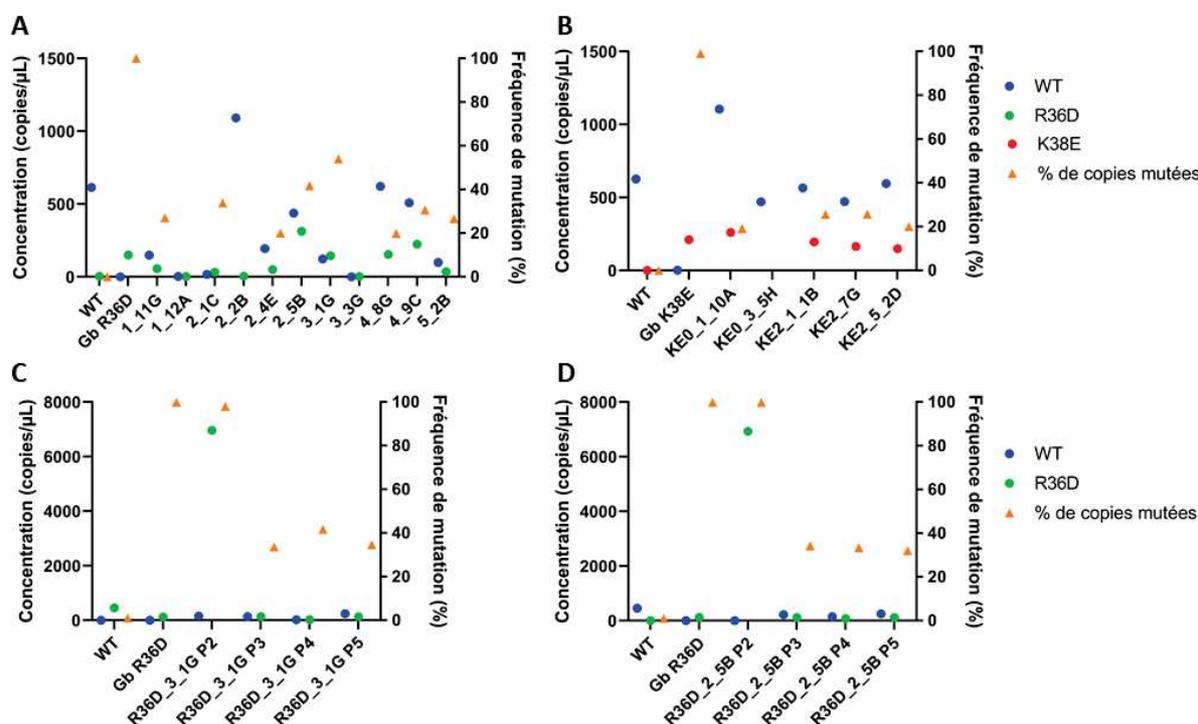


Figure 32. Observation de l'état allélique des lignées R36D et K38E par analyse ddPCR.

(A-B) Les clones détectés comme positifs par PCR spécifique ont été amplifiés par ddPCR à l'aide de paires d'amorces qui amplifient l'ADN WT (R36 ou K38) et l'ADN muté (R36D, K38E0 ou K38E2) pour détecter la concentration spécifique de copies WT ou mutées par microlitre. (C-D) Deux clones R36D avec une fréquence d'allèles mutés d'environ 50% (2_5B et 3_1G) ont été décongelés, un nouveau CRISPR a été effectué pour augmenter le pourcentage d'allèles mutés. Les cellules ont été maintenues en culture pendant cinq passages et le pourcentage de copies mutées au cours de la culture a été déterminé par ddPCR. La fréquence des copies mutées a été calculée par le logiciel QuantaSoft™.

Ensuite, nous avons décongelé les clones R36D_2_5B et R36D_3_1G contenant la plus forte concentration de copies mutées et avons fait une deuxième co-transfection transitoire avec le plasmide puromycine exprimant le guide R36_g6, le plasmide Cas9 et le ssODN R36D. Nous avons sélectionné les cellules résistantes à la puromycine et les avons gardées en culture jusqu'au passage 5 pour observer si le nombre d'allèles mutés était stable au fur et à mesure des passages. Nous avons réussi à augmenter le pourcentage de copies mutées à 99% (Figures 32C et 32D), mais avons observé que la fréquence diminue à un allèle muté sur quatre après un seul passage (R36D_2_5B P2 et R36D_3_1G_P2 comparés à R36D_5_2B P3 et R36D_3_1G P3). Nous avons émis l'hypothèse que la croissance des cellules exprimant $RACK1$ WT est plus rapide que celle des cellules mutées.

A ce stade, nous avons réussi à obtenir des lignées cellulaires exprimant les mutants hétérozygotes $RACK1^{R36D}$, et $RACK1^{K38}$ mais aucune lignée homozygote stable pour ces mutations. Nous nous sommes alors focalisés sur une autre stratégie pour obtenir une lignée cellulaire exprimant le mutant $RACK1^{R36D,K38E}$.

B. Expression du mutant RACK1 exogène et analyse de son association au ribosome

Dans cette deuxième approche, nous avons décidé d'exprimer de façon exogène la protéine RACK1 sauvage et mutée (Figure 33). Les clonages et l'établissement des lignées cellulaires ont été réalisés par Vincent Turon-Lagot (Thèse de Vincent Turon-Lagot, UMR_S1110, 2020). Les constructions plasmidiques codant pour ces deux protéines contenaient des résistances au siARN ciblant RACK1. Les protéines RACK1 exogènes expriment une étiquette Flag dans leur région C-ter permettant d'analyser spécifiquement leur expression avec un anticorps anti-Flag par western blot. Nous avons produit une lignée cellulaire stable exprimant en même temps RACK1 exogène (WT ou DE) et RACK1 endogène. Pour exprimer de façon transitoire seulement la protéine RACK1^{R36D,K38E} nous avons transfecté les cellules avec des siARN ciblant RACK1 endogène (Figure 33). Cette lignée nous permettait d'être dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les analyses de traduction IRES-dépendante où l'expression de RACK1 est silencée (Figures 35E et 35F).

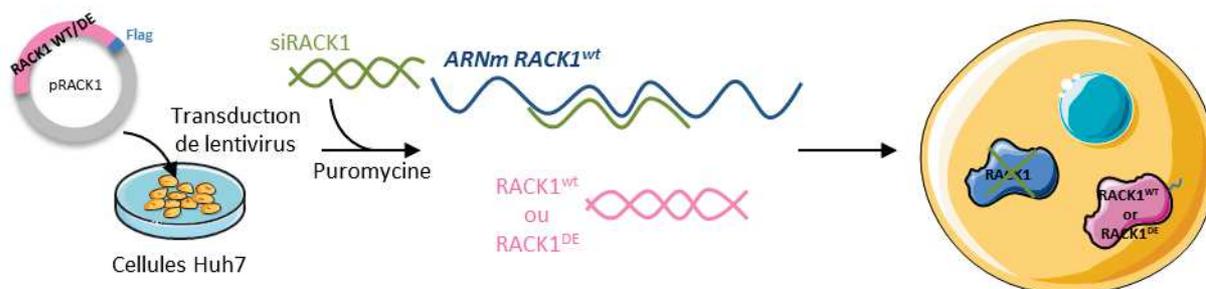


Figure 33. Stratégie utilisée pour exprimer la protéine RACK1 exogène contenant les mutations R36D et K38E.

Un plasmide exprimant RACK1 WT ou mutant (RACK1 DE) qui est résistant au siRNA ciblant RACK1 a été transduit dans les cellules Huh7. L'expression de RACK1 endogène a été éteint par transfection de siRACK1 pour exprimer seulement la protéine RACK1 exogène contenant une étiquette Flag.

Pour vérifier que le mutant empêche la liaison au ribosome, nous avons analysé le profil des polysomes de RACK1 sauvage et mutée. Dans cette technique, les ribosomes sont figés sur les ARNm qui sont en cours de traduction en utilisant la cycloheximide, un inhibiteur qui bloque l'avancée des ribosomes sur les ARNm et empêche l'élongation de la traduction (Schneider-Poetsch et al., 2010). Les différents composants du ribosome : la petite sous-unité 40S, la grande sous-unité 60S, le ribosome 80S mature et les polysomes sont séparés en fonction de leur densité sur un gradient de sucrose et identifiés en suivant l'absorbance à 260nm. Avant d'observer si les deux points de mutation R36D et K38E empêchent la liaison au ribosome, nous avons optimisé les conditions de profil des polysomes.

1. Optimisations de l'analyse du profil des polysomes

Nous avons testé différentes conditions pour optimiser le profil des polysomes à partir de la méthode décrite par (He and Green, 2013) que nous avons adaptée en testant les pourcentages de gradient de sucrose, les méthodes de lyse, ainsi que différents traitements pour immobiliser les ribosomes sur l'ARN.

Premièrement, les cellules Huh7 ont été prétraitées ou non avec une concentration finale de 100 µg/mL de cycloheximide pendant 10 minutes à 37°C pour immobiliser les ribosomes sur les ARNm en cours de traduction. Les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon de lyse contenant ou non de la cycloheximide puis les lysats cellulaires ont été séparés sur deux gradients de sucrose différents (5-40% et 5-45%). Sans traitement à la cycloheximide nous avons observé deux pics correspondant à la petite et à la grande sous-unité du ribosome (Figures 34A et 34B, profils noirs). En comparaison, lorsque nous ajoutons de la cycloheximide, nous avons observé un troisième pic correspondant au ribosome mature 80S ainsi que plusieurs pics (un à trois) correspondant aux polysomes (Figures 34A et 34B, profils rouges). Sans traitement cycloheximide le ribosome mature a tendance à se dissocier, c'est pourquoi le pic 80S était moins important dans les conditions sans traitement. Pour la suite des expériences nous avons décidé de traiter les cellules avec 100 µg/mL de cycloheximide et avons analysé les profils de polysomes sur un gradient de sucrose 5-45%. Le gradient de sucrose 5-45% permettait d'observer plus de polysomes qu'avec le gradient 5-40 % (Figure 34B) et nous permet d'extraire l'ARN des fractions de polysomes dans le but d'analyser les transcrits dont la traduction est régulée par RACK1.

Pour améliorer le profil des polysomes, nous avons décidé de comparer des conditions où les cellules sont prétraitées (PT) pendant 10 min à 37°C avec 100 µg/mL de cycloheximide avec des cellules qui ne sont pas prétraitées (NPT). Dans ces deux conditions, les tampons de lyse et les gradients de sucrose contenaient de la cycloheximide, et nous avons observé les mêmes profils (Figure 34C). Nous avons conclu que le prétraitement à la cycloheximide avant la lyse cellulaire n'était pas nécessaire pour figer les ribosomes sur l'ARN. Dans ces conditions nous avons observé qu'un seul pic de polysomes alors que nous nous attendions à voir trois pics comparativement au profil de la Figure 34B. Nous avons émis l'hypothèse que le gradient de sucrose ne devrait pas être de 5-45%, mais plutôt de 5-40% comme dans la Figure 34A.

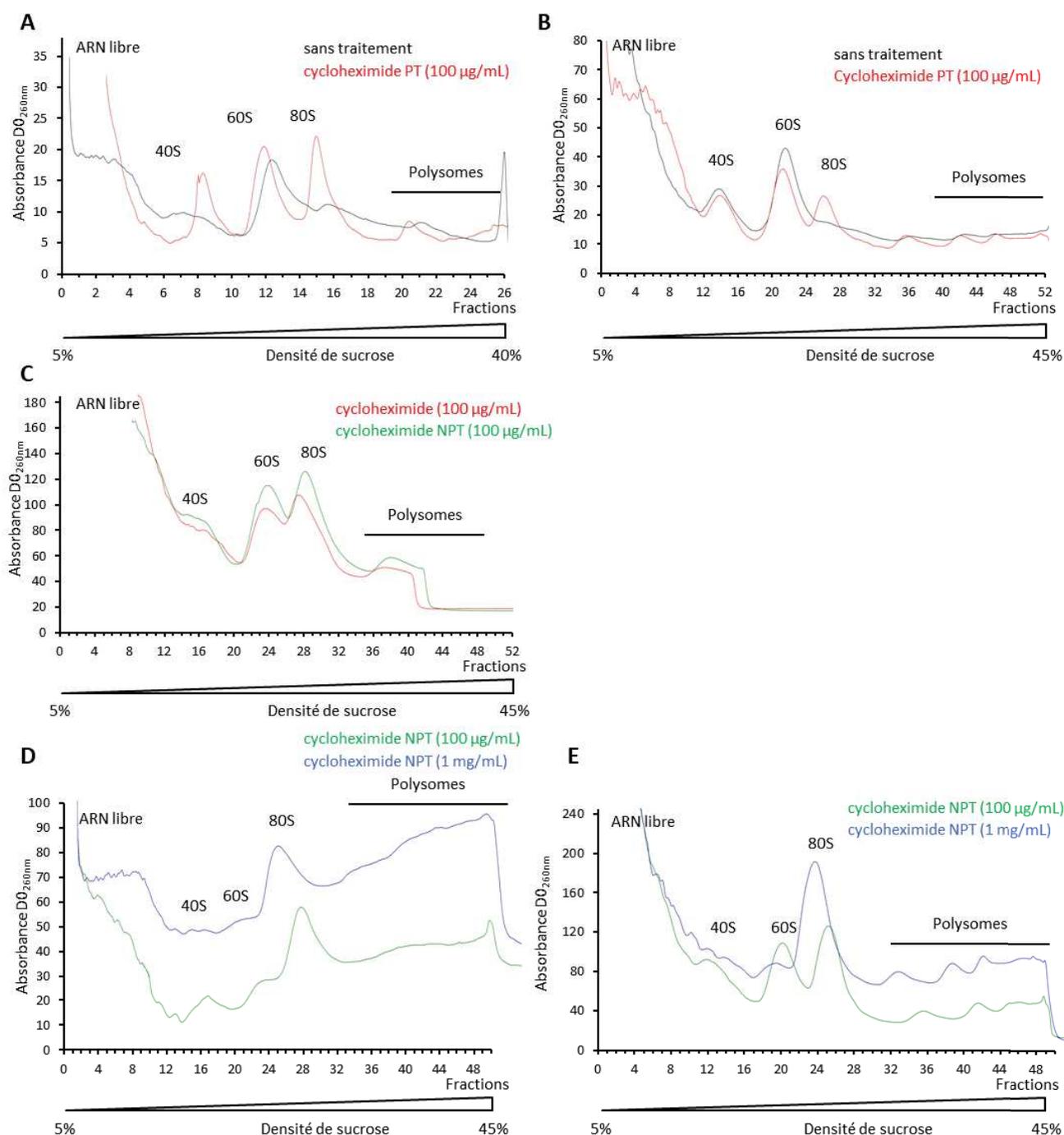


Figure 34. Optimisation des conditions de profil des polysomes.

Les cellules Huh7 ont été prétraitées avec ou sans 100 µg/mL de cycloheximide pendant 10 min à 37°C pour immobiliser les ribosomes sur l'ARNm. Ensuite, les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon de lyse contenant de la cycloheximide. Différentes populations de polysomes ont été fractionnées en fonction de leur taille sur un gradient de sucrose linéaire 5-40% (A) ou 5-45% (B-E) et l'absorbance à 260 nm a été mesurée. Différentes conditions ont été comparées : le prétraitement à la cycloheximide (PT) ou non (NPT) (C), différentes concentrations de cycloheximide : 100 µg/mL ou 1 mg/mL (D-E), et différentes conditions de lyse : soit les cellules ont été centrifugées et le culot a été resuspendu dans un tampon de lyse (2 mL/g) (A-D) ou soit les cellules ont été directement lysées dans le tampon de lyse (1 mL/plaque de Pétri 10 cm) (E).

Pour empêcher la dissociation du ribosome, nous avons augmenté la concentration de cycloheximide jusqu'à 1 mg/mL et avons comparé deux protocoles de lyse. Dans le premier protocole comme dans les expériences précédentes, les cellules Huh7 ont été récoltées et centrifugées, le culot a été congelé 10 min à -80 °C et les cellules ont été resuspendues dans un petit volume de tampon de lyse (2 mL/g \approx 400 μ L / 1 plaque de Pétri 10 cm) (Figure 34D). Dans le second protocole de lyse, les cellules ont été récoltées et resuspendues directement dans un grand volume de tampon de lyse (1 mL / 1 plaque de Pétri 10 cm) tel que décrit dans la méthode d'analyse des polysomes de (He and Green, 2013) (Figure 34E). Le deuxième protocole de lyse permettait d'obtenir un meilleur profil que le premier (Figure 34E versus Figure 34D). Lorsque nous avons augmenté la concentration de cycloheximide jusqu'à 1 mg/mL, le pic 80S était plus grand que le pic 60S (Figure 34E, profil bleu versus profil vert) indiquant que plus la concentration de cycloheximide est importante moins le ribosome peut se dissocier.

Ces séries d'expériences nous ont permis de trouver les conditions optimales d'analyse des profils de polysomes, qui ont par la suite été utilisées pour caractériser l'association du mutant RACK1 au ribosome. Les cellules sont récoltées et lysées dans 1 mL de tampon de lyse pour une plaque de Pétri 10 cm contenant 1 mg/mL de cycloheximide sans pré-traitement préalable, puis le lysat est déposé sur un gradient de sucrose 5-45%.

2. Analyse du profil des polysomes de RACK1 sauvage et mutée

Pour vérifier/confirmer si les mutations R36D et K38E empêchent la liaison de RACK1 au ribosome nous avons comparé le profil des polysomes des protéines RACK1 WT et RACK1 mutante. Les lignées cellulaires Huh7 exprimant RACK1 exogène WT et DE ont été transfectées avec des siRACK1 pour éteindre l'expression de RACK1 endogène. Après 72 heures de silencing les cellules ont été récoltées et lysées en suivant les conditions décrites dans la Figure 34E avec 1 mg/mL de cycloheximide, les lysats ont été chargés sur un gradient linéaire de sucrose 5-45%. Nous avons chargé la même quantité protéique de lysat pour chaque échantillon. Dans les cellules Huh7 exprimant RACK1 WT nous avons observé une diminution du pic 80S lors du silencing RACK1 par rapport au silencing contrôle (Figure 35B versus Figure 35A). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait d'avoir chargé moins de lysat en raison d'une légère augmentation de la mortalité cellulaire lorsque RACK1 est silencée. De plus, la diminution du pic 80S était encore plus importante dans les cellules où le mutant était exprimé et RACK1 endogène silencée (Figure 35D).

Pour étudier si ce défaut de nombre de ribosomes matures était dû à une différence dans le recrutement de RACK1 à la petite sous-unité, nous avons analysé par western blot la distribution de la protéine RACK1 dans les différentes fractions ribosomiques. Nous avons chargé le même volume d'échantillon pour chaque fraction et utilisé deux anticorps pour détecter d'un côté seulement la protéine exogène avec un anticorps anti-Flag, et de l'autre côté un anticorps anti-RACK1 qui détecte l'expression totale de RACK1 (à la fois l'endogène et l'exogène). Nous avons vérifié que le silencing de RACK1 fonctionnait en analysant l'expression

de RACK1 dans la lignée cellulaire Huh7 où nous avons observé une diminution de 90% d'expression après 72 heures de transfection siRACK1 (Figure 35E). Dans les cellules Huh7 exprimant RACK1 WT ou DE, il y a une diminution de 30% de l'expression totale de RACK1 (Figure 35E). Lorsque nous avons utilisé l'anticorps anti-Flag, nous n'avons détecté aucune bande protéique dans le lysat des cellules Huh7 prouvant que l'anticorps était bien spécifique à la protéine RACK1 exogène (Figure 35F). De plus, nous avons observé cinq fois plus de protéines exogènes que ce soit dans la lignée cellulaire mutante ou WT après le silencing de RACK1 comparé au contrôle, nous indiquant qu'en plus d'être résistant au siRACK1, RACK1 exogène est surexprimée dans les cellules silencées (Figure 35F).

Dans la lignée cellulaire où les protéines RACK1 WT endogène et exogène ont été exprimées, nous avons détecté la forme libre de RACK1 dans les fractions 1 à 3 et aussi la forme associée au ribosome dans les fractions 4 à 12 sauf pour la fraction 11 (Figure 35A). En parallèle, nous avons détecté la distribution de la protéine ribosomique RPS14 dans les différentes fractions pour vérifier que l'absence de RACK1 endogène et exogène dans la fraction 11 était directement liée à une perte d'échantillon (Figure 35A). Nous n'avons plus observé la forme libre de RACK1 lorsque l'expression de RACK1 endogène est éteinte (Figure 35B, fractions 1 à 3) suggérant que lors du silencing de RACK1, la protéine sauvage exogène est préférentiellement recrutée au ribosome.

Pour la lignée cellulaire mutante, nous nous attendions à voir une diminution du recrutement de RACK1 dans les fractions 40S, 80S et les polysomes ainsi qu'une augmentation de la proportion de la forme libre. Ceci a été confirmé car nous avons observé plus de forme libre pour la protéine RACK1 mutante que WT en comparant la distribution des protéines après silencing de RACK1 (Figure 35D versus Figure 35B, fractions 1 et 2). L'augmentation de la forme libre n'était pas liée à une quantité plus élevée de protéines dans les puits puisque nous avons détecté la même quantité de protéine RPS14 dans les conditions WT et mutante. Lorsque l'expression de RACK1 endogène est éteinte nous avons observé une augmentation de la forme libre RACK1-Flag par rapport à la condition siCTRL (Figure 35D versus Figure 35C, fractions 1 et 2) pouvant provenir de la surexpression du mutant suite à la perte d'expression de RACK1 endogène, qui a aussi été observée dans les lysats cellulaires (Figure 35F). Dans la condition où RACK1^{DE} est exprimée et que les cellules ont été transfectées avec un siRACK1, avec l'anticorps anti-Flag nous avons observé un faible recrutement de RACK1-Flag dans les fractions 40S, 60S, 80S et polysomales (Figure 35D, fractions 3 à 12) indiquant que la présence de la double mutation DE semble inhiber le recrutement de RACK1 au ribosome. Dans cette même condition, avec l'anticorps anti-RACK1 (ciblant RACK1 endogène et exogène) nous avons observé la présence de RACK1 au ribosome pouvant provenir de RACK1 endogène (Figure 35D). Le silencing de RACK1 endogène semble ne pas être efficace dans cette condition. Il est possible que la quantité de protéine RACK1 endogène qui n'a pas été éteinte par la transfection siRACK1 soit préférentiellement recrutée au ribosome pour maintenir ses fonctions ribosomiques. Nous avons conclu que le modèle développé n'était pas adapté pour étudier spécifiquement le rôle ribosomique de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante.

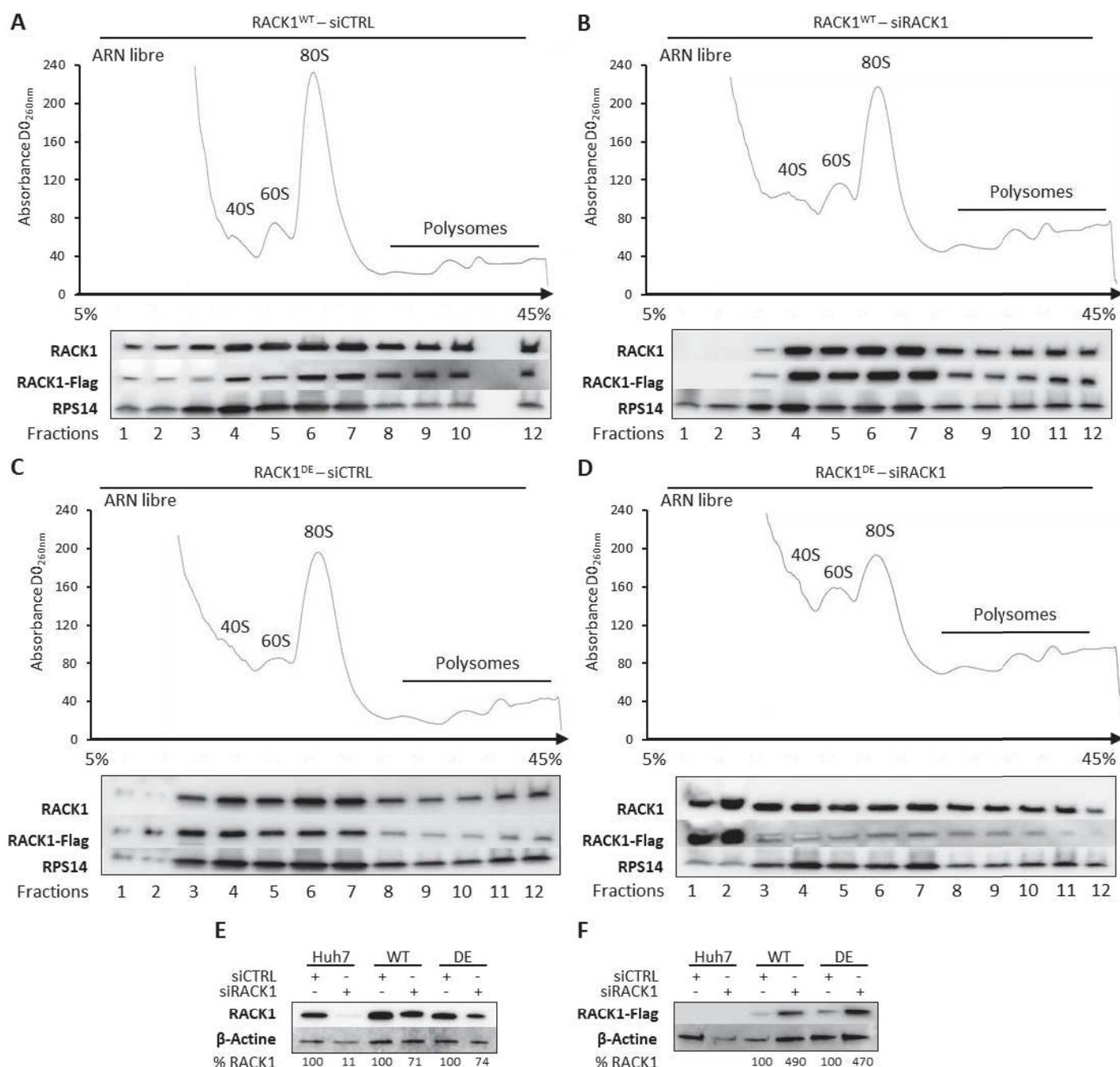


Figure 35. La double mutation R36D,K38E de RACK1 inhibe l'association de RACK1 au ribosome.

(A-D) Les cellules Huh7 exprimant RACK1 WT ou mutée (DE) résistante au siRACK1 et après 72h de silencing siCTRL ou siRACK1 ont été lysées dans le tampon de lyse contenant 1 mg/mL de cycloheximide. Les lysats cellulaires ont été séparés dans un gradient de sucrose de 5-45% et l'absorption à 260 nm a été mesurée. La distribution des protéines ribosomiques RACK1 et RPS14 dans les gradients a été analysée par western blot à l'aide des anticorps anti-RACK1, anti-Flag pour détecter RACK1-Flag, et anti-RPS14. (A-B) Cellules Huh7 exprimant RACK1 WT et transfectées avec un siCTRL (A) ou siRACK1 (B). (C-D) Cellules Huh7 exprimant RACK1 DE et transfectées avec un siCTRL (C) ou siRACK1 (D). (E-F) Dans les lysats cellulaires les niveaux d'expression de RACK1 ont été quantifiés par analyse western blot en utilisant l'anticorps anti-RACK1 pour détecter RACK1 endogène et exogène (E) ou un anticorps anti-Flag pour détecter seulement RACK1 exogène (F). Les valeurs représentent l'expression de RACK1 après normalisation à la β-actine.

Dans la première partie de ma thèse nous avons observé que RACK1 est impliquée à la fois dans la traduction IRES-dépendante d'un large spectre d'ARN viraux et cellulaires ce qui pourrait en faire une cible de choix pour le développement d'antiviraux à spectre large. Pour comprendre le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante nous avons besoin de cibler spécifiquement le rôle ribosomique de RACK1 indépendamment de ses autres fonctions dans la cellule. Afin d'établir le mutant RACK1^{R36D,K38E} décrit comme empêchant la liaison de RACK1 au ribosome (Kim et al., 2017), nous souhaitons introduire ces deux points de mutation dans une lignée Huh7 dérivée d'hépatocarcinomes humains. Dans une première stratégie nous avons utilisé la technologie du CRISPR/Cas9 pour introduire par knock-in les simples mutations R36D et K38E pour ensuite produire la double mutation de façon séquentielle. Avec cette technologie nous avons généré des lignées cellulaires issues d'un clone unique contenant les simples mutations. L'analyse de la fréquence allélique de la mutation par ddPCR nous a permis d'identifier 6 et 4 clones hétérozygotes pour les mutations RACK1^{R36D} et RACK1^{K38E} respectivement.

Dans une seconde stratégie nous avons exprimé de façon exogène le mutant DE contenant des résistances au siARN ciblant RACK1 et avons éteint de façon transitoire l'expression de RACK1 endogène par transfection siRACK1. Nous avons caractérisé le recrutement de la protéine RACK1 au ribosome par analyse des profils de polysomes. Avec cette technique, en condition de silencing de RACK1 endogène et de surexpression du mutant DE, nous avons observé que la protéine RACK1^{DE} n'était plus recrutée au ribosome mais que dans notre modèle, le knock-down de RACK1 endogène ne semblait pas être efficace.

En conclusion, ce modèle ne nous permettait pas d'étudier de façon spécifique la fonction ribosomique de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante afin de comprendre le rôle de RACK1 dans les maladies IRES-dépendantes. Il serait intéressant par criblage d'une banque de petites molécules d'identifier un inhibiteur de l'interaction entre RACK1 et le ribosome.

PARTIE II. Rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral

I. RACK1 régule l'expression de la cytokine pro-inflammatoire CXCL10

Un autre aspect des études de mon laboratoire porte sur le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) notamment suite à des infections virales comme le VHC. RACK1 est fortement exprimée dans le CHC où elle contribue à la tumorigenèse (Ruan et al., 2012). Il avait été identifié au laboratoire que RACK1 régule l'expression de chimiokines comme le chimioattractant CXCL10 dont le niveau d'expression est un facteur de pronostic pour la survie globale chez les patients atteints d'un CHC (Li et al., 2017). Pour étudier l'implication de RACK1 dans l'expression de CXCL10 dans le CHC, nous avons utilisé un modèle cellulaire Huh7 dérivé d'hépatocarcinomes humains où l'expression de RACK1 est éteinte de façon transitoire avec un siARN ciblant RACK1. Nous avons testé différents temps après la transfection du siRACK1, et avons observé 88% de baisse d'expression de RACK1 après 72 heures et 96 heures de silencing par rapport aux conditions Mock ou siCTRL (Figure 36A). À 72 heures, nous avons analysé l'expression de CXCL10 et avons observé 20 fois plus d'expression du transcrite CXCL10 dans la condition où RACK1 est silencieuse par rapport aux contrôles (Figure 36B). Comme RACK1 peut agir à la fois dans la transduction du signal et dans le contrôle traductionnel des ARNm, nous avons analysé la stabilité de l'ARNm CXCL10 lorsque l'expression de RACK1 est éteinte. Après 48 heures de transfection siARN, nous avons analysé la cinétique de dégradation de l'ARNm CXCL10 à 0, 2, 4, 8 et 24 heures en présence ou en absence d'un traitement à l'actinomycine-D, un antibiotique qui bloque l'activité de la polymérase et la synthèse de nouveaux ARNm CXCL10. Comme prédit, sans actinomycine-D, l'expression de l'ARNm CXCL10 est stable dans les conditions Mock et siCTRL, au contraire, nous avons observé 5 fois plus de transcrits après 72 heures de silencing de RACK1 (Figure 36C, symboles solides). Lorsque la transcription est bloquée par l'actinomycine-D, nous avons observé que la cinétique de dégradation de l'ARN est la même dans les conditions Mock, siCTRL et siRACK1 avec une diminution de 80% de l'expression de l'ARNm CXCL10 après 24 heures de traitement par rapport au temps zéro (Figure 36C, symboles vides). Parallèlement, nous avons vérifié le silencing de RACK1 après 48 et 72 heures de transfection correspondant au début et à la fin de la cinétique (Figure 36D). Ces résultats indiquent que le niveau de transcrits observé après le silencing de RACK1 provient d'une augmentation de la transcription de CXCL10 plutôt que d'une stabilisation de l'ARNm. Les résultats obtenus suggèrent que RACK1 est un régulateur négatif de l'expression de la cytokine CXCL10 via la signalisation des voies de l'inflammation dans les cellules Huh7.

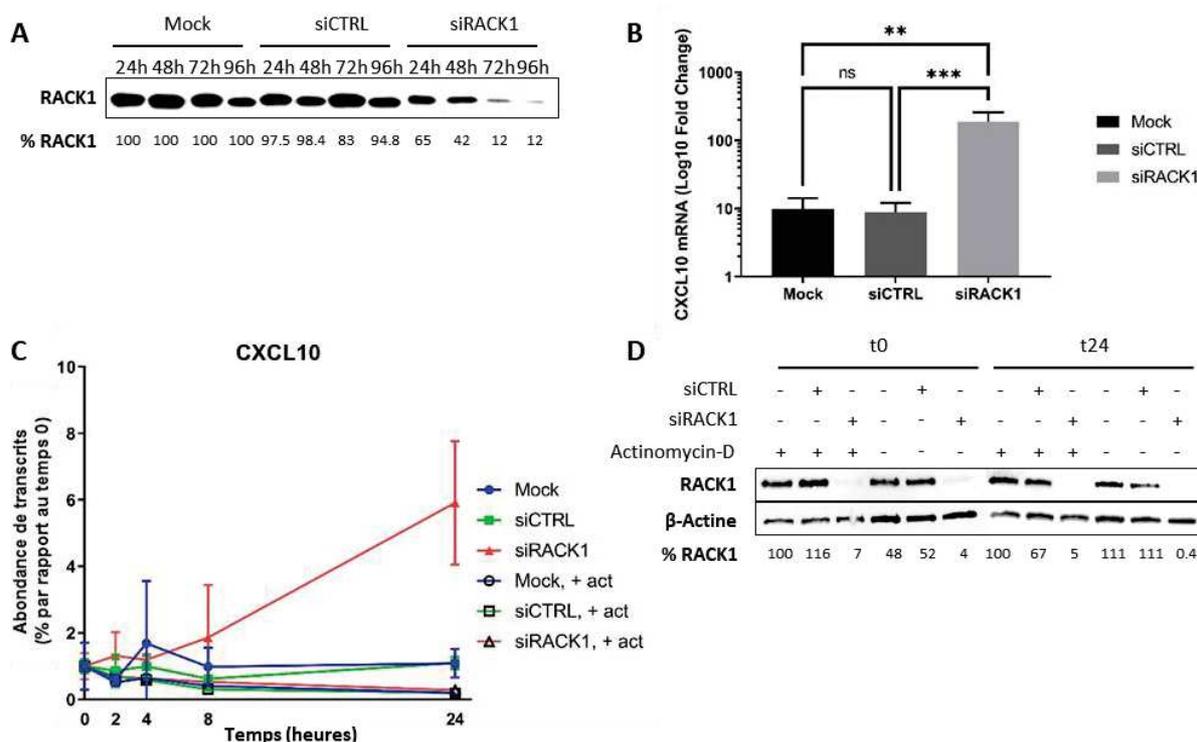


Figure 36. L'inhibition de RACK1 induit une augmentation de l'expression de CXCL10 dans le CHC.

(A) Analyse de l'expression de RACK1 par western blot dans les cellules Huh7 après 24h, 48h, 72h et 96h de transfection avec un siCTRL et un siRACK1. Les valeurs représentent le pourcentage de knock-down de RACK1 après normalisation stain free. (B) Détection de l'expression de CXCL10 lors du silencing de RACK1 par RT-qPCR. (C) Analyse de la dégradation de l'ARNm CXCL10 par RT-qPCR après 72h de silencing de RACK1. Cinétique de dégradation avec et sans incubation à l'actinomycine-D pendant 24h. (D) Le niveau d'expression de RACK1 a été analysé par western blot dans les cellules Huh7 après transfection de siCTRL et siRACK1, et avec et sans incubation à l'actinomycine-D. Les valeurs représentent l'expression de RACK1 après normalisation à la β-actine. Pour les analyses de RT-qPCR, les valeurs représentent la moyenne ± SD de trois réplicats indépendants issus de trois expériences (n=3). La significativité statistique a été déterminée par le test Kruskal-Wallis (B). Les valeurs P correspondent à : **, < 0,01 ; ***, < 0 001 ; ns signifie « non significatif ».

Nous avons émis l'hypothèse que dans le contexte du CHC RACK1 pourrait favoriser la progression du cancer en inhibant la réponse pro-inflammatoire des cytokines. Les cytokines peuvent agir comme des signaux dans le microenvironnement tumoral afin d'influencer le destin final de la tumeur. Les macrophages se trouvent parmi les populations qui composent le microenvironnement et sont activés par divers stimuli pour se différencier en deux sous-populations (M1 et M2) afin de bloquer ou promouvoir le développement tumoral (Ruytinx et al., 2018; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Récemment, il a été décrit que la surexpression de RACK1 dans le carcinome épidermoïde oral (OSCC) est associée à l'inhibition du recrutement des macrophages et à l'augmentation du rapport M2/M1 dans l'environnement de la tumeur d'une manière NF-κB dépendante (Dan et al., 2020). Considérant nos résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que le silencing de RACK1 induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires pourrait moduler la polarisation des macrophages dans le microenvironnement tumoral et favoriser la progression du CHC.

II. Rôle de RACK1 dans la polarisation des macrophages de type M1 et M2

A. Mise au point d'outils d'identification des populations de macrophages

1. Optimisation de la polarisation *in vitro* des macrophages dérivés des THP-1

Pour étudier le rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral hépatique, nous avons dans un premier temps développé des outils afin d'identifier les populations de macrophages de type M1 et M2, puis vérifié le rôle de RACK1 dans le microenvironnement de l'OSCC pour ensuite étudier RACK1 dans le contexte du CHC.

Nous avons développé un essai de polarisation *in vitro* des macrophages dérivés des THP-1. Les cellules THP-1 sont issues d'une lignée monocyttaire humaine qui a la capacité de mimer un phénotype proche des macrophages primaires (Maess et al., 2014) et qui est actuellement utilisée comme modèle pour étudier les macrophages humains (Chanput et al., 2014). Dans l'essai de polarisation *in vitro* nous avons différencié les cellules THP-1 en macrophages non polarisés (M0) en ajoutant 200 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ; puis les macrophages M0 ont été polarisés en macrophages de type M1 ou M2 en ajoutant respectivement 20 ng/mL d'IFN- γ et 100 ng/mL de LPS ou 20 ng/mL d'IL-4 et 20 ng/mL d'IL-13 (Figures 37A à 37G) tel que décrit dans le protocole adapté (Tjiu et al., 2009). Dans la littérature, la concentration de PMA et la durée du traitement varient selon les études. Pour obtenir les meilleures conditions de différenciation M0, nous avons testé différentes concentrations de PMA (données non montrées) et comparé 24 à 48 heures de traitement. Nous avons identifié les populations THP-1 et M0 à l'aide des marqueurs de surface cellulaire CD32 et CD14 par cytométrie en flux. En effet, il a été décrit que les monocytes THP-1 expriment le marqueur CD32 mais pas le CD14 et qu'en réponse à la PMA l'expression du CD32 est diminuée contrairement au CD14 qui est augmentée (Forrester et al., 2018). Lorsque nous avons comparé l'expression de CD32 et CD14 dans les macrophages M0 avec les THP-1, nous avons observé une population positive de CD14 après 48 heures de différenciation PMA (12% à 48h versus 0,72% à 24h), et avons observé que la diminution de l'expression du CD32 était plus importante après 48 heures qu'après 24 heures de traitement (Figure 37H). Nous avons donc décidé de différencier les THP-1 en macrophages en utilisant 48 heures de traitement PMA pour la suite de nos expériences (Figure 37C). Ensuite, nous avons testé 24 ou 48 heures de stimuli pour induire la polarisation M1 et M2. Après 24 et 48 heures de traitement IFN- γ /LPS nous avons observé que les cellules adoptaient une morphologie étoilée typique des macrophages M1 (Figures 37D et 37E) et exprimaient le même niveau de CD40 (Figure 37I panel de gauche). Au niveau morphologique, nous ne pouvions pas discriminer les populations M0 et M2 (Figure 37C versus Figures 37F et 37G), mais nous avons observé qu'après 24 heures de traitement IL-4/IL-13 les cellules exprimaient le marqueur de surface cellulaire CD209 et que le niveau d'expression n'augmentait pas après 48 heures de traitement. Nous avons alors décidé d'utiliser la condition 24 heures de traitement pour polariser les macrophages en type M1 et M2 afin de tester différents anticorps spécifiques aux marqueurs de surface de chaque population dans le but de constituer un panel d'anticorps en cytométrie en flux.

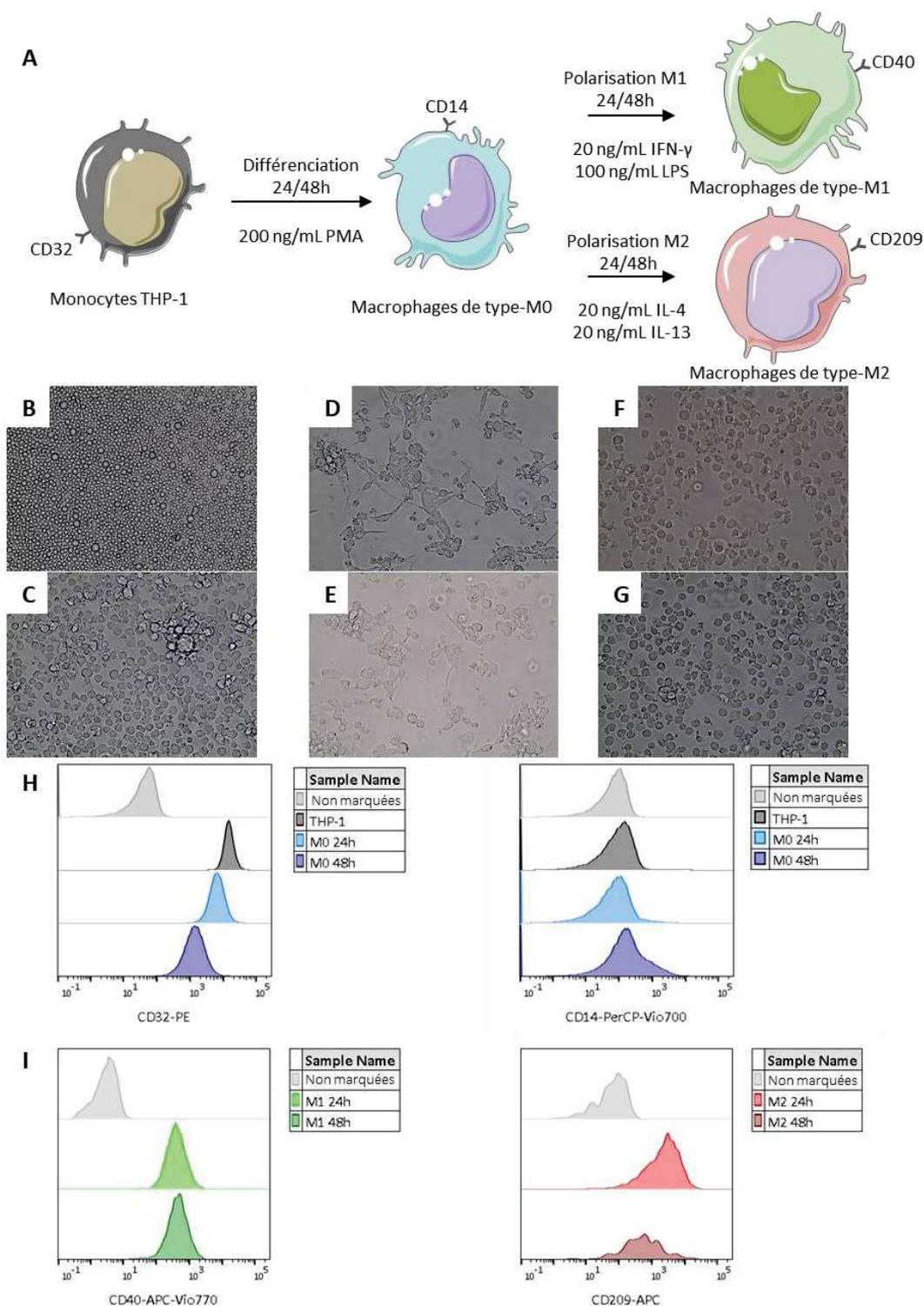


Figure 37. Optimisation de la polarisation des macrophages de type M1 et M2 dérivés de THP-1. (A) Représentation schématique du protocole. (B-G) Images de microscopie des différentes populations de cellules. Les cellules THP-1 (B) ont été différenciées en macrophages après 24h ou 48h (C) de traitement PMA puis polarisées en macrophages de type M1 après 24h (D) ou 48h (E) de traitement IFN-γ/LPS, ou en macrophages de type M2 après 24h (F) ou 48h (G) de traitement IL-4/IL-13. (H) Après 24h et 48h de traitement PMA, les marqueurs de surface cellulaire des macrophages M0 ont été identifiés avec les anticorps CD32-PE et CD14-PerCP-Vio700 en cytométrie en flux. (I) Après 48h de différenciation suivie de 24h ou 48h de polarisation, les marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des macrophages de type M1 et M2 ont été identifiés respectivement par les anticorps CD40-APC-Vio770 ou CD209-APC en cytométrie en flux.

2. Mise au point d'un panel d'anticorps d'identification des populations M1 et M2 par cytométrie en flux

Nous avons testé différents marqueurs de surface cellulaire qui ont été décrits dans la littérature comme étant exprimés dans les différentes populations de macrophages : le CD14 pour les M0 et M1, le CD16 pour les M0, le CD32 pour les THP-1 et M2, les CD40 et CD86 pour les M1, les CD163, CD206 et CD209 pour la population M2 (Figure 38A). Dans nos expériences, nous n'avons observé aucune expression des CD16, CD163 et CD206 dans les populations de THP-1, M0, M1 et M2 (Figures 38A et 38B). Les cellules THP-1 de monocytes exprimaient le marqueur de surface CD32 et nous avons observé une diminution de son expression après différenciation des monocytes en macrophages. Il a été décrit qu'après traitement aux IL-4 et IL-13 l'expression de CD32 augmente dans les macrophages de type M2 comparé au macrophages non polarisés M0 (Forrester et al., 2018). Nous avons observé un décalage positif du signal CD32 dans les macrophages de type M2 mais ce décalage n'est pas suffisamment important pour nous permettre de discriminer la population M1 de la population M2 (Figure 38A, CD32). Dans deux expériences indépendantes nous avons obtenu des résultats contraires concernant l'expression du CD14 ; dans la première expérience le traitement PMA induisait une augmentation de l'expression du CD14 dans les macrophages, et dans la seconde expérience nous n'avons détecté aucune population CD14 positive (Figure 38A, deux histogrammes de gauche). Le CD14 est l'un des marqueurs les plus décrits dans les macrophages activés dérivés de lignées cellulaires primaires, en revanche son expression dans les macrophages dérivés de cellules THP-1 est controversée. En effet, il a été décrit que les conditions de culture cellulaire des THP-1 peuvent modifier leur réponse au traitement à la PMA et particulièrement l'expression du CD14 (Aldo et al., 2013). C'est pourquoi nous avons décidé de ne pas utiliser le CD14 comme marqueur discriminant les cellules THP-1 non différenciées des cellules différenciées. Pour identifier la population de type M1 nous avons marqué les cellules avec les anticorps CD40 et CD86 ; le marqueur CD40 était plus exprimé dans la population M1 que le CD86 (70% versus 23%) (Figure 38B). Après traitement aux IL-4/IL-13 nous avons observé une augmentation de l'expression du CD209, 35% de population positive dans les macrophages de type M2 comparés à 6% dans les macrophages non polarisés (Figure 38B). Ensuite, nous avons testé le panel d'anticorps CD40, CD209 sur les différentes populations ainsi que les isotypes contrôles de chaque fluorochrome (Figure 38C). Seule la population M1 était positive pour le marqueur CD40 (Figure 38C, panel de gauche). Pour le marqueur CD209 nous avons observé une population positive dans les macrophages de type M2 et une légère expression dans les macrophages M0 (Figure 38C, panel de droite) ; nous avons ensuite calculé le fold change de l'intensité moyenne de fluorescence (FMI) des cellules marquées avec le CD209 par rapport à la FMI de l'isotype contrôle, ce qui nous a permis de discriminer de façon significative ($p < 0,0001$) les macrophages de type M2 par rapport aux autres populations ; et il en est de même pour le CD40 avec les M1 (Figure 38D). Ces différentes expériences nous ont permis de développer et de valider un panel d'anticorps permettant d'identifier les macrophages de type M1 et M2 selon l'expression de leurs marqueurs de surface cellulaire (M1 : CD40+ ; M2 : CD209+) par cytométrie en flux.

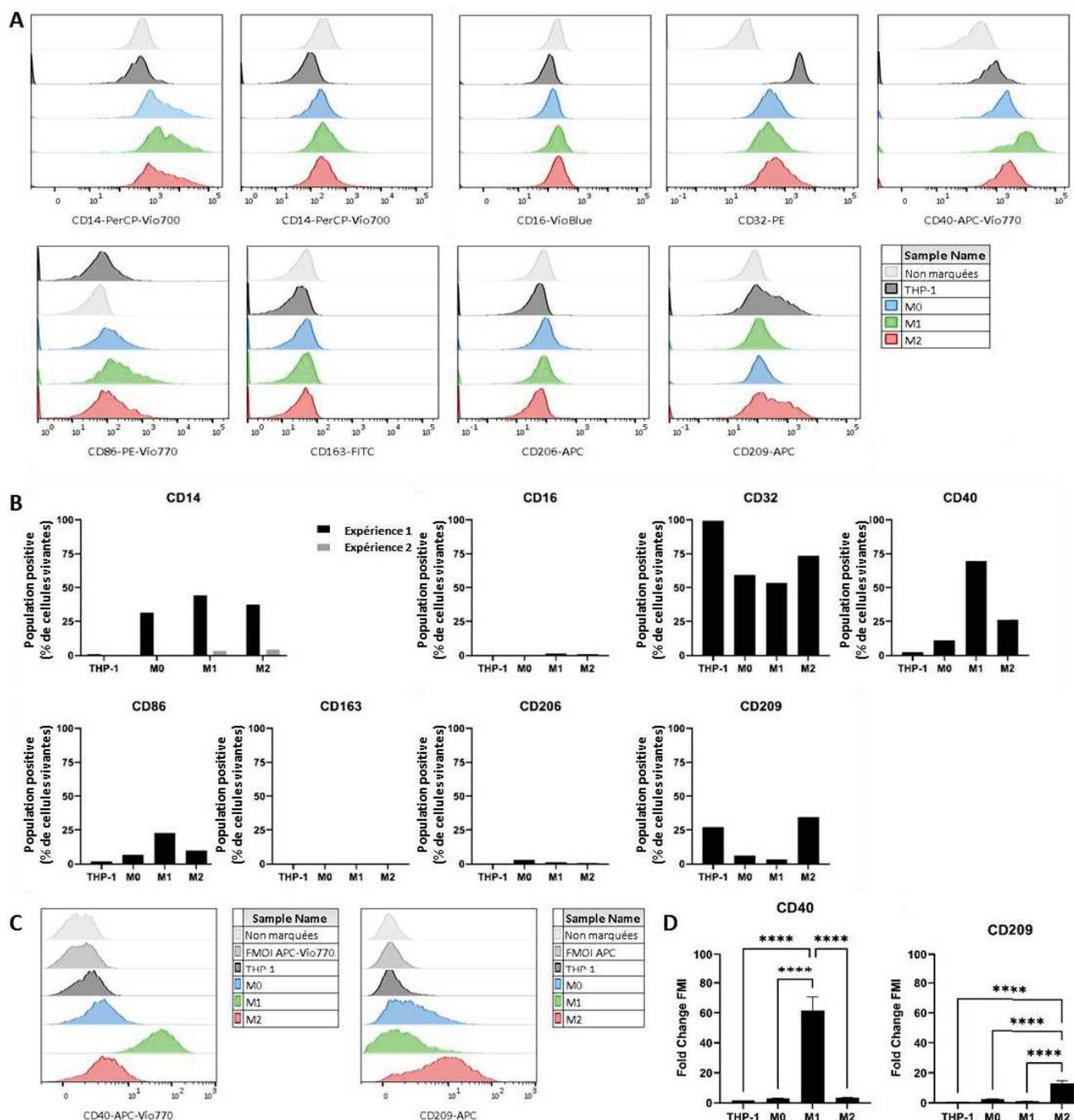


Figure 38. Validation des marqueurs de surface cellulaire spécifiques des populations de macrophages de type M1 et M2.

(A) Les populations de cellules THP-1, macrophages M0 différenciés pendant 48h, macrophages polarisés pendant 24h en type M1 et M2 ont été marquées avec différents anticorps pour identifier les marqueurs de surface cellulaire qui sont spécifiques à chaque population par cytométrie en flux. (B) Représentation du pourcentage de population positive pour les différents anticorps testés. (C) Chaque population de cellules a été marquée avec les anticorps CD40-APC-Vio770 et CD209-APC pour valider le panel d'identification des macrophages de type M1 et M2. (D) Représentation de l'expression des CD40 et CD209 dans les populations THP-1, M0, M1 et M2. L'expression du CD40 ou CD209 correspond au fold change de la FMI des cellules marquées par rapport à la FMI de l'isotype contrôle. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD de trois réplicats indépendants issu d'une expérience (n=1). La significativité statistique a été déterminée par le test ANOVA à une voie. La valeur P correspond à : ****, < 0,0001.

3. Identification des populations M1 et M2 par détection des cytokines sécrétées

Ensuite, nous souhaitons identifier les macrophages de type M1 et M2 en détectant la sécrétion de cytokines spécifiques à chaque population. Nous avons utilisé un essai basé sur des billes multiplexées afin d'identifier huit cytokines différentes dans un même échantillon par cytométrie en flux. Nous avons polarisé les macrophages comme décrit précédemment dans une plaque 12 puits avec 24 heures de traitement, nous avons observé une augmentation 100 fois supérieure de la sécrétion de CXCL10, IL-1 β et CCL-3 dans les surnageants des macrophages M1 par rapport au M0 et M2, ainsi qu'une augmentation 10 fois supérieure de la sécrétion d'IL-6 (Figure 39). Les concentrations des cytokines IFN- α , IFN- γ , IL-10 et IL-12 dans les surnageants M0, M1 et M2 étaient sous le seuil de détection défini par la gamme standard. En conclusion, l'essai en billes multiplexées ne pourra être utilisé que pour détecter les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β , CCL3 et CXCL10 spécifiques aux macrophages de type M1.

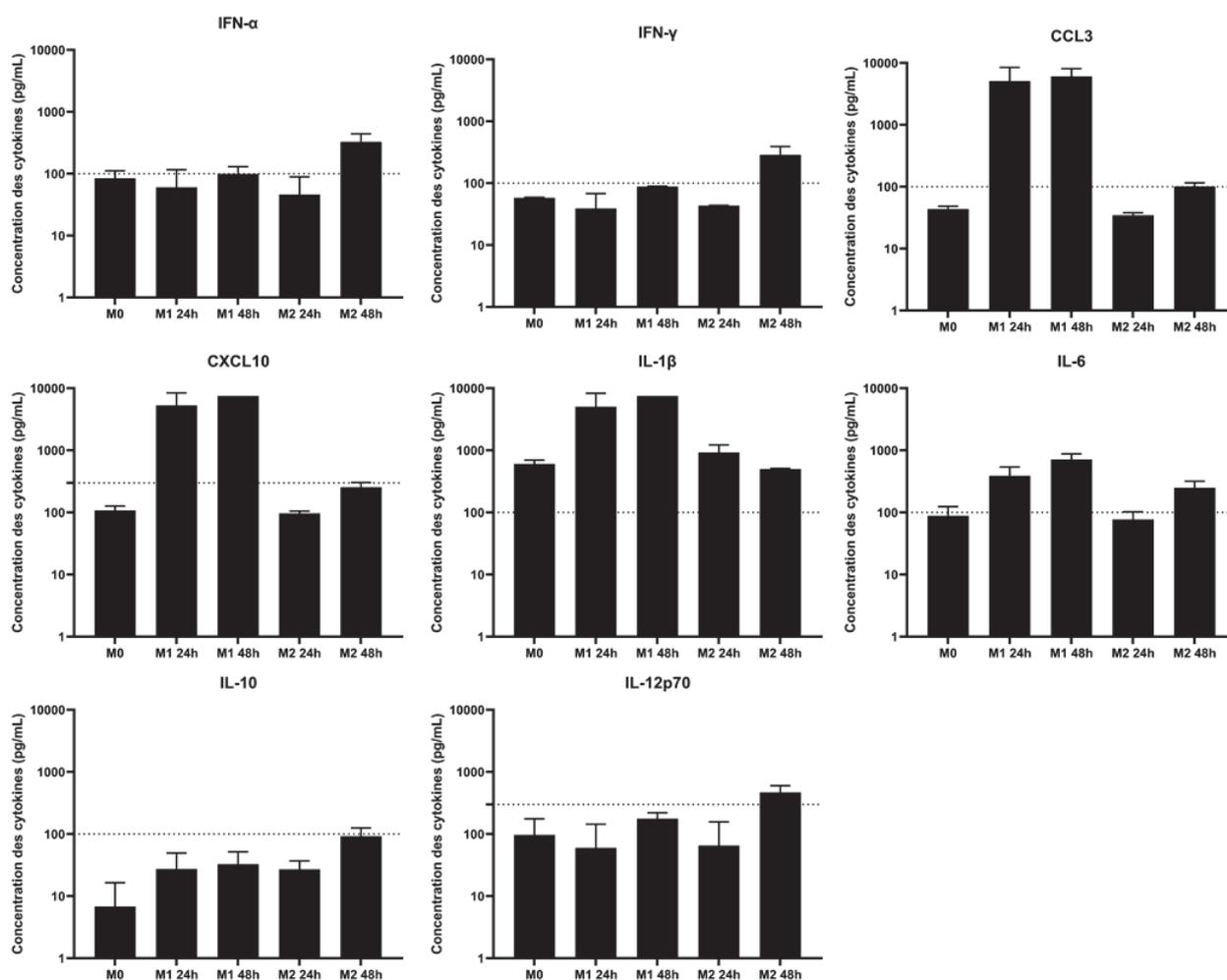


Figure 39. Détection de la sécrétion de cytokines spécifiques aux macrophages de type M1 et de type M2.

Détection de la sécrétion de cytokines dans les surnageants des cellules M0, des macrophages de type M1 et M2 polarisés pendant 24h ou 48h dans un volume 12 puits par un essai avec des billes multiplexées. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD de deux réplicats techniques différents issus d'une expérience (n=1). Les lignes en pointillés représentent le seuil de détection.

B. Etude du rôle de RACK1 sur la polarisation des macrophages *in vitro*

Après avoir développé des outils pour identifier les populations M1 et M2, nous voulions vérifier le rôle de RACK1 issu du carcinome épidermoïde oral (OSCC) dans la polarisation des macrophages. En effet, RACK1 a été décrit comme induisant préférentiellement la polarisation des macrophages associés à la tumeur vers un type M2 dans le contexte du OSCC (Dan et al., 2020). Nous avons émis l'hypothèse que RACK1 pouvait induire le phénotype de type M2 dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) et favoriser la progression du cancer. Nous voulions valider le rôle de RACK1 dans le microenvironnement du OSCC comme preuve de concept pour ensuite étudier RACK1 dans le contexte d'une lignée d'hépatocarcinome. Pour étudier le rôle de RACK1 dans la polarisation des macrophages nous avons diminué l'expression de RACK1 dans une lignée cellulaire HSC-3 dérivée du carcinome épidermoïde de la langue par transfection de siARN ciblant RACK1. Pour définir les bonnes conditions de silencing de RACK1 dans les cellules HSC-3 nous avons testé différents réactifs ainsi que différentes concentrations pendant 4 jours de transfection. Nous avons observé 80% de baisse d'expression de RACK1 après 72 heures de transfection dans la condition siRACK1 par rapport au contrôle siCTRL avec le réactif RNAiMAX contre 60% et 67% avec le réactif Lipofectamine 2000 (Figure 40A). Nous avons utilisé cette dernière condition : 3 jours de silencing dans les cellules HSC-3 pour produire le milieu conditionné qui a été collecté et ajouté sur les macrophages différenciés en M0 pendant 24 heures. Nous avons défini les populations M1 et M2 parmi les cellules viables exprimant respectivement les marqueurs de surface cellulaire CD40 et CD209 en cytométrie en flux (Figure 40B). Nous avons vérifié l'expression de RACK1 dans les cellules HSC-3 transfectées avec les siARN CTRL et RACK1 (Figure 40C), et bien que l'expression de RACK1 ait été réduite de 88% dans la condition siRACK1, il n'y avait aucune différence d'expression des marqueurs de surface cellulaire entre les macrophages qui ont été cultivés avec le milieu conditionné siCTRL ou ceux cultivés avec le milieu conditionné siRACK1. De plus, lorsque nous avons comparé le ratio M2/M1 des conditions siCTRL et siRACK1 nous avons observé que l'expression de RACK1 n'avait pas d'incidence sur la polarisation des macrophages M1 et M2 (Figure 40D). Des essais en parallèle avec le milieu conditionné provenant des cellules Huh7 ont été réalisés (données non montrées), nous avons observé la même expression des marqueurs de type M1 et M2 lorsque RACK1 est exprimée ou éteinte (siCTRL versus siRACK1). Ces résultats nous ont indiqué que RACK1 ne semble pas réguler la polarisation M1 et M2 ni dans le contexte du OSCC, ni dans celui des cellules d'hépatocarcinome.

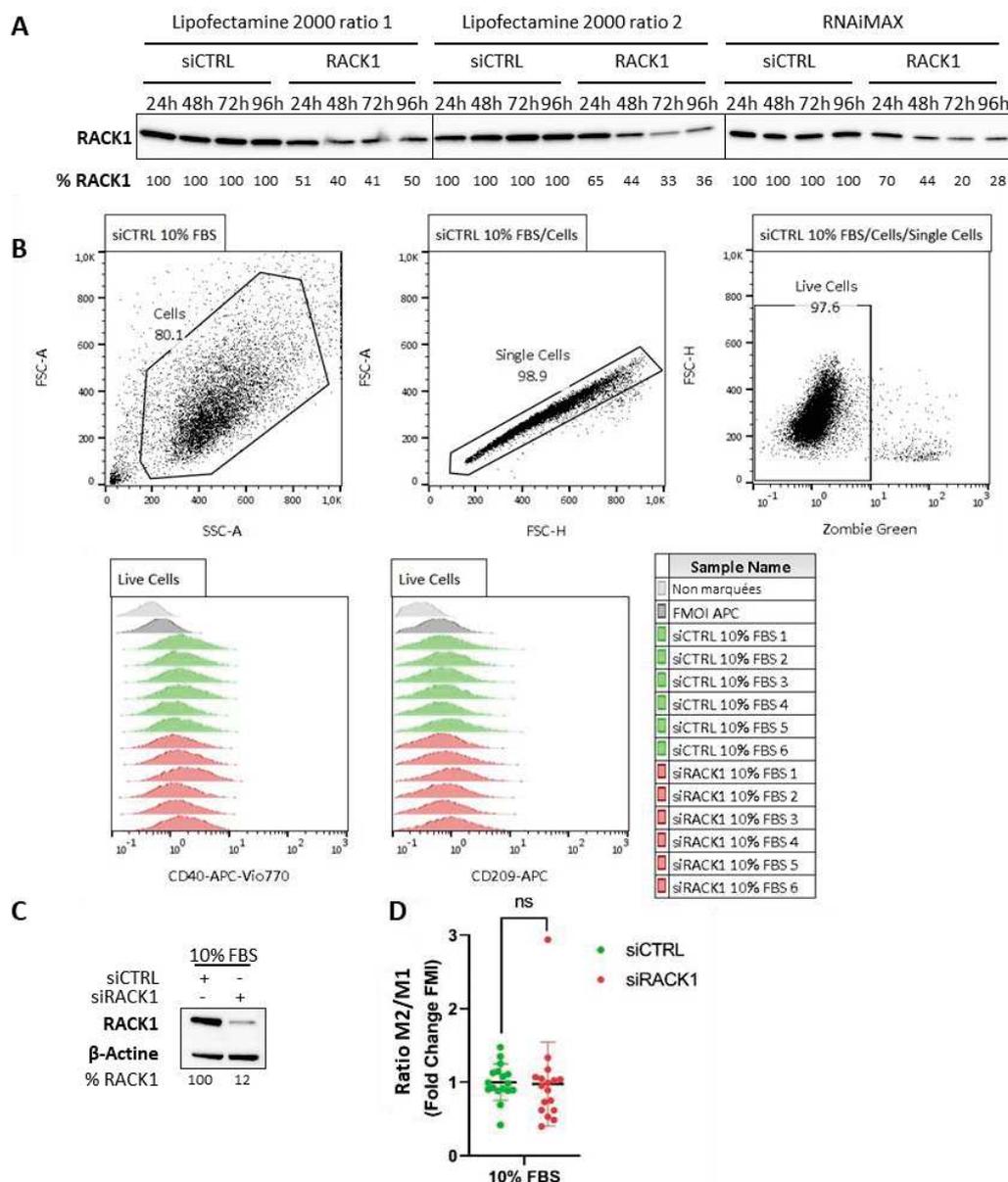


Figure 40. Dans le carcinome épidermoïde oral RACK1 n'est pas impliquée dans la polarisation des macrophages dérivés des THP-1.

(A) Analyse de l'expression de RACK1 par western blot dans les cellules HSC-3 après 24h, 48h, 72h ou 96h de transfection de siCTRL et siRACK1 en utilisant la Lipofectamine 2000© ou le RNAiMAX© comme agent de transfection. Les valeurs représentent le pourcentage d'expression de RACK1 après normalisation stain free. (B) Les cellules HSC-3 ont été transfectées avec un siCTRL ou un siRACK1 pendant 72h dans un milieu contenant 10% de sérum, puis les surnageants ont été collectés et ajoutés sur des cellules THP-1 différenciées en macrophages après 48h de traitement PMA. Représentation de la stratégie de gating utilisée pour identifier les marqueurs de surface cellulaire spécifiques aux macrophages de type M1 et M2 avec les anticorps CD40-APC-Vio770 et CD209-APC par cytométrie en flux ; six réplicats indépendants issus d'une expérience (n=1). (C) La perte d'expression de RACK1 a été analysée par western blot dans les cellules HSC-3 après 72h de transfection. Les valeurs représentent l'expression de RACK1 après normalisation à la β -actine. (D) Représentation du rapport M2/M1. Les populations M2 et M1 correspondent au fold change de la FMI des cellules marquées avec le CD209-APC ou CD40-APC-Vio770 respectivement, par rapport à la FMI de l'isotype contrôle. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD de six réplicats indépendants issus de trois expériences (n=3). La significativité statistique a été déterminée par le test Mann-Whitney non apparié. La valeur P correspond à : ns, « non significatif ».

Dans l'article (Dan et al., 2020), l'essai de polarisation *in vitro* des macrophages a été réalisé en utilisant un milieu conditionné sans sérum. Afin de se placer dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans la publication, nous avons transfecté les siARN dans les cellules HSC-3 en l'absence de sérum pendant 72 heures. Dans une expérience préliminaire, après avoir ajouté le surnageant HSC-3 sur les macrophages M0 pendant 24 heures, par analyse des marqueurs de surface en cytométrie en flux nous avons observé la même expression du marqueur CD40 dans les macrophages polarisés avec le milieu conditionné siCTRL ou siRACK1 mais une diminution de l'expression du CD209 dans la condition siRACK1 (Figure 41A). La baisse d'expression de RACK1 induit une diminution de la population M2 et module le ratio M2/M1 (Figure 41B, condition 0% FBS, 72h). Nous n'avons pas pu vérifier l'expression de la protéine RACK1 dans les cellules HSC-3 parce que la viabilité des cellules était trop faible pour en extraire les protéines totales. En effet, le sérum contient les facteurs nécessaires à la prolifération rapide des cellules *in vitro* et son absence dans le milieu conduit à un arrêt de la croissance cellulaire. La privation de sérum est utilisée en culture cellulaire pour imiter les conditions de stress auxquelles font face les cellules au sein de la tumeur *in vivo*. Dans le microenvironnement tumoral, les cellules sont soumises à de nombreuses conditions de stress telles que l'hypoxie, le stress oxydatif et la privation d'éléments nutritifs. Il existe de nombreux liens entre RACK1 et la résistance au stress. En réponse au stress, RACK1 est séquestrée dans des granules de stress qui empêchent l'activation de la voie MAPK menant à la survie cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose (Gandin et al., 2013). Il a été montré que RACK1 participe à la formation de l'autophagosome par sa phosphorylation par l'AMPK et qu'un défaut de RACK1 dans les hépatocytes conduit à l'accumulation de lipides dans le foie (Zhao et al., 2015). En outre, dans le microenvironnement tumoral du carcinome hépatocellulaire, l'autophagie a été décrite comme pouvant réguler directement le facteur de transcription NF- κ B pour contrôler la polarisation des macrophages pro-tumoraux M2 (Chang et al., 2013). Nous avons alors proposé d'étudier le rôle de RACK1 dans la polarisation des macrophages M1 et M2 en réponse au stress cellulaire. Pour cela, nous avons testé différentes conditions de privation de sérum dans le milieu conditionné combiné avec la baisse d'expression de RACK1 par transfection siARN. Nous avons étudié la viabilité et la prolifération des cellules HSC-3 cultivées dans un milieu contenant 10%, 1% ou 0% de sérum pendant 72 heures (Figures 41D et 41E). Comme dans l'expérience précédente, en absence de sérum la viabilité cellulaire diminuait drastiquement (90%) après 48 heures, par contre après 24 heures de culture la viabilité des cellules était encore de 80%. Après 3 jours de culture dans 1% de sérum la viabilité cellulaire a diminué de 30% (Figure 41E). Nous avons alors décidé d'analyser la polarisation des macrophages avec du milieu conditionné provenant de cellules cultivées pendant 72 heures avec 1% de sérum ou pendant 24 heures avec 0% de sérum. Nous n'avons observé aucune différence dans le rapport M2/M1 entre les macrophages polarisés avec le milieu conditionné où RACK1 est exprimée ou éteinte par transfection siRACK1 (Figure 41B). Le silencing de RACK1 a été confirmé par western blot (Figure 41C). Ces différentes expériences nous ont permis de conclure que l'expression de RACK1 ne modulait pas la polarisation des macrophages que ce soit en réponse au stress cellulaire ou non. De plus, nous avons observé que l'ajout des milieux conditionnés provenant des cellules HSC-3 ou Huh7 n'induisait pas de polarisation des macrophages en M1 ou M2, mais que les macrophages demeuraient au stade non polarisé M0 (données non montrées). Malgré de nombreuses optimisations, nous n'avons pas été en mesure de reproduire les résultats préliminaires obtenus et décrits dans la littérature (Dan et al., 2020).

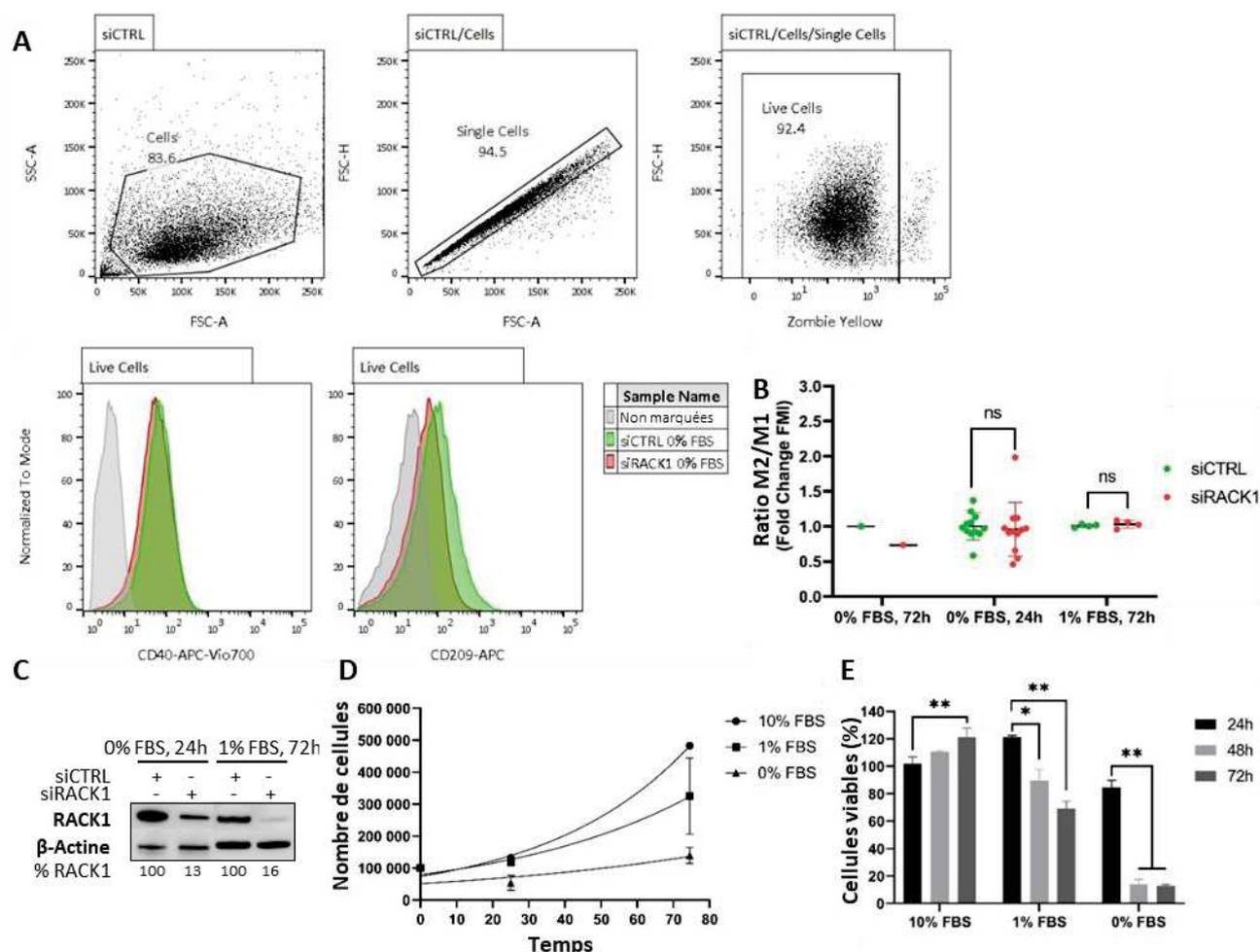


Figure 41. Dans le carcinome épidermoïde oral RACK1 ne module pas la polarisation des macrophages dérivés des THP-1 en réponse à la privation de sérum.

(A-B) Les cellules THP-1 sont différenciées en macrophages après 48h de traitement PMA et mises en culture avec les surnageants des cellules HSC-3 transfectées avec des siCTRL et siRACK1 pendant 72h. Comparaison de différentes conditions : absence de sérum dans le milieu pendant 72h (0% FBS, 72h), absence de sérum dans le milieu pendant 24h (0% FBS, 24h) ou milieu contenant 1% de sérum pendant 72h (1% FBS, 72h). (A) Représentation de la stratégie de gating utilisée pour identifier les marqueurs de surface cellulaire spécifiques aux macrophages de type M1 et M2 avec les anticorps CD40-APC-Vio770 et CD209-APC par cytométrie en flux ; expérience sans sérum pendant 72h. (B) Représentation du ratio M2/M1 où les cytokines ont été accumulées pendant 24h ou 72h dans le milieu conditionné avec 1% ou 0% sérum. Les populations M2 et M1 correspondent au fold change de la FMI des cellules marquées avec le CD209-APC ou CD40-APC-Vio770 respectivement, par rapport à la FMI de l'isotype contrôle ou des cellules non marquées. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD de quatre réplicats indépendants issus d'une (1% FBS, 72h) (n=1) ou de trois expériences (0% FBS, 24h) (n=3). (C) La perte d'expression de RACK1 a été analysée par western blot dans les cellules HSC-3 après 72h de transfection. Les valeurs représentent l'expression de RACK1 après normalisation à la β -actine. (D-E) Les cellules HSC-3 ont été cultivées dans des milieux contenant 0%, 1% ou 10% de sérum pendant 72h, la concentration cellulaire a été mesurée avec le compteur de cellules automatisé TC20™ (D), la viabilité cellulaire a été déterminée par essai PrestoBlue™(E). Les valeurs représentent la moyenne \pm SD de trois réplicats indépendants issus d'une expérience (n=1). La significativité statistique a été déterminée par le test Mann-Whitney non apparié (B) et le test ANOVA à une voie (E). Les valeurs P correspondent à : *, < 0,05 ; **, < 0,01 ; ns signifie « non significatif ».

Dans la seconde partie de ma thèse nous avons étudié le rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral. L'expression de RACK1 est dérégulée dans de nombreux cancers et plusieurs études ont montré que RACK1 pouvait être utilisée comme un nouveau marqueur de mauvais pronostic (Li and Xie, 2015). Le changement d'expression de RACK1 dans les tissus tumoraux peut avoir des conséquences sur de nombreuses voies de signalisation et contribuer à la progression tumorale. Dans le modèle cellulaire Huh7 dérivée d'hépatocarcinomes humains où RACK1 est surexprimée, nous avons observé que le silencing de RACK1 induit une augmentation de la transcription de la cytokine pro-inflammatoire CXCL10. RACK1 pourrait alors réguler l'expression de cytokines au sein du microenvironnement tumoral pour contrôler l'activité des cellules immunitaires associées à l'inflammation. Nous avons étudié plus particulièrement le rôle de RACK1 dans la modulation de la polarisation des macrophages. Nous avons observé que RACK1 n'avait pas d'impact sur la polarisation M1 et M2 ni dans le contexte du OSCC, ni dans celui du CHC dans des conditions normales de culture cellulaire ainsi qu'en présence de stress induit par l'absence de sérum dans le milieu conditionné pendant 24h. Des résultats préliminaires ont montré une diminution du ratio M2/M1 dans la condition où RACK1 est silencée par rapport au siCTRL en absence de sérum pendant 72h. Cependant cette expérience doit être répétée et nécessite d'autres validations pour être confirmée. Il est possible que le stress induit par l'absence de sérum pendant 24 heures ou dans le milieu contenant 1% de sérum ne soit pas suffisant pour induire une différence de polarisation significative. RACK1 participe à la réponse au stress que ce soit en activant l'autophagie en absence de nutriments (Zhao et al., 2015), sa séquestration dans les granules de stress en réponse à l'hypoxie, ou en activant l'apoptose en réponse au stress oxydatif (Arimoto et al., 2008) ; il serait intéressant d'analyser l'impact de l'absence d'expression de RACK1 combinée à différents stress cellulaires tels que l'hypoxie ou l'induction de l'autophagie sur la polarisation des macrophages pour comprendre la relation entre l'expression de RACK1 et le stress cellulaire dans le microenvironnement tumoral.

DISCUSSION

PARTIE I. Rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante virale et cellulaire

I. RACK1 est impliquée dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux et cellulaires

RACK1 a été identifiée comme un facteur d'hôte nécessaire à la réplication de plusieurs virus comme la Dengue (Hafirassou et al., 2017), le virus de la bursite infectieuse (Lin et al., 2015), ou le virus MuV (mumps virus) responsable de la maladie des oreillons (Kubota et al., 2002). Lors de ces différentes infections, le virus détourne plusieurs fonctions de la cellule hôte à son profit comme l'apoptose ou l'autophagie. En 2014, une nouvelle fonction de RACK1 a été identifiée dans la traduction des protéines virales des virus à ARN utilisant un mécanisme de traduction indépendant de la coiffe (Majzoub et al., 2014). De nombreux virus possèdent à l'extrémité 5' de leur ARN une séquence formant une structure appelée IRES qui leur permet de recruter le ribosome indépendamment de la présence d'une coiffe en 5'. Ce mécanisme permet de détourner la machinerie de traduction cellulaire au profit du virus et de s'affranchir du mécanisme de traduction classique (Jang et al., 1988; Kieft, 2008). Notre laboratoire a identifié que RACK1 est un facteur d'hôte nécessaire à la traduction IRES-dépendante des virus CrPV et VHC et que l'association de RACK1 au ribosome chez la drosophile est nécessaire à la traduction du CrPV (Majzoub et al., 2014). RACK1 étant impliquée dans la traduction IRES-dépendante de deux virus différents, dans le cadre de mon travail de thèse nous souhaitons investiguer le rôle de RACK1 ribosomique dans la traduction IRES-dépendante des virus de façon générale. Ce travail devait nous permettre d'identifier le spectre d'action de RACK1 pour valider cette protéine en tant que nouvelle cible thérapeutique d'intérêt pour développer des solutions antivirales à large spectre.

Pour étudier le rôle de la protéine RACK1 dans la traduction IRES-dépendante d'ARN viraux, nous avons utilisé des cellules Huh7 que nous avons transfectées avec un système luciférase rapporteur dont la traduction est sous le contrôle des IRES d'intérêt. Nous avons confirmé que RACK1 est nécessaire à la traduction IRES-dépendante du VHC et observé une diminution significative de la traduction IRES-dépendante pour d'autres IRES viraux, i.e. EMCV, FMDV et PV lorsque l'expression de RACK1 est fortement diminuée par transfection de siARN ciblant RACK1. Une étude récente a décrit les mêmes rôles de RACK1 pour la traduction de PV, EMCV et VHC que ceux observés pendant mon travail de thèse (LaFontaine et al., 2020). Les auteurs ont montré que la traduction IRES-dépendante d'EMCV, PV et VHC est réduite dans une lignée KO de RACK1 générée par CRISPR/Cas9 dans des cellules haploïdes HAP1. Pour confirmer l'impact de la perte d'expression de RACK1 sur l'infection virale, il aurait été intéressant de compléter cette étude par la détermination du potentiel infectieux d'EMCV et de FMDV dans des cellules où l'expression de RACK1 est éteinte.

Nos résultats nous ont permis de montrer que RACK1 est nécessaire à l'initiation de la traduction de plusieurs virus dont la traduction est régulée par différents types d'IRES. Pour rappel, les IRES sont classées en quatre types qui diffèrent par leur structure secondaire et tertiaire, leur mode de recrutement au ribosome et le nombre et la nature des facteurs

nécessaires à l'initiation de la traduction (Mailliot and Martin, 2018; Yang and Wang, 2019). Ainsi, l'IRES de PV appartient à la famille des IRES de type I alors que les IRES d'EMCV et de FMDV font partie des IRES de type II. Pour démarrer leur traduction, ces deux types d'IRES ont besoin de tous les facteurs d'initiation de la traduction à l'exception d'eIF4E et de l'extrémité N-ter d'eIF4G qui est clivée par une protéase virale (Balvay et al., 2009). L'IRES du VHC, quant à lui, appartient à la catégorie des IRES de type III dont la traduction est initiée par le recrutement d'eIF3, du complexe ternaire constitué d'eIF2/GTP/Met-ARNT_i^{Met} et de la sous-unité 40S pour former le complexe 48S qui va par la suite s'assembler avec la sous-unité 60S à l'aide d'eIF5 (Niepmann, 2013). Nos résultats suggèrent que RACK1 régule la traduction de différents types d'IRES dont le mécanisme d'initiation diffère, ainsi RACK1 semble impliquée à plus large échelle dans un mécanisme universel de traduction IRES-dépendante. Avoir une meilleure compréhension du rôle de RACK1 dans le mécanisme de régulation de la traduction permettrait de valider RACK1 comme une cible pour lutter contre un large spectre de virus.

Concernant le mécanisme d'action permettant la traduction IRES-dépendante, RACK1 est une protéine ribosomique localisée à l'arrière de la tête de la petite sous-unité 40S à proximité du tunnel d'entrée et de sortie de l'ARNm (Larburu et al., 2016). Cette localisation lui offre l'opportunité d'interagir avec des régulateurs de la traduction tels que les facteurs d'initiation (Nielsen et al., 2017). Par exemple, lors de l'infection par le VHC, RACK1 n'interagit pas directement avec l'IRES du VHC mais se trouve à proximité de la région du ribosome qui se lie à l'IRES (Johnson et al., 2017). RACK1 pourrait ainsi être nécessaire au recrutement ou à l'activité des facteurs d'initiation eIF3 et eIF2 nécessaires à la traduction du VHC. Le facteur eIF3 se lie à la sous-unité 40S et à l'IRES du VHC (Kieft et al., 2001), et il a été identifié que RACK1 s'associe avec l'un des domaines périphériques d'eIF3 pour former le complexe de pré-initiation 43S chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hashem et al., 2013; Kouba et al., 2012). Dans l'étude de Majzoub et al. il a été observé que la sous-unité eIF3j est nécessaire à la traduction IRES-dépendante de l'IRES en 5' de CrPV et que cette sous-unité est importante pour la réplication du VHC (Majzoub et al., 2014). Il est possible que RACK1 régule le recrutement et/ou l'activité d'eIF3j pour initier ou faciliter la traduction IRES-dépendante de CrPV et du VHC. De façon intéressante, une autre étude a montré que RACK1 module les interactions entre les régions non-structurées d'eIF4G contrôlant ainsi l'association entre eIF4G1 et eIF3 (Dobrikov et al., 2018a). En effet, RACK1 associée à la PKCβII est impliquée dans la régulation de l'assemblage d'eIF4G1 et d'eIF3 en régulant la phosphorylation des résidus S1093 et S1364 d'eIF4G1 et d'eIF3a respectivement. La protéine eIF4G1 est clivée en deux lors de l'infection de virus appartenant aux IRES de type I et II et seule la région C-ter de la protéine, appelée aussi eIF4G1c est associée au ribosome pour initier la traduction IRES-dépendante. Le résidu S1093 phosphorylé par la PKCβII se trouve dans la région C-ter d'eIF4G1, ainsi RACK1 pourrait être impliquée dans la régulation de la traduction IRES-dépendante des IRES de type I et II via la phosphorylation d'eIF4G1c. De plus, il a été identifié que la phosphorylation d'eIF4G1 par le complexe RACK1-PKCβII est impliquée dans la traduction IRES-dépendante de type I de l'entérovirus PVSRIPO, qui est une chimère atténuée du poliovirus contenant l'IRES d'HRV-2 (Dobrikov et al., 2018a, 2018b). Nous proposons que RACK1 régule la traduction IRES-dépendante de différents types d'IRES en régulant l'activité d'eIF3 et d'eIF4G ainsi que leurs interactions. Il serait alors intéressant d'identifier les mécanismes moléculaires dans lesquels

RACK1 serait impliquée. Afin de déterminer si l'activité de la PKC β II est nécessaire pour la régulation de la traduction médiée par RACK1, nous pourrions analyser la traduction IRES-dépendante de PV, EMCV, FMDV et VHC à l'aide de rapporteurs luciférase en utilisant un inhibiteur de l'activité de la PKC β II ou des mutants phospho-mimétiques des résidus S1093 et S1364 d'eIF4G1 et d'eIF3a où les résidus sérines seraient remplacés par des résidus alanines ou acides glutamiques. Observer les interactions entre les facteurs d'initiation et RACK1 par co-immunoprécipitation sur des fractions 48S récoltées après analyse des profils des polysomes, ainsi qu'identifier le complexe d'initiation après infection par le VHC, EMCV ou FMDV par cryo-EM en présence et en absence de RACK1 pourrait être envisagé. Ces études permettraient de mieux comprendre le rôle de RACK1 dans la régulation de la traduction IRES-dépendante des virus.

La présence d'IRES a également été documentée dans les ARNm cellulaires (Komar and Hatzoglou, 2011). Bien que la traduction chez les eucaryotes soit majoritairement assurée par un mécanisme dépendant de la coiffe en 5', certains ARNm cellulaires utilisent à la fois un mécanisme coiffe-dépendant et coiffe-indépendant pour initier leur traduction. Les IRES cellulaires sont utilisés par la cellule pour réguler des fonctions physiologiques comme la traduction du facteur de croissance angiogénique FGF-2 (fibroblast growth-factor-2) lors de la formation du réseau synaptique (Audigier et al., 2008) ou de FGF-1 qui est actif lors de la différenciation des myoblastes et la régénération des muscles (Conte et al., 2009). Certains ARN cellulaires porteur d'IRES peuvent être responsables de pathologies, par exemple une mutation dans l'IRES de c-myc induit la traduction aberrante de c-myc chez les patients atteints de multiples myélomes (Chappell et al., 2000). Toutefois, la fonction principale des IRES des ARNm cellulaires est de maintenir la traduction des transcrits lors de périodes de stress, incluant les dommages à l'ADN, la privation d'acides aminés ou de nutriments, l'hypoxie ou le stress au réticulum endoplasmique (Godet et al., 2019). En réponse à certains stress cellulaires, la traduction IRES-dépendante est utilisée pour palier le défaut de traduction coiffe-dépendante : la traduction de l'ARNm Cat-1 (arginine/lysine amino acid transporter) est augmentée via un mécanisme IRES-dépendant lors de privation des cellules en acides aminés (Majumder et al., 2009) ; un basculement entre la traduction coiffe-dépendante vers la traduction coiffe-indépendante a été observé pour VEGFA et HIF-1 α sous condition hypoxique dans le cancer du sein (Braunstein et al., 2007). Dans l'environnement tumoral les cellules sont sujettes à de nombreuses conditions de stress ce qui conduit à une baisse globale de traduction dans le but de préserver l'énergie et les nutriments (Sheikh and Fornace, 1999). Afin de maintenir leur propre prolifération, les cellules tumorales ont développé des mécanismes alternatifs pour préserver la traduction des gènes essentiels et de favoriser leur survie pendant la tumorigenèse. Dans le cancer, l'inactivation du suppresseur de tumeur p53 active la formation de « ribosomes cancer » qui sont préférentiellement recrutés par les ARNm contenant des IRES ce qui conduit à l'augmentation aberrante de la traduction IRES-dépendante de certains gènes impliqués dans le cancer comme les facteurs angiogéniques FGF1, FGF2, VEGFA, c-myc (Marcel et al., 2013). Actuellement, on estime qu'environ 10% des ARNm des mammifères contiennent des éléments qui fonctionnent comme des IRES (Weingarten-Gabbay et al., 2016). Certains ARNm cellulaires peuvent être traduits à la fois par des mécanismes de traduction dépendants de la coiffe mais aussi indépendants, c'est le cas

de c-myc et LEF-1, un facteur de transcription qui contrôle la voie de signalisation Wnt (Pérard et al., 2010) dont la traduction peut être régulée en fonction des conditions cellulaires. Alors que d'autres transcrits ne semblent être traduits qu'à partir d'un mécanisme IRES-dépendant (Ungureanu et al., 2006). Par exemple, la traduction d'Apaf-1 est induite de façon IRES-dépendante pendant l'apoptose lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée (Coldwell et al., 2000). Le mécanisme d'initiation de la traduction IRES-dépendante cellulaire n'est pas bien connu. Les IRES cellulaires sont moins structurés que les IRES des virus et sont plus difficiles à classer. La large diversité des IRES cellulaires chez les eucaryotes suggère que les mécanismes d'initiation utilisés sont plus divers et plus complexes que ceux utilisés par les IRES viraux (Yang and Wang, 2019). RACK1 ayant été identifiée comme étant impliquée dans la traduction IRES-dépendante virale et son expression étant modulée dans de nombreux cancers (Li and Xie, 2015), nous avons émis l'hypothèse que RACK1 pouvait réguler la traduction IRES-dépendante d'ARNm cellulaires impliqués dans la tumorigenèse.

De la même façon que pour les IRES viraux, nous avons observé l'impact sur la traduction IRES-dépendante cellulaire de la baisse d'expression de RACK1 dans des cellules Huh7. Nous avons observé que le silencing de RACK1 induit une baisse significative de la traduction IRES-dépendante des ARNm de BiP, Apaf-1, c-myc et Cat-1. Le transcrite de BiP (Binding immunoglobulin protein) a été identifié comme le premier ARNm cellulaire contenant une structure IRES (Macejak and Sarnow, 1991), sa traduction est médiée par l'IRES lorsque la traduction coiffe-dépendante est inhibée suite à des changements environnementaux comme la chaleur (Cho et al., 2007). La protéine BiP est une chaperone qui joue un rôle dans le repliement et l'assemblage des protéines naissantes au réticulum endoplasmique. Suite à un stress, l'induction de BiP représente un composant important de la voie UPR (unfolded protein response) qui est activée en réponse à l'accumulation de protéines mal repliées ou non repliées. BiP possède aussi des propriétés anti-apoptotiques, son expression est induite dans de nombreux cancers où elle contribue à la croissance tumorale et confère aux cellules cancéreuses une résistance aux médicaments (Li and Lee, 2006). La protéine Apaf-1 (Apoptotique peptidase activating factor 1) est une molécule clé de l'apoptose (Shakeri et al., 2017). L'IRES d'Apaf-1 est actif dans la plupart des cellules humaines pour maintenir un niveau d'expression constant même dans des conditions où la traduction coiffe-dépendante est compromise (Coldwell et al., 2000). La protéine est régulée à la baisse dans le cancer du côlon et dans le cancer du poumon non à petites cellules (Ahn et al., 2016), et sa déplétion contribue à la transformation des cellules cancéreuses dans un modèle de souris (Cecconi and Gruss, 2001). A l'inverse, la surexpression de RACK1 active Apaf-1 dans les cellules dérivées de leucémie (Lei et al., 2016). Nous avons observé une baisse de la traduction IRES-dépendante de BiP et d'Apaf-1 dans des cellules Huh7 où l'expression de RACK1 est inhibée. L'expression de RACK1 est régulée à la hausse dans de nombreux cancers comme le CHC (Ruan et al., 2012), le cancer du poumon non à petite cellules (Shi et al., 2012) et l'OSCC (Dan et al., 2020) et corrèle avec la progression du cancer et la chimiorésistance. Nous émettons l'hypothèse que RACK1 puisse réguler la traduction IRES-dépendante d'ARNm cellulaires impliqués dans la progression tumorale et que RACK1 pourrait être une cible en oncologie moléculaire. Afin d'identifier si RACK1 peut être une cible thérapeutique pour réguler l'incidence de BiP et d'Apaf-1 dans le cancer, il serait intéressant d'étudier la régulation

de l'expression de ces deux protéines dans les cellules où RACK1 est inhibée et d'observer la chimiorésistance et la réponse apoptotique des cellules. Ainsi ces travaux permettraient d'identifier que RACK1 régule spécifiquement la traduction IRES-dépendante de certains transcrits cellulaires qui favorisent le développement du cancer.

Il est possible qu'en condition de stress ou dans des cellules cancéreuses, lorsque la traduction canonique est inhibée, RACK1 active la traduction IRES-dépendante afin de maintenir l'expression de certains transcrits essentiels à la survie cellulaire. Il serait intéressant d'analyser si des conditions de stress cellulaire permettent d'augmenter la traduction IRES-dépendante de certains transcrits en comparant la traduction (par rapporteurs luciférase ou par analyse du profil des polysomes) dans des conditions normales versus des conditions de stress couplées à la perte d'expression de RACK1. Différents stress pourraient être induits comme le stress apoptotique en activant les récepteurs Fas ou TNF (anticorps anti-CD95) ou en utilisant des inducteurs de l'apoptose comme la staurosporine ou la camptothécine, ainsi que la privation de nutriments ou les UV. Le stress au réticulum endoplasmique mérite également d'être considéré, il induit notamment l'expression de BiP dans les cellules cancéreuses (Macejak and Sarnow, 1991). Il serait également intéressant d'analyser la traduction IRES-dépendante de la β -caténine qui active le stress au réticulum endoplasmique (Raab et al., 2009) et dont l'expression est régulée lors de la croissance tumorale pour permettre la survie des cellules. Dans le cancer gastrique, RACK1 contrôle négativement la voie de signalisation Wnt en stabilisant le complexe de destruction de la β -caténine (Deng et al., 2012). L'une des dernières conditions de stress pouvant être mise en œuvre est l'hypoxie. L'hypoxie permettrait d'étudier la traduction de l'IRES d'HIF-1 α qui est régulée dans le cadre du CHC (Miao et al., 2019). HIF-1 α est activé pendant l'apoptose et est impliqué dans la prolifération des métastases et dans l'angiogenèse. Plus globalement, il serait intéressant d'identifier les transcrits régulés par RACK1 en conditions de stress avec un séquençage complet du transcriptome des cellules Huh7 sur les fractions polysomales. Ces travaux permettraient d'identifier si RACK1 régule spécifiquement certaines voies de signalisation pour favoriser la survie cellulaire dans des conditions de stress.

Il a été décrit qu'en réponse au stress la population de protéines ribosomiques ou d'ARNr peut être hétérogène et entraîner une modification quantitative ou qualitative du translatome (Xue and Barna, 2012). Le ribosome ne constitue pas une population homogène et il est possible qu'en condition de stress, dans l'environnement tumoral ou lors d'une infection, RACK1 soit spécifiquement recrutée au ribosome pour réguler la traduction de gènes impliqués dans la prolifération du cancer ou pour la traduction des protéines virales. Cependant, l'application d'un stress cellulaire pourrait aussi activer la fonction de RACK1 dans des voies de signalisation en réponse au stress. RACK1 est une protéine appartenant à la famille des protéines à motifs de répétition WD (Coyle et al., 2009) ce qui lui permet d'interagir avec de nombreuses molécules impliquées dans différentes voies de signalisation (Adams et al., 2011). Il a été identifié qu'en réponse au stress RACK1 régule différentes voies impliquées dans l'autophagie, l'apoptose ou la traduction. L'autophagie est induite par RACK1 complexée à Beclin-1 suite à sa phosphorylation par l'AMPK en absence de nutriments (Zhao et al., 2015). En réponse au stress RACK1 peut se transloquer d'un compartiment à l'autre (Arimoto et al., 2008). Par exemple, quand les cellules sont exposées à des drogues génotoxiques ou à des rayonnements

UV, RACK1 active la voie des MAPK ce qui induit l'apoptose. Au contraire, quand les cellules sont dans des conditions d'hypoxie, RACK1 est séquestrée dans les granules de stress et inhibe l'apoptose (Arimoto et al., 2008). Lors d'un stress induit par le TPA, RACK1 recrute au ribosome JNK et induit sa phosphorylation et son activation par la PKC (López-Bergami et al., 2005). JNK activée entraîne la phosphorylation du facteur d'élongation de la traduction eEF1A2 (eukaryotic translation elongation factor 1A isoform 2) ce qui favorise la dégradation des peptides nouvellement synthétisés (Gandin et al., 2013) dont le mauvais repliement augmente lorsque les cellules sont soumises à un stress cellulaire (Hartl et al., 2011). Ainsi dans des conditions de stress il est difficile de savoir si RACK1 régule la traduction par son rôle ribosomique ou par son rôle dans d'autres voies de signalisation.

RACK1 régule également spécifiquement la traduction de transcrits impliqués dans croissance et survie du CHC en induisant la phosphorylation du facteur d'initiation eIF4E ce qui améliore la traduction des ARNm de la cycline D1, MYC, VEGF et BCL-2 (Ruan et al., 2012). En réponse à certains stimuli comme l'activation de la voie Raf-ERK1/2, RACK1 régule la traduction globale coiffe-dépendante et augmente significativement la traduction de transcrits sensibles aux esters phorboliques (Dobrikov et al., 2018b). Ces études suggèrent que RACK1 peut réguler la traduction de certains transcrits via un mécanisme coiffe-dépendant. Cependant les observations sur le rôle de RACK1 dans la traduction coiffe-dépendante divergent dans la littérature. En effet, si les publications précédentes montrent que la baisse de RACK1 induit une diminution de la traduction coiffe-dépendante de certains transcrits (Dobrikov et al., 2018b; Gallo et al., 2018) ; lors de mon travail de thèse ainsi que dans d'autres études, aucune différence sur la traduction coiffe-dépendante n'a été observée lorsque l'expression de RACK1 est éteinte (LaFontaine et al., 2020; Majzoub et al., 2014). Ces résultats contradictoires concernant l'implication de RACK1 dans la traduction coiffe-dépendante peuvent être dus à des différences spécifiques liées aux lignées cellulaires utilisées (RACK1 régule la traduction coiffe-dépendante dans les lignées cellulaires HeLa et HEK293 versus HAP1 et Huh7) (Dobrikov et al., 2018b; Gallo et al., 2018; Majzoub et al., 2014; LaFontaine et al., 2020). De plus, les articles décrivant un rôle de RACK1 dans la traduction médiée par la coiffe montrent que RACK1 stimule la traduction de façon PKC β II-dépendante (Dobrikov et al., 2018b; Grosso et al., 2008a) dont l'expression de l'ARNm est potentiellement régulée à la hausse dans les lignées cellulaires HeLa et HEK293 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166501-PRKCB/cell>). Ainsi des niveaux d'expression variables de la PKC β II selon les lignées cellulaires pourraient expliquer les effets quelquefois contradictoires décrits sur le rôle de RACK1 dans la traduction coiffe-dépendante. En effet, Dobrikov et al. ont observé une augmentation de la traduction de certains gènes après traitement au TPA qui active la PKC β II, il est possible que RACK1 augmente la traduction coiffe-dépendante après stimulation de la PKC β II mais pas en absence de stimuli (Dobrikov et al., 2018b). Dans cette étude il a aussi été suggéré que RACK1 puisse moduler la traduction à la fois coiffe-dépendante et IRES-dépendante. Il serait alors intéressant de confirmer dans notre système que RACK1 régule la traduction IRES-dépendante des ARNm cellulaires étudiés indépendamment de la traduction coiffe-dépendante. Nous pourrions observer la traduction IRES-dépendante et coiffe-dépendante lorsque l'expression de RACK1 est éteinte combinée au silencing du facteur d'initiation eIF4E nécessaire à la reconnaissance de la coiffe. Dans notre

modèle nous avons utilisé des rapporteurs ADN bicistroniques mais il serait aussi possible d'utiliser des rapporteurs ARN transcrits de façon *in vitro* afin d'empêcher des événements d'épissage ou des promoteurs cryptiques qui pourraient se produire dans un modèle bicistronique.

Nous avons montré que RACK1 est impliquée dans la traduction IRES-dépendante d'ARN viraux et cellulaires dans des cellules où l'expression de RACK1 est éteinte par transfection siARN. L'extinction totale de RACK1 par siARN peut à la fois avoir inhibé le rôle de RACK1 dans la traduction mais aussi dans les voies de signalisation. Pour caractériser spécifiquement le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante il nous est paru nécessaire de découpler la fonction ribosomique de RACK1 de ses autres fonctions dans la cellule. Empêcher l'interaction de RACK1 avec le ribosome permettrait de lutter contre de nombreuses infections virales humaines (EMCV, FMDV, PV, VHC). Ainsi inhiber l'activité d'un facteur hôte de la cellule comme RACK1 pourrait être une stratégie complémentaire aux traitements actuels qui ciblent directement le virus (DAA) en proposant une solution à large spectre d'action. De plus, cibler le rôle de RACK1 dans l'initiation de la traduction pourrait être une solution pour diminuer la chimiorésistance dans le traitement des cancers, où la présence de RACK1 au ribosome favorise la croissance et la survie cellulaire (Ruan et al., 2012). A ce jour, un inhibiteur de RACK1 a été décrit comme inhibant la prolifération du virus du VHS-1 (virus de l'herpès simplex) en empêchant la phosphorylation du résidu Tyr248 impliqué dans l'interaction avec la protéine Src (Ullah et al., 2019). Bien que le mécanisme par lequel l'inhibiteur inhibe la réplication de VHS-1 n'est pas clairement établi, cette étude montre que de petites molécules peuvent avoir la capacité d'inhiber l'activité de RACK1 dans la réplication virale. Avoir une meilleure compréhension du mécanisme et des facteurs importants pour la régulation de la traduction IRES-dépendante permettrait de développer des agents thérapeutiques à large spectre ciblant spécifiquement la traduction de génomes viraux ou des gènes cellulaires impliqués dans des pathologies sans impacter d'autres fonctions cellulaires.

II. Développement d'une lignée cellulaire mutante RACK1^{R36D,K38E} pour découpler les fonctions ribosomiques et cytosoliques de RACK1

Considérant le rôle central de RACK1 dans des fonctions cellulaires critiques, afin d'étudier spécifiquement le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante, nous souhaitons découpler sa fonction ribosomique de sa fonction de signalisation dans la cellule. Notre objectif était d'établir une lignée cellulaire possédant les deux points de mutations R36D et K38E (DE), correspondant aux résidus R38D et K40E chez la levure, dans des cellules Huh7 dérivées de CHC humain afin de valider le rôle ribosomique de RACK1 dans l'infection virale et le développement de maladies IRES-dépendantes.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la stratégie du CRISPR/Cas9 pour introduire de façon endogène les mutations DE. Nous avons optimisé les conditions de CRISPR en testant différents agents de transfection, en choisissant les guides ayant la meilleure efficacité de clivage ainsi qu'en améliorant les conditions de culture cellulaire avec du milieu conditionné

pour la sélection clonale. Nous avons développé différentes techniques pour détecter la présence des mutants, par PCR spécifique à la mutation, digestion enzymatique et ddPCR nous permettant de définir la fréquence allélique de la mutation. Avec la stratégie du CRISPR/Cas9 nous avons réussi à obtenir des lignées cellulaires hétérozygotes pour les simples mutations R36D et K38E confirmant que la stratégie permet d'introduire les mutations. Cependant nous avons éprouvé des difficultés à obtenir un modèle homozygote du fait de la polyploïdie du modèle cellulaire. Bien que nous ayons réussi à augmenter la fréquence de la mutation R36D, au cours du temps la présence de RACK1 WT était à nouveau détectée par ddPCR. Il a été décrit que le mutant RACK1^{DE} inhibe l'expression de gènes impliqués dans la croissance du CHC (Ruan et al., 2012). Notre modèle étant basé sur des cellules Huh7 dérivées de CHC, il est possible que les cellules mutantes aient une vitesse de croissance plus faible que les cellules sauvages, ainsi les cellules ayant intégré la mutation sont remplacées au fur et à mesure par des cellules n'ayant pas été éditées. Bien que le CRISPR soit un outil puissant, de nombreuses limitations existent. La technologie n'est pas efficace à 100%, le génome de toutes les cellules n'est pas édité. Avec la stratégie de knock-in utilisée, les mutations sont introduites par recombinaison homologue (HDR) qui est un événement de faible fréquence dans la cellule. De plus, la structure des matrices ssODN peut influencer la fidélité du mécanisme HDR (Guo et al., 2018). La technologie CRISPR/Cas9 n'est pas précise à 100%, bien que rares, certains effets off-target peuvent avoir des conséquences sur la survie des cellules lorsque des gènes essentiels sont modifiés.

Une seconde stratégie a permis d'exprimer de façon exogène le mutant DE et d'éteindre ponctuellement RACK1 endogène par transfection de siRACK1. Nous avons mis point et optimisé l'analyse du profil des polysomes nous permettant de vérifier l'association de RACK1 au ribosome. Nous avons identifié que la présence des mutations DE semble inhiber l'association entre RACK1^{DE} et le ribosome. Cependant, nous n'avons pas réussi à éteindre le recrutement de RACK1 endogène au ribosome. Ce modèle cellulaire ne nous permettait donc pas d'étudier de façon spécifique le rôle ribosomique de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante afin de comprendre la fonction de RACK1 dans l'infection virale et ses pathologies associées. Il est possible que dans les conditions de silencing, la quantité de RACK1 observée dans les fractions 40S, 80S et polysomales correspondent à RACK1 endogène. RACK1 libre est instable et a une demi-vie réduite en dehors du ribosome. RACK1 s'associe rapidement et stablement au ribosome pendant plusieurs heures dans des essais *in vitro* (Johnson et al., 2019). Soit les conditions de silencing n'étaient pas assez efficaces, soit le peu de RACK1 endogène résiduel, restant présent dans les cellules, a été totalement recruté au ribosome de façon stable. Nous souhaitons identifier spécifiquement RACK1 exogène avec un anticorps anti-Flag. Il a été supposé chez la levure que RACK1 associée au ribosome puisse se complexer en dimère (Yatime et al., 2011). Il est possible qu'un dimère se soit formé entre les protéines endogènes et exogènes et que dans ces conditions l'utilisation de l'anticorps anti-Flag ne permet pas spécifiquement de détecter la forme exogène de RACK1. De plus, la formation d'un dimère entre RACK1^{WT} et RACK1^{DE} permettrait d'associer la forme mutante de RACK1 au ribosome via son interaction avec la forme sauvage (Johnson et al., 2019).

L'association entre le mutant RACK1^{DE} et le ribosome a été décrite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où les acides aminés R38 et K40 interagissent avec l'hélice 39 de

l'ARNr 18S (Coyle et al., 2009; Sengupta et al., 2004). Le changement de charge induit par les deux mutations R38D et K40E empêcherait ainsi l'association de RACK1 avec la surface de l'ARNr chargée négativement. Une étude de la structure cristallographique d'Asc1 a permis d'identifier que seul le résidu R38 s'associe avec le ribosome en interagissant avec la protéine eS17 et non pas avec l'ARNr, alors qu'au contraire le résidu K40 ne semble former aucune liaison avec le ribosome, que ce soit avec l'ARNr ou des protéines ribosomiques suggérant que la mutation K40E ne devrait pas être responsable de la baisse d'affinité avec le ribosome (Ben-Shem et al., 2011; Nielsen et al., 2017). Une autre étude chez la levure suggère que la liaison entre le mutant DE et le ribosome est peut-être sous-estimée (Thompson et al., 2016). La perte d'association entre Asc1 et le ribosome observée par analyse des profils de polysomes pourrait être liée à l'introduction des mutations mais aussi de façon combinée aux conditions expérimentales. Asc1 se détacherait du ribosome lors de l'ultracentrifugation des lysats cellulaires sur le gradient de sucrose. Dans cette étude, par un traitement des échantillons au formaldéhyde précédent l'étape d'ultracentrifugation, Thompson et al. ont observé que le mutant DE a toujours la capacité de s'associer au ribosome *in vivo* mais dans une moindre mesure par rapport à la forme WT (Thompson et al., 2016). Une étude a observé chez la levure que le double mutant DE n'induit pas une libération totale d'Asc1 au ribosome *in vivo*, mais semble augmenter la flexibilité spatiale de la protéine et que son positionnement au ribosome diffère de la forme sauvage. Le mutant Asc1^{DE} peut toujours se lier au ribosome mais n'est pas aussi bien incorporé au ribosome qu'Asc1^{WT} (Opitz et al., 2017). L'identité de séquence entre RACK1 levure et humain est de 53% (Ullah et al., 2008). En comparaison avec RACK1, son homologue Asc1 chez la levure contient de nombreuses substitutions au niveau de l'interface d'interaction avec le ribosome (Johnson et al., 2019; Nielsen et al., 2017). Il est possible que l'introduction des deux points de mutations dans le modèle humain n'induisse pas les mêmes effets sur la conformation de la protéine ou son association avec le ribosome que chez la levure. Une étude récente souhaitant étudier l'interaction entre RACK1 et le ribosome humain n'a pas réussi à produire et purifier la forme mutante RACK1^{R36D,K38E} humaine indiquant que la présence des mutations puisse rendre instable la protéine ou induire son mauvais repliement (Johnson et al., 2019). Il semble que RACK1 humaine s'associe plus longtemps et avec une meilleure affinité qu'Asc1 au ribosome (Johnson et al., 2019). De plus, dans le modèle cellulaire que nous avons utilisé, RACK1 est nécessaire à la traduction de transcrits spécifiques impliqués dans la croissance et la survie cellulaire (Ruan et al., 2012). Il est possible que les différences entre le modèle levure et humain, notamment concernant la forte affinité de RACK1 humaine avec le ribosome peuvent expliquer nos résultats montrant que dans notre modèle, même si le mutant DE semble inhiber l'association au ribosome, le knock-down de RACK1 endogène n'est pas efficace dans le but de maintenir l'activité de RACK1 dans la traduction. Ce modèle n'est alors pas adapté pour étudier spécifiquement le rôle ribosomique de RACK1 humaine dans la traduction IRES-dépendante.

Pour découpler la fonction ribosomique de RACK1 de sa fonction dans la signalisation, il serait intéressant par une approche génétique de créer de nouveaux mutants. Le double mutant D109V, Q153R a été décrit comme empêchant l'interaction d'Asc1 avec protéine ribosomique eS17 ce qui entraîne un défaut de la traduction globale chez la levure (Kuroha et al., 2010). Le mutant D109Y montre une forte perte d'association avec le ribosome chez la

levure (Thompson et al., 2016; Nielsen et al., 2017) et son homologue chez l'Homme D107Y ne peut plus se lier avec la petite sous-unité 40S (Johnson et al., 2019).

Nous pourrions aussi utiliser une approche pharmacologique et cribler une banque de petites molécules dans le but d'identifier un petit peptide qui empêcherait l'association de RACK1 au ribosome tout en préservant ses fonctions cellulaires. Le criblage d'une banque de molécules chimiques a déjà permis d'identifier des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine. Par exemple, les Nutlins inhibent l'interaction entre les protéines p53 et Mdm2 et leur utilisation représente une stratégie intéressante pour activer l'apoptose p53-dépendante dans les tumeurs surexprimant Mdm2 (Vassilev et al., 2004). Actuellement il n'y a qu'un seul inhibiteur de RACK1 qui a été décrit dans la littérature mais celui-ci cible un résidu tyrosine qui se trouve dans l'interface libre au solvant lorsque RACK1 est associée au ribosome (Ullah et al., 2019).

Que ce soit avec un modèle mutant ou avec un inhibiteur, il sera important de valider la perte d'interaction de RACK1 avec le ribosome par l'analyse des profils de polysomes, puis d'analyser le comportement général de la cellule lorsque RACK1 ne peut plus se lier au ribosome par des tests fonctionnels de viabilité et de prolifération cellulaire. Il est important que le modèle mutant ou l'utilisation d'une molécule inhibitrice ne cible que les fonctions ribosomiques de RACK1 indépendamment de ses autres fonctions dans la cellule. Le modèle développé permettrait de comparer le transcriptome par séquençage des ARN en cours de traduction sur les fractions polysomales. Ces études pourraient être réalisées dans différentes conditions : après infection pour identifier les transcrits régulés par RACK1 impliqués dans la propagation virale ; dans des conditions standard ou de stress afin d'identifier les protéines dont l'expression est régulée par RACK1. La génération de ce type de modèle devrait également permettre d'étudier les mécanismes moléculaires de RACK1 dans l'initiation de la traduction et le recrutement des facteurs d'initiation comme eIF3 et eIF4G.

PARTIE II. Rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral

En réponse à l'environnement cellulaire l'expression de RACK1 est dérégulée, c'est notamment le cas dans de nombreux cancers où RACK1 est surexprimée (Li and Xie, 2015) et contribue à la progression tumorale par son rôle dans la prolifération cellulaire, l'adhésion, la migration et l'angiogenèse (Adams et al., 2011). Par exemple, RACK1 est impliquée dans la régulation des voies de l'inflammation via son interaction avec les kinases MAPK, JNK ou le complexe IKK dans les voies TNF- α et NF- κ B (Yao et al., 2014). Un faible changement de l'expression de RACK1 peut avoir des conséquences sur la régulation de nombreuses voies de signalisation et contribuer à la progression tumorale. Il avait été décrit chez les patients atteints de CHC une augmentation de l'expression de RACK1 dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus adjacents (Guo et al., 2013; Ruan et al., 2012), et que l'expression de RACK1 corrèle avec la progression clinique du CHC. Dans les cellules d'hépatocarcinomes humains Huh7, lorsque l'expression de RACK1 est fortement réduite par silencing nous avons observé une augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire CXCL10. Le rôle de RACK1 dans l'expression de CXCL10 a été confirmé dans un modèle d'hépatocytes primaires humains

(PHH) provenant de résections hépatiques de patients où la perte d'expression de RACK1 induit une augmentation de la transcription et de la sécrétion de CXCL10 (Thèse de Vincent Turon-Lagot, UMR_S1110, 2020). Par une analyse du transcriptome entre des cellules Huh7 naïves et des cellules où l'expression de RACK1 est abaissée, il a été montré que RACK1 régule les voies de signalisation NF- κ B, Jun/JNK, RIG-I, et que le silencing de RACK1 induit la surexpression des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, CXCL10, IL-18 et IL-33 (Thèse de Vincent Turon-Lagot, UMR_S1110, 2020). Dans le contexte du CHC, RACK1 module l'environnement inflammatoire en régulant la sécrétion de cytokines. Il a été décrit que la perte d'expression de RACK1 liée à l'âge induit un défaut d'activité de la PKC β II et de production de certaines cytokines ce qui participe au déséquilibre des réponses inflammatoires appelé « inflammaging » (Corsini et al., 1999, 2016a). La baisse d'expression de RACK1 corrèle avec la sécrétion des cytokines TNF- α et IL-8 dans des cellules THP-1 (Corsini et al., 2014), alors que l'utilisation d'un pseudo-substrat de RACK1 qui active directement la PKC β II induit l'expression des cytokines IL-6, IL-8 et IFN- γ dans les cellules immunitaires (Corsini et al., 2015). Dans la réponse immunitaire innée, RACK1 participe à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β via l'activation de la conformation active de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (Duan et al., 2020). Ainsi, par différents mécanismes RACK1 peut moduler la production et la sécrétion de cytokines.

Au sein du microenvironnement tumoral, les cytokines peuvent agir en tant que signaux pour influencer le destin final de la tumeur. Les macrophages associés à la tumeur (TAM) se trouvent parmi les populations qui constituent le microenvironnement de la tumeur, ils sont activés par divers stimuli et se différencient en sous-populations M1 et M2 pour bloquer ou favoriser le développement du cancer (Ruytinx et al., 2018; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Dans le CHC, une forte expression d'IL-10 entraîne une augmentation de la production et de la sécrétion d'interleukines IL-4 et IL-13 qui induisent la polarisation des macrophages pro-tumoraux M2. Au contraire, la surexpression de ces trois interleukines inhibe la production ainsi que la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α qui participent à la polarisation des macrophages antitumoraux M1 (Lewis, 2014). Le CHC est caractérisé par un enrichissement de macrophages de type M2 qui sont d'importants promoteurs de l'initiation et de la progression de la tumeur. Les TAM représentent une cible intéressante pour perturber la formation et le développement du CHC (Zhou et al., 2020).

Récemment, il a été décrit un nouveau rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral du cancer épidermoïde oral (OSCC) où RACK1 est fortement exprimée et dont l'expression corrèle avec la progression de la tumeur (Liu et al., 2018). La surexpression de RACK1 dans l'OSCC est associée à l'inhibition du recrutement des macrophages ainsi qu'à l'augmentation du ratio M2/M1 au sein de l'environnement tumoral favorisant la progression du cancer (Dan et al., 2020). Nous souhaitons étudier le rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral du cancer du foie et avons émis l'hypothèse que lors de la réponse inflammatoire, RACK1 pourrait réguler l'expression et la sécrétion de cytokines pouvant induire préférentiellement la polarisation des macrophages pro-tumoraux et ainsi favoriser le développement du cancer.

Pour étudier le rôle de RACK1 dans la polarisation des macrophages, nous avons dans un premier temps mis au point des outils nous permettant d'identifier les populations de type M1 et M2. Nous avons développé une expérience de polarisation *in vitro* à partir d'une lignée de monocytes THP-1 dérivée de leucémie aiguë qui ont la capacité de mimer les phénotypes M1 et M2 des macrophages humains en fonction des conditions de culture (Maess et al., 2014). Nous avons observé que l'expression de RACK1 n'avait pas d'impact sur la polarisation macrophages ni dans l'OSCC, ni dans le CHC. Dans une expérience préliminaire, par analyse des marqueurs de surface en cytométrie en flux nous avons observé que le silencing de RACK1 contrôle le ratio M2/M1 en diminuant la polarisation de type M2 dans la condition où les cellules du milieu conditionné ont été cultivées en absence de sérum pendant 3 jours pour reproduire les conditions expérimentales décrites dans la littérature (Dan et al., 2020). Le sérum contient les facteurs nécessaires à la prolifération rapide des cellules *in vitro* et son absence dans le milieu conduit à un arrêt de la croissance cellulaire. Nous souhaitons vérifier si RACK1 modulait la polarisation des macrophages M1 et M2 en condition de stress et avons testé différentes conditions de privation de sérum (0%, 24h ; 1%, 72h). Ces expériences ne nous ont pas permis d'observer une différence du ratio M2/M1 dans les conditions où l'expression de RACK1 est réduite par siARN par rapport à la condition contrôle. Dans la publication de Dan et al., le milieu conditionné induisant une différence de ratio M2/M1 a été récolté après 48 heures de culture en absence de sérum. Dans nos conditions expérimentales, nous avons testé 24 heures de milieu sans sérum car au bout de 48 heures nous avons observé une baisse de la viabilité cellulaire de 90% ce qui ne nous permettait pas de vérifier la perte d'expression de RACK1 par western blot. Le stress induit pendant 24 heures n'a potentiellement pas été suffisant pour observer une différence significative de polarisation entre les phénotypes M2 et M1. Dans l'article publié par Dan et al., à aucun moment les auteurs n'ont discuté de la possibilité que l'absence de sérum dans le milieu conditionné peut avoir influencé le devenir des macrophages. RACK1 étant impliquée dans des voies de signalisation en réponse au stress, un effet combiné entre le stress induit par l'absence de sérum et l'expression de RACK1 peut être à l'origine de la modulation de la polarisation des macrophages M1 et M2.

Dans l'environnement tumoral les cellules sont soumises à de nombreuses conditions de stress telles que l'hypoxie, le stress oxydatif et la privation de nutriments. Par exemple, en réponse à l'hypoxie RACK1 empêche l'activation de la voie MAPK ce qui conduit à la survie cellulaire et inhibe l'apoptose (Arimoto et al., 2008). En l'absence de nutriment, RACK1 participe à la formation de l'autophagosome via sa phosphorylation par l'AMPK et il a été décrit qu'un défaut de RACK1 dans les hépatocytes peut conduire à l'accumulation de lipides dans le foie (Zhao et al., 2015). L'autophagie peut être impliquée dans un mode non-conventionnel de sécrétion des cytokines (Stow and Murray, 2013). De plus, dans le microenvironnement tumoral du CHC, l'autophagie a été décrite comme pouvant réguler directement le facteur de transcription NF- κ B pour contrôler la polarisation des macrophages pro-tumoraux M2 (Chang et al., 2013). Il serait donc intéressant d'induire des stress tels que l'hypoxie ou l'autophagie dans les cellules où l'expression de RACK1 est éteinte pour observer si le rôle de RACK1 dans la réponse au stress peut influencer le devenir du microenvironnement tumoral. En plus d'observer le ratio entre les macrophages M2 et M1, il

faudrait vérifier le recrutement total des macrophages lorsque l'expression de RACK1 est réduite. En effet, Dan et al. avaient observé qu'en plus de moduler le ratio M2/M1, la surexpression de RACK1 inhibe le recrutement des macrophages totaux. Il serait intéressant d'identifier les cytokines régulées par RACK1 qui sont produites dans l'environnement tumoral du CHC et qui conduisent à la polarisation de type M2 pour comprendre comment l'expression de cytokines telles que CXCL10 peuvent influencer le devenir de la tumeur. CXCL10 est une chimiokine dont l'expression corrèle avec l'agressivité de la tumeur chez les patients atteints de CHC (Li et al. 2017). Deux études ont montré que l'expression de CXCL10 est directement impliquée dans le recrutement des macrophages. Dans la stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui est un trouble inflammatoire lipotoxique, CXCL10 médie le recrutement des macrophages pro-inflammatoires mais pas des autres cellules immunitaires associées à l'inflammation. La délétion génétique de CXCL10^{-/-} chez des souris réduit l'infiltration pro-inflammatoire de macrophages hépatiques (M1) et permet d'atténuer l'inflammation dans le foie (Tomita et al., 2016). Dans une autre étude, il a été identifié que les fibroblastes pulmonaires activés induisent la sécrétion de CXCL10 ce qui favorise la polarisation du phénotype M1 des macrophages. La sécrétion de CXCL10 augmente l'expression des marqueurs de surface cellulaire de type M1 (iNOS et CD86) et entraîne une diminution des marqueurs de type M2 (Arg I et CD206) (Tsai et al., 2019). Dans le cadre du CHC, il serait intéressant de comprendre au niveau moléculaire comment CXCL10 régule la réponse inflammatoire et notamment son impact sur la polarisation des macrophages dans le microenvironnement tumoral.

CONCLUSION

Dans la première partie de ma thèse, notre objectif était d'étudier le rôle de la protéine RACK1 dans la traduction IRES-dépendante des ARN viraux et cellulaires. J'ai pu confirmer que RACK1 est impliquée dans la traduction IRES-dépendante du VHC et identifier son implication dans la traduction d'autres ARN viraux comme EMCV, FMDV et PV qui appartiennent à différents types d'IRES. Mes résultats de thèse suggèrent que RACK1 peut être impliquée dans un mécanisme universel de traduction IRES-dépendante. De plus, nous avons identifié que RACK1 régule aussi la traduction IRES-dépendante de certains ARNm cellulaires comme BiP ou Apaf-1 dans des cellules dérivées de CHC. RACK1 pourrait alors réguler la traduction IRES-dépendante de certains ARNm spécifiques impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses.

Pour étudier spécifiquement le rôle ribosomique de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante, nous souhaitions dans un premier temps exprimer le mutant R36D,K38E de façon endogène par CRISPR/Cas9, malgré nos efforts nous n'avons pu produire que des mutants hétérozygotes pour les simples mutations. Nous avons alors exprimé de façon exogène le mutant R36D,K38E qui semble impacter le recrutement au ribosome mais n'avons pas réussi à éteindre l'expression de RACK1 endogène. Nous avons conclu que ce modèle n'était pas adapté pour étudier la fonction ribosomique de RACK1 et qu'il serait intéressant de développer un inhibiteur de RACK1 pour observer précisément le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante indépendamment de ces fonctions cellulaires. Inhiber l'interaction de RACK1 au ribosome permettrait à la fois de comprendre les mécanismes moléculaires auxquels participe RACK1 dans la traduction IRES-dépendante de différents types d'IRES viraux, mais aussi d'identifier le spectre d'action de RACK1 dans l'infection virale, ainsi que les transcrits dont la traduction est régulée par RACK1 et qui conduisent à la prolifération et à la survie des cellules cancéreuses. Ces études permettraient de valider RACK1 comme une cible thérapeutique pour un large spectre de maladies IRES-dépendantes.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons étudié le rôle de RACK1 dans le microenvironnement tumoral. Plusieurs études ont montré que l'expression de RACK1 jouait un rôle important dans la progression du cancer et pouvait être utilisée comme un indicateur de mauvais pronostic (Li and Xie, 2015). Un faible changement d'expression de RACK1 peut avoir des conséquences sur la régulation de nombreuses voies de signalisation et contribuer à la progression tumorale. Nous avons observé une augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire CXCL10 en absence de RACK1 dans les cellules dérivées de CHC. Nous souhaitions étudier l'impact de l'expression de RACK1 sur la sécrétion des cytokines pouvant influencer l'environnement tumoral en modulant la polarisation des macrophages. Nous avons observé que l'expression de RACK1 n'avait pas d'effet sur la polarisation des macrophages dans le CHC. Mais des résultats préliminaires suggèrent que le stress cellulaire combiné à la perte d'expression de RACK1 peut inhiber la polarisation des macrophages pro-tumoraux. Il serait intéressant d'étudier le rôle de RACK1 dans la polarisation des macrophages en réponse à différents stress cellulaires et aussi d'identifier comment l'expression de cytokines comme CXCL10 peuvent réguler le microenvironnement tumoral. La poursuite de ces travaux permettrait de mieux comprendre comment la régulation de l'expression de RACK1 dans le cancer permet de moduler l'activité des cellules immunitaires

associées à l'inflammation dans le but d'induire un microenvironnement favorable au développement du cancer.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, D.R., Ron, D., and Kiely, P.A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal* 9, 22.
- Ahn, B.K., Kim, S.H., Paik, S.S., and Lee, K.H. (2016). Loss of APAF-1 expression is associated with early recurrence in stage I, II, and III colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 401, 1203–1210.
- Aldo, P.B., Craveiro, V., Guller, S., and Mor, G. (2013). Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. *American Journal of Reproductive Immunology* 7.
- Allam, H., and Ali, N. (2010). Initiation factor eIF2-independent mode of c-Src mRNA translation occurs via an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* 285, 5713–5725.
- Anderson, E.C., Hunt, S.L., and Jackson, R.J. (2007). Internal initiation of translation from the human rhinovirus-2 internal ribosome entry site requires the binding of Unr to two distinct sites on the 5' untranslated region. *J Gen Virol* 88, 3043–3052.
- Andreev, D.E., Fernandez-Miragall, O., Ramajo, J., Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Martinez-Salas, E., and Shatsky, I.N. (2007). Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA* 13, 1366–1374.
- Angenstein, F., Evans, A.M., Settlage, R.E., Moran, S.T., Ling, S.-C., Klintsova, A.Y., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Greenough, W.T. (2002). A Receptor for Activated C Kinase Is Part of Messenger Ribonucleoprotein Complexes Associated with PolyA-mRNAs in Neurons. *J. Neurosci.* 22, 8827–8837.
- Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* 10, 1324–1332.
- Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., et al. (2010a). Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19748–19753.
- Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., et al. (2010b). Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19754–19759.
- Audigier, S., Guiramand, J., Prado-Lourenco, L., Conte, C., Gonzalez-Herrera, I.G., Cohen-Solal, C., Recasens, M., and Prats, A.C. (2008). Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA* 14, 1852–1864.
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T., and Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12, 2610–2622.

- Balvay, L., Rifo, R.S., Ricci, E.P., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 542–557.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 24, 165–169.
- Battaini, F., and Pascale, A. (2005). Protein Kinase C Signal Transduction Regulation in Physiological and Pathological Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1057, 177–192.
- Baumann, M., Gires, O., Kolch, W., Mischak, H., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (2000). The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein–Barr virus activator protein BZLF1. *European Journal of Biochemistry* 267, 3891–3901.
- Belsham, G.J. (2009). Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Research* 10.
- Belsham, G.J., and Brangwyn, J.K. (1990). A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J Virol* 64, 5389–5395.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* 334, 1524–1529.
- Berlioz, C., and Darlix, J.L. (1995). An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol* 69, 2214–2222.
- Bi, J., Zhao, Q., Zhu, L., Li, X., Yang, G., Liu, J., and Yin, G. (2018). RACK1 is indispensable for porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and NF-κB activation in Marc-145 cells. *Sci Rep* 8, 2985.
- Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J.D., and Stark, H. (2005). Structure of the Hepatitis C Virus IRES Bound to the Human 80S Ribosome: Remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13, 1695–1706.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474–2488.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell* 28, 501–512.
- Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M., and Siliciano, R.F. (2001). The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site. *J Virol* 75, 181–191.

- Buensuceso, C.S., Obergfell, A., Soriani, A., Eto, K., Kiosses, W.B., Arias-Salgado, E.G., Kawakami, T., and Shattil, S.J. (2005). Regulation of Outside-in Signaling in Platelets by Integrin-associated Protein Kinase C β . *Journal of Biological Chemistry* *280*, 644–653.
- Buettner, R., Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *8*, 945–954.
- Buoso, E., Galasso, M., Serafini, M.M., Ronfani, M., Lanni, C., Corsini, E., and Racchi, M. (2017). Transcriptional regulation of RACK1 and modulation of its expression: Role of steroid hormones and significance in health and aging. *Cellular Signalling* *35*, 264–271.
- Buoso, E., Masi, M., Long, A., Chiappini, C., Travelli, C., Govoni, S., and Racchi, M. (2020). Ribosomes as a nexus between translation and cancer progression: Focus on ribosomal Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) in breast cancer. *British Journal of Pharmacology* *n/a*, 1–16.
- Cao, X.-X., Xu, J.-D., Xu, J.-W., Liu, X.-L., Cheng, Y.-Y., Wang, W.-J., Li, Q.-Q., Chen, Q., Xu, Z.-D., and Liu, X.-P. (2010). RACK1 promotes breast carcinoma proliferation and invasion/metastasis in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* *123*, 375–386.
- Cecconi, F., and Gruss, P. (2001). Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how many ways to die? *Cell Mol Life Sci* *58*, 1688–1697.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhäuser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* *426*, 579–583.
- Ceci, M., Welshhans, K., Ciotti, M.T., Brandi, R., Parisi, C., Paoletti, F., Pistillo, L., Bassell, G.J., and Cattaneo, A. (2012). RACK1 Is a Ribosome Scaffold Protein for β -actin mRNA/ZBP1 Complex. *PLoS ONE* *7*, e35034.
- Chan, Y.K., and Gack, M.U. (2015). RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity. *Current Opinion in Virology* *12*, 7–14.
- Chang, B.Y., Chiang, M., and Cartwright, C.A. (2001). The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem* *276*, 20346–20356.
- Chang, B.Y., Harte, R.A., and Cartwright, C.A. (2002). RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene* *21*, 7619–7629.
- Chang, C.P., Su, Y.C., Lee, P.H., and Lei, H.Y. (2013). Targeting NF κ B by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation. *Autophagy* *9*, 619–621.
- Chang, I.-F., Szick-Miranda, K., Pan, S., and Bailey-Serres, J. (2005). Proteomic Characterization of Evolutionarily Conserved and Variable Proteins of Arabidopsis Cytosolic Ribosomes. *Plant Physiol.* *137*, 848–862.
- Chanput, W., Mes, J.J., and Wichers, H.J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* *23*, 37–45.

- Chantrel, Y., Gaisne, M., Lions, C., and Verdière, J. (1997). The Transcriptional Regulator Hap1p (Cyp1p) Is Essential for Anaerobic or Heme-Deficient Growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and Molecular Characterization of an Extragenic Suppressor that Encodes a WD Repeat Protein. *Genetics* 11.
- Chappell, S.A., LeQuesne, J.P., Paulin, F.E., deSchoolmeester, M.L., Stoneley, M., Soutar, R.L., Ralston, S.H., Helfrich, M.H., and Willis, A.E. (2000). A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* 19, 4437–4440.
- Cho, S., Park, S.M., Kim, T.D., Kim, J.H., Kim, K.T., and Jang, S.K. (2007). BiP internal ribosomal entry site activity is controlled by heat-induced interaction of NSAP1. *Mol Cell Biol* 27, 368–383.
- Coldwell, M.J., Mitchell, S.A., Stoneley, M., MacFarlane, M., and Willis, A.E. (2000). Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* 19, 899–905.
- Conte, C., Ainaoui, N., Delluc-Clavieres, A., Khoury, M.P., Azar, R., Pujol, F., Martineau, Y., Pyronnet, S., and Prats, A.C. (2009). Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res* 37, 5267–5278.
- Corsini, E., Battaini, F., Lucchi, L., Marinovich, M., Racchi, M., Govoni, S., and Galli, C.L. (1999). A defective protein kinase C anchoring system underlying age-associated impairment in TNF- α production in rat macrophages. *The Journal of Immunology* 163, 3468–3473.
- Corsini, E., Pinto, A., Galbiati, V., Viviani, B., Galli, C.L., Marinovich, M., and Racchi, M. (2014). Corticosteroids modulate the expression of the PKC-anchoring protein RACK-1 and cytokine release in THP-1 cells. *Pharmacological Research* 81, 10–16.
- Corsini, E., Galbiati, V., Pinto, A., Davin, A., Polito, L., Guaita, A., and Racchi, M. (2015). Immunostimulatory effects of RACK1 pseudosubstrate in human leukocytes obtained from young and old donors. *Oncotarget* 6, 6524–6534.
- Corsini, E., Galbiati, V., Papale, A., Kummer, E., Pinto, A., Serafini, M.M., Guaita, A., Spezzano, R., Caruso, D., Marinovich, M., et al. (2016a). Role of androgens in dhea-induced rack1 expression and cytokine modulation in monocytes. *Immun Ageing* 13, 20.
- Corsini, E., Galbiati, V., Papale, A., Kummer, E., Pinto, A., Guaita, A., and Racchi, M. (2016b). The role of HSP27 in RACK1-mediated PKC activation in THP-1 cells. *Immunol Res* 64, 940–950.
- Cox, E.A., Bennin, D., Doan, A.T., O'Toole, T., and Huttenlocher, A. (2003a). RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell* 14, 658–669.
- Cox, E.A., Bennin, D., Doan, A.T., O'Toole, T., and Huttenlocher, A. (2003b). RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell* 14, 658–669.

- Coyle, S.M., Gilbert, W.V., and Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* 29, 1626–1634.
- Dan, H., Liu, S., Liu, J., Liu, D., Yin, F., Wei, Z., Wang, J., Zhou, Y., Jiang, L., Ji, N., et al. (2020). RACK1 promotes cancer progression by increasing the M2/M1 macrophage ratio via the NF- κ B pathway in oral squamous cell carcinoma. *Mol Oncol* 795–807.
- Daulat, A.M., and Borg, J.-P. (2017). Wnt/Planar Cell Polarity Signaling: New Opportunities for Cancer Treatment. *Trends in Cancer* 3, 113–125.
- Del Vecchio, I., Zuccotti, A., Pisano, F., Canneva, F., Lenzken, S.C., Rousset, F., Corsini, E., Govoni, S., and Racchi, M. (2009). “Functional mapping of the promoter region of the GNB2L1 human gene coding for RACK1 scaffold protein.” *Gene* 430, 17–29.
- Demirov, D., Gabriel, G., Schneider, C., Hohenberg, H., and Ludwig, S. (2012). Interaction of influenza A virus matrix protein with RACK1 is required for virus release. *Cellular Microbiology* 14, 774–789.
- Deng, Y.Z., Yao, F., Li, J.J., Mao, Z.F., Hu, P.T., Long, L.Y., Li, G., Ji, X.D., Shi, S., Guan, D.X., et al. (2012). RACK1 suppresses gastric tumorigenesis by stabilizing the beta-catenin destruction complex. *Gastroenterology* 142, 812–823 e15.
- Dobrikov, M.I., Dobrikova, E.Y., and Gromeier, M. (2018a). Ribosomal RACK1:PKC β 1 modulates intramolecular interactions between unstructured regions of eIF4G that control eIF4E and eIF3 binding. *Mol Cell Biol*.
- Dobrikov, M.I., Dobrikova, E.Y., and Gromeier, M. (2018b). Ribosomal RACK1:PKC β 1 phosphorylates eIF4G1(S1093) to modulate cap-dependent and -independent translation initiation. *Mol Cell Biol* 38, 304–318.
- Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., et al. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 34, 184–191.
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., and Chisari, F.V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14046–14051.
- Duan, F., Wu, H., Jia, D., Wu, W., Ren, S., Wang, L., Song, S., Guo, X., Liu, F., Ruan, Y., et al. (2018). O -GlcNAcylation of RACK1 promotes hepatocellular carcinogenesis. *Journal of Hepatology* 68, 1191–1202.
- Duan, Y., Zhang, L., Angosto-Bazarra, D., Pelegrín, P., Núñez, G., and He, Y. (2020). RACK1 Mediates NLRP3 Inflammasome Activation by Promoting NLRP3 Active Conformation and Inflammasome Assembly. *Cell Reports* 33, 108405.
- Erbil, S., Oral, O., Mitou, G., Kig, C., Durmaz-Timucin, E., Guven-Maiorov, E., Gulacti, F., Gokce, G., Dengjel, J., Sezerman, O.U., et al. (2016). RACK1 Is an Interaction Partner of ATG5 and a Novel Regulator of Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 291, 16753–16765.

- Erdi, B., Nagy, P., Zvara, A., Varga, A., Piracs, K., Ménesi, D., Puskás, L., and Juhasz, G. (2012). Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy* 8.
- Fang, Y., Fang, L., Wang, Y., Lei, Y., Luo, R., Wang, D., Chen, H., and Xiao, S. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 contributes to NF- κ B activation. *Virology* 9, 1–10.
- Fernández, I.S., Bai, X.-C., Murshudow, S.H.W., and Ramakrishnan, V. (2014). Initiation of Translation by Cricket Paralysis Virus IRES Requires Its Translocation in the Ribosome. *Cell* 157, 9.
- Filbin, M.E., and Kieft, J.S. (2009). Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Current Opinion in Structural Biology* 19, 267–276.
- Forrester, M.A., Wassall, H.J., Hall, L.S., Cao, H., Wilson, H.M., Barker, R.N., and Vickers, M.A. (2018). Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol* 332, 58–76.
- Fraser, C.S., Hershey, J.W.B., and Doudna, J.A. (2009). The pathway of hepatitis C virus mRNA recruitment to the human ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 16, 397–404.
- Fu, Y., Quan, R., Zhang, H., Hou, J., Tang, J., and Feng, W. (2012). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Induces Interleukin-15 through the NF- κ B Signaling Pathway. *Journal of Virology* 86, 7625–7636.
- Gallina, A., Rossi, F., and Milanesi, G. (2001). Rack1 Binds HIV-1 Nef and Can Act as a Nef-Protein Kinase C Adaptor. *Virology* 283, 7–18.
- Gallo, S., Ricciardi, S., Manfrini, N., Pesce, E., Oliveto, S., Calamita, P., Mancino, M., Maffioli, E., Moro, M., Crosti, M., et al. (2018). RACK1 Specifically Regulates Translation through its Binding to Ribosomes. *Mol Cell Biol*.
- Gandin, V., Miluzio, A., Barbieri, A.M., Beugnet, A., Kiyokawa, H., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2008). Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation. *Nature* 455, 684–688.
- Gandin, V., Senft, D., Topisirovic, I., and Ronai, Z.A. (2013). RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis. *Genes Cancer* 4, 369–377.
- Gao, Y. (2016). Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. 17.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., and Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* 15, 577.

- des Georges, A., Dhote, V., Kuhn, L., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., Frank, J., and Hashem, Y. (2015). Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex. *Nature* 525, 491–495.
- Gerbasì, V.R., Weaver, C.M., Hill, S., Friedman, D.B., and Link, A.J. (2004). Yeast Asc1p and Mammalian RACK1 Are Functionally Orthologous Core 40S Ribosomal Proteins That Repress Gene Expression. *Mol Cell Biol* 24, 8276–8287.
- Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., and Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research* 151, 251–264.
- Godet, A.C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., and Prats, A.C. (2019). IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int J Mol Sci* 20.
- Gonçalves, K.A., Borges, J.C., Silva, J.C., Papa, P.F., Bressan, G.C., Torriani, I.L., and Kobarg, J. (2010). Solution structure of the human signaling protein RACK. 12.
- Grosso, S., Volta, V., Sala, L.A., Vietri, M., Marchisio, P.C., Ron, D., and Biffo, S. (2008a). PKC β 1 modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *Biochem J* 415, 77–85.
- Grosso, S., Volta, V., Vietri, M., Gorrini, C., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2008b). Eukaryotic ribosomes host PKC activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376, 65–69.
- Guo, J., Jin, Z., Yang, X., Li, J.-F., and Chen, J.-G. (2011). Eukaryotic initiation factor 6, an evolutionarily conserved regulator of ribosome biogenesis and protein translation. *Plant Signal Behav* 6, 766–771.
- Guo, Q., Mintier, G., Ma-Edmonds, M., Storton, D., Wang, X., Xiao, X., Kienzle, B., Zhao, D., and Feder, J.N. (2018). ‘Cold shock’ increases the frequency of homology directed repair gene editing in induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 8, 2080.
- Guo, Y., Wang, W., Wang, J., Feng, J., Wang, Q., Jin, J., Lv, M., Li, X., Li, Y., Ma, Y., et al. (2013). Receptor for activated C kinase 1 promotes hepatocellular carcinoma growth by enhancing mitogen-activated protein kinase kinase 7 activity. *Hepatology* 57, 140–151.
- Hafirassou, M.L., Meertens, L., Umana-Diaz, C., Labeau, A., Dejarnac, O., Bonnet-Madin, L., Kummerer, B.M., Delaugerre, C., Roingeard, P., Vidalain, P.O., et al. (2017). A Global Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. *Cell Rep* 21, 3900–3913.
- Hamarsheh, S., and Zeiser, R. (2020). NLRP3 Inflammasome Activation in Cancer: A Double-Edged Sword. *Front Immunol* 11, 1444.
- Haro, T., Shimoda, K., Kakumitsu, H., Kamezaki, K., Numata, A., Ishikawa, F., Sekine, Y., Muromoto, R., Matsuda, T., and Harada, M. (2004). Tyrosine Kinase 2 Interacts with and

Phosphorylates Receptor for Activated C Kinase-1, a WD Motif-Containing Protein. *J Immunol* *173*, 1151–1157.

Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* *475*, 324–332.

Hashem, Y., des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., and Frank, J. (2013). Structure of the Mammalian Ribosomal 43S Preinitiation Complex Bound to the Scanning Factor DHX29. *Cell* *153*, 1108–1119.

He, S.L., and Green, R. (2013). Polysome analysis of mammalian cells. *Methods Enzymol* *530*, 183–192.

He, Y., Hara, H., and Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences* *41*, 1012–1021.

Hellen, C.U.T. (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* *1789*, 558–570.

Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem* *83*, 8604–8610.

Hu, F., Tao, Z., Wang, M., Li, G., Zhang, Y., Zhong, H., Xiao, H., Xie, X., and Ju, M. (2013). RACK1 promoted the growth and migration of the cancer cells in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* *34*, 3893–3899.

Hu, Y., Liu, J.P., Li, X.Y., Cai, Y., He, C., Li, N.S., Xie, C., Xiong, Z.J., Ge, Z.M., Lu, N.H., et al. (2019). Downregulation of tumor suppressor RACK1 by *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis through the integrin beta-1/NF-kappaB signaling pathway. *Cancer Lett* *450*, 144–154.

Huang, Y., Ge, W., Zhou, J., Gao, B., Qian, X., and Wang, W. (2021). The Role of Tumor Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer* *12*, 1284–1294.

Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E., and Wagner, E.F. (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation (American Society for Clinical Investigation).

Huynh, J., Chand, A., Gough, D., and Ernst, M. (2019). Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer — using tissue repair as a road map. *Nat Rev Cancer* *19*, 82–96.

Ikebuchi, Y., Ito, K., Takada, T., Anzai, N., Kanai, Y., and Suzuki, H. (2010). Receptor for Activated C-Kinase 1 Regulates the Cell Surface Expression and Function of ATP Binding Cassette G2. *Drug Metab Dispos* *38*, 2320–2328.

- Ikedo, M., Morizane, C., Ueno, M., Okusaka, T., Ishii, H., and Furuse, J. (2018). Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 48, 103–114.
- Ikeuchi, K., and Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci Rep* 6, 28234.
- Ikeuchi, K., Izawa, T., and Inada, T. (2019). Recent Progress on the Molecular Mechanism of Quality Controls Induced by Ribosome Stalling. *Front. Genet.* 9.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113–127.
- Jan, E., and Sarnow, P. (2002). Factorless Ribosome Assembly on the Internal Ribosome Entry Site of Cricket Paralysis Virus. *J Mol Biol* 324, 889–902.
- Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of Virology* 62, 2636–2643.
- Jannot, G., Bajan, S., Giguère, N.J., Bouasker, S., Banville, I.H., Piquet, S., Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2011). The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep* 12, 581–586.
- Jha, S., Rollins, M.G., Fuchs, G., Procter, D.J., Hall, E.A., Cozzolino, K., Sarnow, P., Savas, J.N., and Walsh, D. (2017). Trans-kingdom mimicry underlies ribosome customization by a poxvirus kinase. *Nature* 546, 651–655.
- Jia, B., Guo, M., Li, G., Yu, D., Zhang, X., Lan, K., and Deng, Q. (2014). Hepatitis B Virus Core Protein Sensitizes Hepatocytes to Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis by Suppression of the Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7. *J Virol* 89, 2041–2051.
- Johnson, A.G., Grosely, R., Petrov, A.N., and Puglisi, J.D. (2017). Dynamics of IRES-mediated translation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372, 20160177.
- Johnson, A.G., Lapointe, C.P., Wang, J., Corsepis, N.C., Choi, J., Fuchs, G., and Puglisi, J.D. (2019). RACK1 on and off the ribosome. *RNA*.
- Kafasla, P., Morgner, N., Robinson, C.V., and Jackson, R.J. (2010). Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *The EMBO Journal* 29, 3710–3722.
- Kang, S.-T., Wang, H.-C., Yang, Y.-T., Kou, G.-H., and Lo, C.-F. (2013). The DNA Virus White Spot Syndrome Virus Uses an Internal Ribosome Entry Site for Translation of the Highly Expressed Nonstructural Protein ICP35. *J Virol* 87, 13263–13278.
- Kasai, F., Hirayama, N., Ozawa, M., Satoh, M., and Kohara, A. (2018). HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Hum Cell* 31, 261–267.

- Kell, A.M., and Gale, M. (2015). RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 479–480, 110–121.
- Keller, R. (2002). Shaping the Vertebrate Body Plan by Polarized Embryonic Cell Movements. *Science* 298, 1950–1954.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., and He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 3328.
- Kerr, C.H., and Jan, E. (2016). Commandeering the Ribosome: Lessons Learned from Dicistroviruses about Translation. *J Virol* 90, 5538–5540.
- Khawaja, A., Vopalensky, V., and Pospisek, M. (2015). Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function. *WIREs RNA* 6, 211–224.
- Kieft, J.S. (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 274–283.
- Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., and Doudna, J.A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7, 194–206.
- Kiely, M., Adams, D.R., Hayes, S.L., O'Connor, R., Baillie, G.S., and Kiely, P.A. (2017). RACK1 stabilises the activity of PP2A to regulate the transformed phenotype in mammary epithelial cells. *Cell Signal* 35, 290–300.
- Kiely, P.A., Sant, A., and O'Connor, R. (2002). RACK1 Is an Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Receptor-interacting Protein That Can Regulate IGF-1-mediated Akt Activation and Protection from Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22581–22589.
- Kiely, P.A., Leahy, M., O'Gorman, D., and O'Connor, R. (2005). RACK1-mediated Integration of Adhesion and Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) Signaling and Cell Migration Are Defective in Cells Expressing an IGF-I Receptor Mutated at Tyrosines 1250 and 1251. *Journal of Biological Chemistry* 280, 7624–7633.
- Kiely, P.A., Baillie, G.S., Lynch, M.J., Houslay, M.D., and O'Connor, R. (2008). Tyrosine 302 in RACK1 Is Essential for Insulin-like Growth Factor-I-mediated Competitive Binding of PP2A and β 1 Integrin and for Tumor Cell Proliferation and Migration. *Journal of Biological Chemistry* 283, 22952–22961.
- Kiely, P.A., Baillie, G.S., Barrett, R., Buckley, D.A., Adams, D.R., Houslay, M.D., and O'Connor, R. (2009). Phosphorylation of RACK1 on Tyrosine 52 by c-Abl Is Required for Insulin-like Growth Factor I-mediated Regulation of Focal Adhesion Kinase. *J Biol Chem* 284, 20263–20274.
- Kim, H.D., Kong, E., Kim, Y., Chang, J.S., and Kim, J. (2017). RACK1 depletion in the ribosome induces selective translation for non-canonical autophagy. *Cell Death Dis* 8, e2800.
- Komar, A.A., and Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle* 10, 229–240.

- Komar, A.A., and Hatzoglou, M. (2015). Exploring Internal Ribosome Entry Sites as Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* 5.
- Kouba, T., Rutkai, E., Karaskova, M., and Valasek, L. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res* 40, 2683–2699.
- Kraus, S., Gioeli, D., Vomastek, T., Gordon, V., and Weber, M.J. (2006). Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) and Src Regulate the Tyrosine Phosphorylation and Function of the Androgen Receptor. *Cancer Res* 66, 11047–11054.
- Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S., and Fujii, N. (2002). Association of Mumps Virus V Protein with RACK1 Results in Dissociation of STAT-1 from the Alpha Interferon Receptor Complex. *Journal of Virology* 76, 12676–12682.
- Kuhn, L., Majzoub, K., Einhorn, E., Chicher, J., Pompon, J., Imler, J.L., Hammann, P., and Meignin, C. (2017). Definition of a RACK1 Interaction Network in *Drosophila melanogaster* Using SWATH-MS. *G3 (Bethesda)* 7, 2249–2258.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11, 956–961.
- LaFontaine, E., Miller, C.M., Permaul, N., Martin, E.T., and Fuchs, G. (2020). Ribosomal protein RACK1 enhances translation of poliovirus and other viral IRESs. *Virology* 545, 53–62.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1995). Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 21975–21983.
- Landry, D.M., Hertz, M.I., and Thompson, S.R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev* 23, 2753–2764.
- Larburu, N., Montellese, C., O'Donohue, M.F., Kutay, U., Gleizes, P.E., and Plisson-Chastang, C. (2016). Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 44, 8465–8478.
- Lee, J.S., Tabata, K., Twu, W.I., Rahman, S.M., Kim, H.S., Yu, J.B., Jee, M.H., Bartenschlager, R., and Jang, S.K. (2019). RACK1 mediates rewiring of intracellular networks induced by hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog* 15, e1008021.
- Lee, K.-M., Chen, C.-J., and Shih, S.-R. (2017). Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends in Microbiology* 25, 546–561.
- Legate, K.R., Wickström, S.A., and Fässler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397–418.
- Lei, J., Li, Q., Gao, Y., Zhao, L., and Liu, Y. (2016). Increased PKC α activity by Rack1 overexpression is responsible for chemotherapy resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cell line. *Sci Rep* 6, 33717.

- Lewis, M. (2014). Tumor-Associated Macrophages, Inflammation and Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 08, 5.
- Li, D., and Roberts, R. (2001). Human Genome and Diseases: Review. 58, 13.
- Li, J., and Lee, A.S. (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 6, 45–54.
- Li, J.J., and Xie, D. (2015). RACK1, a versatile hub in cancer. *Oncogene* 34, 1890–1898.
- Li, L., Zhu, Y.H., Li, Y., and Guan, X.Y. (2017). Identification of chemokine CXCL10 in tumor microenvironment by antibody array as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 64, 778–786.
- Li, S., Esterberg, R., Lachance, V., Ren, D., Radde-Gallwitz, K., Chi, F., Parent, J.-L., Fritz, A., and Chen, P. (2011). Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 2264–2269.
- Licursi, M., Christian, S.L., Pongnopparat, T., and Hirasawa, K. (2011). In vitro and in vivo comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression. *Gene Ther* 18, 631–636.
- Liliental, J., and Chang, D.D. (1998). Rack1, a Receptor for Activated Protein Kinase C, Interacts with Integrin β Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 273, 2379–2383.
- Lin, W., Zhang, Z., Xu, Z., Wang, B., Li, X., Cao, H., Wang, Y., and Zheng, S.J. (2015). The Association of Receptor of Activated Protein Kinase C 1(RACK1) with Infectious Bursal Disease Virus Viral Protein VP5 and Voltage-dependent Anion Channel 2 (VDAC2) Inhibits Apoptosis and Enhances Viral Replication. *J Biol Chem* 290, 8500–8510.
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., and Yates, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 17, 676–682.
- Liu, M., Peng, P., Wang, J., Wang, L., Duan, F., Jia, D., Ruan, Y., and Gu, J. (2015). RACK1-mediated translation control promotes liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 463, 255–261.
- Liu, S., Chen, J., Cai, X., Wu, J., Chen, X., Wu, Y.-T., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *ELife* 2, e00785.
- Liu, S., Liu, J., Wang, J., Cheng, J., Zeng, X., Ji, N., Li, J., and Chen, Q. (2018). RACK1 is an organ-specific prognostic predictor in OSCC. *Oral Oncology* 76, 22–26.
- Liu, X., Bi, J., Zhao, Q., Li, M., Zuo, Q., Wang, X., Lan, R., Li, X., Yang, G., Liu, J., et al. (2019). Overexpression of RACK1 enhanced the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Marc-145 cells and promoted the NF-kappaB activation via upregulating the expression and phosphorylation of TRAF2. *Gene* 709, 75–83.

- Liu, Y.V., Hubbi, M.E., Pan, F., McDonald, K.R., Mansharamani, M., Cole, R.N., Liu, J.O., and Semenza, G.L. (2007). Calcineurin Promotes Hypoxia-inducible Factor 1 α Expression by Dephosphorylating RACK1 and Blocking RACK1 Dimerization. *Journal of Biological Chemistry* 282, 37064–37073.
- Lloyd, R.E. (2006). Translational control by viral proteinases. *Virus Research* 13.
- Long, L., Deng, Y., Yao, F., Guan, D., Feng, Y., Jiang, H., Li, X., Hu, P., Lu, X., Wang, H., et al. (2014). Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling. *Immunity* 40, 515–529.
- López De Quinto, S., Lafuente, E., and Martínez-Salas, E. (2001). IRES interaction with translation initiation factors: Functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* 7, 1213–1226.
- López-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.-H., and Ronai, Z. (2005). Receptor for RACK1 Mediates Activation of JNK by Protein Kinase C. *Molecular Cell* 19, 309–320.
- López-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J.S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K.S.M., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S., et al. (2007). Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma. *Cancer Cell* 11, 447–460.
- Lozano, G., and Martínez-Salas, E. (2015). Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Current Opinion in Virology* 12, 113–120.
- Lu, F., Zhang, C., Wu, W.-J., and Wu, Y.-M. (2012). RACK1 downregulation suppresses migration and proliferation of neuroblastoma cell lines. *Oncology Reports* 27, 1646–1652.
- Luo, R., Xiao, S., Jiang, Y., Jin, H., Wang, D., Liu, M., Chen, H., and Fang, L. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon- β production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Molecular Immunology* 45, 2839–2846.
- Luo, R., Fang, L., Jiang, Y., Jin, H., Wang, Y., Wang, D., Chen, H., and Xiao, S. (2011). Activation of NF- κ B by nucleocapsid protein of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* 42, 76–81.
- Ma, J., Wu, R., Zhang, Q., Wu, J., Lou, J., Zheng, Z., Ding, J., and Yuan, Z. (2014). DJ-1 interacts with RACK1 and protects neurons from oxidative-stress-induced apoptosis. *Biochemical Journal* 462, 489–497.
- Maasho, K., Marusina, A., Reynolds, N.M., Coligan, J.E., and Borrego, F. (2004). Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J Immunol Methods* 284, 133–140.
- Macejak, D.G., and Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90–94.

- Maess, M.B., Wittig, B., Cignarella, A., and Lorkowski, S. (2014). Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods* *402*, 76–81.
- Mailliot, J., and Martin, F. (2018). Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *WIREs RNA* *9*, e1458.
- Majumder, M., Yaman, I., Gaccioli, F., Zeenko, V.V., Wang, C., Caprara, M.G., Venema, R.C., Komar, A.A., Snider, M.D., and Hatzoglou, M. (2009). The hnRNA-binding proteins hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Mol Cell Biol* *29*, 2899–2912.
- Majzoub, K., Hafirassou, M.L., Meignin, C., Goto, A., Marzi, S., Fedorova, A., Verdier, Y., Vinh, J., Hoffmann, J.A., Martin, F., et al. (2014). RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* *159*, 1086–1095.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y., et al. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* *66*, 6–30.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T.-A., Larsson, O., Rajasekhar, V.K., and Sonenberg, N. (2007). Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS ONE* *2*, e242.
- Mamidipudi, V., and Cartwright, C.A. (2009). A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. *Oncogene* *28*, 4421–4433.
- Mamidipudi, V., Zhang, J., Lee, K.C., and Cartwright, C.A. (2004). RACK1 Regulates G1/S Progression by Suppressing Src Kinase Activity. *Mol Cell Biol*.
- Mamidipudi, V., Dhillon, N.K., Parman, T., Miller, L.D., Lee, K.C., and Cartwright, C.A. (2007). RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints. *Oncogene* *26*, 2914–2924.
- Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.-P., Solano-González, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., et al. (2013). p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* *24*, 318–330.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell* *10*, 417–426.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D., and Yarwood, S.J. (2002). The RACK1 Scaffold Protein: A Dynamic Cog in Cell Response Mechanisms. *Mol Pharmacol* *62*, 1261–1273.
- McLeod, M., Shor, B., Caporaso, A., Wang, W., Chen, H., and Hu, L. (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase To regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol Cell Biol* *20*, 4016–4027.

- Miao, B., Wei, C., Qiao, Z., Han, W., Chai, X., Lu, J., Gao, C., Dong, R., Gao, D., Huang, C., et al. (2019). eIF3a mediates HIF1 α -dependent glycolytic metabolism in hepatocellular carcinoma cells through translational regulation. *Am J Cancer Res* 9, 1079–1090.
- Miller, L.D., Lee, K.C., Mochly-Rosen, D., and Cartwright, C.A. (2004). RACK1 regulates Src-mediated Sam68 and p190RhoGAP signaling. *Oncogene* 23, 5682–5686.
- Mucha, S.R., Rizzani, A., Gerbes, A.L., Camaj, P., Thasler, W.E., Bruns, C.J., Eichhorst, S.T., Gallmeier, E., Kolligs, F.T., Goke, B., et al. (2009). JNK inhibition sensitises hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to the TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Gut* 58, 688–698.
- Nagashio, R., Sato, Y., Matsumoto, T., Kageyama, T., Satoh, Y., Shinichiro, R., Masuda, N., Goshima, N., Jiang, S.-X., and Okayasu, I. (2010). Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* 69, 54–59.
- Nielsen, M.H., Flygaard, R.K., and Jenner, L.B. (2017). Structural analysis of ribosomal RACK1 and its role in translational control. *Cell Signal* 35, 272–281.
- Niepmann, M. (2009). Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 529–541.
- Niepmann, M. (2013). Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol* 369, 143–166.
- Nijholt, I., Farchi, N., Kye, M., Sklan, E.H., Shoham, S., Verbeure, B., Owen, D., Hochner, B., Spiess, J., Soreq, H., et al. (2004). Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Mol Psychiatry* 9, 174–183.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5, 1137–1141.
- Onishi, I., Lin, P.J.C., Diering, G.H., Williams, W.P., and Numata, M. (2007). RACK1 associates with NHE5 in focal adhesions and positively regulates the transporter activity. *Cellular Signalling* 19, 194–203.
- Opitz, N., Schmitt, K., Hofer-Pretz, V., Neumann, B., Krebber, H., Braus, G.H., and Valerius, O. (2017). Capturing the Asc1p/Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) Microenvironment at the Head Region of the 40S Ribosome with Quantitative BioID in Yeast. *Mol Cell Proteomics* 16, 2199–2218.
- Otsuka, M., Takata, A., Yoshikawa, T., Kojima, K., Kishikawa, T., Shibata, C., Takekawa, M., Yoshida, H., Omata, M., and Koike, K. (2011). Receptor for Activated Protein Kinase C: Requirement for Efficient MicroRNA Function and Reduced Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 6.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320–325.

- Peng, R., Jiang, B., Ma, J., Ma, Z., Wan, X., Liu, H., Chen, Z., Cheng, Q., and Chen, R. (2013). Forced downregulation of RACK1 inhibits glioma development by suppressing Src/Akt signaling activity. *Oncology Reports* 30, 2195–2202.
- Pérard, J., Drouet, E., and Baudin, F. (2010). Le rôle des IRES dans l'initiation de la traduction. *Virologie* 14, 241–253.
- Perera, R., Daijogo, S., Walter, B.L., Nguyen, J.H.C., and Semler, B.L. (2007). Cellular Protein Modification by Poliovirus: the Two Faces of Poly(rC)-Binding Protein. *Journal of Virology* 81, 8919–8932.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., and Hellen, C.U.T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67–83.
- Raab, M.S., Breitskreutz, I., Tonon, G., Zhang, J., Hayden, P.J., Nguyen, T., Fruehauf, J.H., Lin, B.K., Chauhan, D., Hideshima, T., et al. (2009). Targeting PKC: a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling. *Blood* 113, 1513–1521.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science (New York, N.Y.)* 331, 730–736.
- Reinhardt, J., and Wolff, T. (2000). The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C. *Veterinary Microbiology* 14.
- Risebro, C.A., Smart, N., Dupays, L., Breckenridge, R., Mohun, T.J., and Riley, P.R. (2006). Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart. *Development* 133, 4595–4606.
- Robles, M.S., Boyault, C., Knutti, D., Padmanabhan, K., and Weitz, C.J. (2010). Identification of RACK1 and Protein Kinase C as Integral Components of the Mammalian Circadian Clock. *Science* 327, 463–466.
- Rodriguez, M.M., Ron, D., Touhara, K., Chen, C.H., and Mochly-Rosen, D. (1999). RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry* 38, 13787–13794.
- Rollins, M.G., Jha, S., Bartom, E.T., and Walsh, D. (2019). RACK1 evolved species-specific multifunctionality in translational control through sequence plasticity in a loop domain. *Journal of Cell Science* jcs.228908.
- Romano, N., Veronese, M., Manfrini, N., Zolla, L., and Ceci, M. (2019). Ribosomal RACK1 promotes proliferation of neuroblastoma cells independently of global translation upregulation. *Cell Signal* 53, 102–110.

- Romero-Brey, I., Berger Carola, Kallis Stephanie, Kolovou Androniki, Paul David, Lohmann Volker, Bartenschlager Ralf, and Buchmeier Michael J. (2015). NS5A Domain 1 and Polyprotein Cleavage Kinetics Are Critical for Induction of Double-Membrane Vesicles Associated with Hepatitis C Virus Replication. *MBio* 6, e00759-15.
- Ron, Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I., and Gordon, A. (1999). Coordinated Movement of RACK1 with Activated β IIPKC. *Journal of Biological Chemistry* 274, 27039–27046.
- Ron, D., Chen, C.-H., Caldwell, J., JAMIESONt, L., ORRt, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the f8 subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 6.
- Ruan, Y., Sun, L., Hao, Y., Wang, L., Xu, J., Zhang, W., Xie, J., Guo, L., Zhou, L., Yun, X., et al. (2012). Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 122, 2554–2566.
- Ruehle, M.D., Zhang, H., Sheridan, R.M., Mitra, S., Chen, Y., Gonzalez, R.L., Cooperman, B.S., and Kieft, J.S. (2015). A dynamic RNA loop in an IRES affects multiple steps of elongation factor-mediated translation initiation. *ELife* 4, e08146.
- Ruiz Carrillo, D., Chandrasekaran, R., Nilsson, M., Cornvik, T., Liew, C.W., Tan, S.M., and Lescar, J. (2012). Structure of human Rack1 protein at a resolution of 2.45 Å. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68, 867–872.
- Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J., and Struyf, S. (2018). Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. *Front Immunol* 9, 1930.
- Sabila, M., Kundu, N., Smalls, D., and Ullah, H. (2016). Tyrosine Phosphorylation Based Homodimerization of Arabidopsis RACK1A Proteins Regulates Oxidative Stress Signaling Pathways in Yeast. *Front Plant Sci* 7, 176.
- Saha, S.K., Pietras, E.M., He, J.Q., Kang, J.R., Liu, S.-Y., Oganesyanyan, G., Shahangian, A., Zarnegar, B., Shiba, T.L., Wang, Y., et al. (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *The EMBO Journal* 25, 3257–3263.
- Sato, T., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Iguchi, A., and Ariga, T. (2015). The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene* 34, 1280–1291.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6, 209–217.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 11, 957–962.

- Sha, Z., Brill, L.M., Cabrera, R., Kleifeld, O., Scheliga, J.S., Glickman, M.H., Chang, E.C., and Wolf, D.A. (2009). The eIF3 Interactome Reveals the Translasome, a Supercomplex Linking Protein Synthesis and Degradation Machineries. *Molecular Cell* 36, 141–152.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., and Davoodi, J. (2017). Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie* 135, 111–125.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440.
- Sheikh, M.S., and Fornace, A.J. (1999). Regulation of translation initiation following stress. *Oncogene* 18, 6121–6128.
- Shi, S., Deng, Y.-Z., Zhao, J.-S., Ji, X.-D., Shi, J., Feng, Y.-X., Li, G., Li, J.-J., Zhu, D., Koeffler, H.P., et al. (2012). RACK1 Promotes Non-small-cell Lung Cancer Tumorigenicity through Activating Sonic Hedgehog Signaling Pathway. *J Biol Chem* 287, 7845–7858.
- Shor, B., Calaycay, J., Rushbrook, J., and McLeod, M. (2003). Cpc2/RACK1 Is a Ribosome-associated Protein That Promotes Efficient Translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 49119–49128.
- Shrivastava, S., Raychoudhuri, A., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (2011). Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus–infected hepatocytes. *Hepatology* 53, 406–414.
- Silvera, D., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2010). Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 254–266.
- Singh, N., Jindal, S., Ghosh, A., and Komar, A.A. (2019). Communication between RACK1/Asc1 and uS3 (Rps3) is essential for RACK1/Asc1 function in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 706, 69–76.
- Sklan, E.H., Podoly, E., and Soreq, H. (2006). RACK1 has the nerve to act: Structure meets function in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 78, 117–134.
- Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S.D., and Farrell, P.J. (2000). Structure and Coding Content of CST (BART) Family RNAs of Epstein-Barr Virus. *J Virol* 74, 3082–3092.
- Snell, L.M., McGaha, T.L., and Brooks, D.G. (2017). Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends in Immunology* 38, 542–557.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136, 731–745.
- Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science (New York, N.Y.)* 291, 1959–1962.

- Spahn, C.M.T., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jørgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P., and Frank, J. (2004a). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* 23, 1008–1019.
- Spahn, C.M.T., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R.A., Sarnow, P., and Frank, J. (2004b). Cryo-EM Visualization of a Viral Internal Ribosome Entry Site Bound to Human Ribosomes: The IRES Functions as an RNA-Based Translation Factor. *Cell* 118, 465–475.
- Speth, C., Willing, E.-M., Rausch, S., Schneeberger, K., and Laubinger, S. (2013). RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in Arabidopsis. *The Plant Journal* 76, 433–445.
- Stebbins, E.G., and Mochly-Rosen, D. (2001). Binding Specificity for RACK1 Resides in the V5 Region of β II Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29644–29650.
- Stow, J.L., and Murray, R.Z. (2013). Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 24, 227–239.
- Subauste, M.C., Ventura-Holman, T., Du, L., Subauste, J.S., Chan, S.-L., Yu, V.C., and Maher, J.F. (2009). RACK1 down-regulates levels of the pro-apoptotic protein Fem1b in apoptosis-resistant colon cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 8, 2295–2303.
- Sun, C., Querol-Audí, J., Mortimer, S.A., Arias-Palomo, E., Doudna, J.A., Nogales, E., and Cate, J.H.D. (2013). Two RNA-binding motifs in eIF3 direct HCV IRES-dependent translation. *Nucleic Acids Research* 41, 7512–7521.
- Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S.R., and Fang, Y. (2010). The Cysteine Protease Domain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 2 Possesses Deubiquitinating and Interferon Antagonism Functions. *Journal of Virology* 84, 7832–7846.
- Swanson, K.V., Deng, M., and Ting, J.P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19, 477–489.
- Sweeney, T.R., Abaeva, I.S., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2014). The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J* 33, 76–92.
- Szabo, G., and Petrasek, J. (2015). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 387–400.
- Taylor, D.J., Devkota, B., Huang, A.D., Topf, M., Narayanan, E., Sali, A., Harvey, S.C., and Frank, J. (2009). Comprehensive Molecular Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Structure* 17, 1591–1604.
- Thompson, M.K., Rojas-Duran, M.F., Gangaramani, P., and Gilbert, W.V. (2016). The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *Elife* 5.
- Thornton, C., Tang, K.-C., Phamluong, K., Luong, K., Vagts, A., Nikanjam, D., Yaka, R., and Ron, D. (2004). Spatial and Temporal Regulation of RACK1 Function and N-methyl-D-aspartate Receptor Activity through WD40 Motif-mediated Dimerization. *Journal of Biological Chemistry* 279, 31357–31364.

- Tjiu, J.W., Chen, J.S., Shun, C.T., Lin, S.J., Liao, Y.H., Chu, C.Y., Tsai, T.F., Chiu, H.C., Dai, Y.S., Inoue, H., et al. (2009). Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J Invest Dermatol* *129*, 1016–1025.
- Tomita, K., Freeman, B.L., Bronk, S.F., LeBrasseur, N.K., White, T.A., Hirsova, P., and Ibrahim, S.H. (2016). CXCL10-Mediates Macrophage, but not Other Innate Immune Cells-Associated Inflammation in Murine Nonalcoholic Steatohepatitis. *Sci Rep* *6*, 28786.
- Tsai, C.-F., Chen, J.-H., and Yeh, W.-L. (2019). Pulmonary fibroblasts-secreted CXCL10 polarizes alveolar macrophages under pro-inflammatory stimuli. *Toxicology and Applied Pharmacology* *380*, 114698.
- Tsukiyama-Kohara, Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* *66*, 1476–1483.
- Ullah, H., Scappini, E.L., Moon, A.F., Williams, L.V., Armstrong, D.L., and Pedersen, L.C. (2008). Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science* *17*, 1771–1780.
- Ullah, H., Hou, W., Dakshanamurthy, S., and Tang, Q. (2019). Host targeted antiviral (HTA): functional inhibitor compounds of scaffold protein RACK1 inhibit herpes simplex virus proliferation. *Oncotarget* *10*, 3209–3226.
- Ungureanu, N.H., Cloutier, M., Lewis, S.M., de Silva, N., Blais, J.D., Bell, J.C., and Holcik, M. (2006). Internal Ribosome Entry Site-mediated Translation of Apaf-1, but Not XIAP, Is Regulated during UV-induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 15155–15163.
- Usacheva, A., Smith, R., Minshall, R., Baida, G., Seng, S., Croze, E., and Colamonici, O. (2001). The WD Motif-containing Protein Receptor for Activated Protein Kinase C (RACK1) Is Required for Recruitment and Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 through the Type I Interferon Receptor. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 22948–22953.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* *303*, 844–848.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304–1351.
- Volta, V., Beugnet, A., Gallo, S., Magri, L., Brina, D., Pesce, E., Calamita, P., Sanvito, F., and Biffo, S. (2013). RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cell Mol Life Sci* *70*, 1439–1450.
- Wang, J., Zhou, J., Yang, Q., and Grayhack, E.J. (2018). Multi-protein Bridging Factor 1(Mbf1), Rps3 and Asc1 prevent stalled ribosomes from frameshifting. *Elife* *7*.

- Wang, S., Chen, J.-Z., Zhang, Z., Gu, S., Ji, C., Tang, R., Ying, K., Xie, Y., and Mao, Y. (2003). Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Mol Biol Rep* 30, 53–60.
- Wang, W.D., Wen, Z., Ji, W., and Ma, Y. (2015). RACK1 expression contributes to JNK activity, but JNK activity does not enhance RACK1 expression in hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *Oncol Lett* 9, 2767–2770.
- Wehner, P., Shnitsar, I., Urlaub, H., and Borchers, A. (2011). RACK1 is a novel interaction partner of PTK7 that is required for neural tube closure. *Development* 138, 1321–1327.
- Weingarten-Gabbay, S., Elias-Kirma, S., Nir, R., Gritsenko, A.A., Stern-Ginossar, N., Yakhini, Z., Weinberger, A., and Segal, E. (2016). Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* 351, 240–259.
- Wilson, J.E., Pestova, T.V., Hellen, C.U.T., and Sarnow, P. (2000). Initiation of Protein Synthesis from the A Site of the Ribosome. *Cell* 102, 511–520.
- Wu, J., Meng, J., Du, Y., Huang, Y., Jin, Y., Zhang, J., Wang, B., Zhang, Y., Sun, M., and Tang, J. (2013). RACK1 promotes the proliferation, migration and invasion capacity of mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro probably by PI3K/Rac1 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67, 313–319.
- Wu, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L., Wang, D., Ren, F., Chang, D., Chang, Z., and Jia, B. (2010). RACK1 promotes Bax oligomerization and dissociates the interaction of Bax and Bcl-XL. *Cellular Signalling* 22, 1495–1501.
- Xiaolong, L., Dongmin, G., Liu, M., Zuo, W., Huijun, H., Qiufen, T., XueMei, H., Wensheng, L., Yuping, P., Jun, L., et al. (2020). FGF21 induces autophagy-mediated cholesterol efflux to inhibit atherogenesis via RACK1 up-regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 4992–5006.
- Xie, T., Chen, T., Li, C., Wang, W., Cao, L., Rao, H., Yang, Q., Shu, H.B., and Xu, L.G. (2019). RACK1 attenuates RLR antiviral signaling by targeting VISA-TRAF complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 508, 667–674.
- Xu, C., and Min, J. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* 2, 202–214.
- Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 355–369.
- Yaka, R., Thornton, C., Vagts, A.J., Phamluong, K., Bonci, A., and Ron, D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 5710–5715.
- Yaka, R., Phamluong, K., and Ron, D. (2003). Scaffolding of Fyn Kinase to the NMDA Receptor Determines Brain Region Sensitivity to Ethanol. *J. Neurosci.* 23, 3623–3632.

- Yang, Y., and Wang, Z. (2019). IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *Journal of Molecular Cell Biology* *11*, 911–919.
- Yang, D.Q., Halaby, M.J., and Zhang, Y. (2006). The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* *25*, 4613–4619.
- Yang, H., Zhu, Q., Cheng, J., Wu, Y., Fan, M., Zhang, J., and Wu, H. (2019). Opposite regulation of Wnt/ β -catenin and Shh signaling pathways by Rack1 controls mammalian cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci USA* *116*, 4661–4670.
- Yao, F., Long, L.Y., Deng, Y.Z., Feng, Y.Y., Ying, G.Y., Bao, W.D., Li, G., Guan, D.X., Zhu, Y.Q., Li, J.J., et al. (2014). RACK1 modulates NF-kappaB activation by interfering with the interaction between TRAF2 and the IKK complex. *Cell Res* *24*, 359–371.
- Yatime, L., Hein, K.L., Nilsson, J., and Nissen, P. (2011). Structure of the RACK1 Dimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* *411*, 486–498.
- Yeung, O.W., Lo, C.M., Ling, C.C., Qi, X., Geng, W., Li, C.X., Ng, K.T., Forbes, S.J., Guan, X.Y., Poon, R.T., et al. (2015). Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* *62*, 607–616.
- Yu, Y., Ji, H., Doudna, J.A., and Leary, J.A. (2005). Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Sci* *14*, 1438–1446.
- Zhang, C., He, L., Kang, K., Chen, H., Xu, L., and Zhang, Y. (2014). Screening of cellular proteins that interact with the classical swine fever virus non-structural protein 5A by yeast two-hybrid analysis. *J Biosci* *39*, 63–74.
- Zhang, D., Wang, Q., Zhu, T., Cao, J., Zhang, X., Wang, J., Wang, X., Li, Y., Shen, B., and Zhang, J. (2013). RACK1 promotes the proliferation of THP1 acute myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biochem* *384*, 197–202.
- Zhang, J., Zhu, F., Li, X., Dong, Z., Xu, Y., Peng, C., Li, S., Cho, Y.-Y., Yao, K., Zykova, T.A., et al. (2012). Rack1 protects N-terminal phosphorylated c-Jun from Fbw7-mediated degradation. *Oncogene* *31*, 1835–1844.
- Zhang, W., Zong, C.S., Hermanto, U., Lopez-Bergami, P., Ronai, Z., and Wang, L.-H. (2006). RACK1 Recruits STAT3 Specifically to Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors for Activation, Which Is Important for Regulating Anchorage-Independent Growth. *Mol Cell Biol* *26*, 413–424.
- Zhang, W., Cheng, G.Z., Gong, J., Hermanto, U., Zong, C.S., Chan, J., Cheng, J.Q., and Wang, L.-H. (2008). RACK1 and CIS Mediate the Degradation of BimEL in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 16416–16426.
- Zhang, Y., Hou, P., He, D.C., Wang, H., and He, H. (2021). RACK1 degrades MAVS to promote bovine ephemeral fever virus replication via upregulating E3 ubiquitin ligase STUB1. *Veterinary Microbiology* *257*, 109096.

Zhao, Y., Wang, Q., Qiu, G., Zhou, S., Jing, Z., Wang, J., Wang, W., Cao, J., Han, K., Cheng, Q., et al. (2015). RACK1 Promotes Autophagy by Enhancing the Atg14L-Beclin 1-Vps34-Vps15 Complex Formation upon Phosphorylation by AMPK. *Cell Rep* 13, 1407–1417.

Zhong, X., Li, M., Nie, B., Wu, F., Zhang, L., Wang, E., and Han, Y. (2013). Overexpressions of RACK1 and CD147 Associated with Poor Prognosis in Stage T1 Pulmonary Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 20, 1044–1052.

Zhou, D., Luan, J., Huang, C., and Li, J. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma: Friend or Foe? *Gut and Liver*.

Zhou, S., Cao, H., Zhao, Y., Li, X., Zhang, J., Hou, C., Ma, Y., and Wang, Q. (2016). RACK1 promotes hepatocellular carcinoma cell survival via CBR1 by suppressing TNF- α -induced ROS generation. *Oncol Lett* 12, 5303–5308.

Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., and Liu, D. (2018). RACK1 Silencing Induces Cell Apoptosis and Inhibits Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma MHCC97-H Cells. *Pathol. Oncol. Res.* 24, 101–107.

Étude du rôle de la protéine RACK1 dans la traduction IRES-dépendante dans les hépatocytes et son impact sur la différenciation des macrophages

Résumé

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) est une protéine impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales. L'altération de son homéostasie est décrite dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) où sa surexpression favorise la croissance tumorale et la chimiorésistance. Associée au ribosome, elle a été identifiée comme un facteur d'hôte nécessaire à la traduction IRES (Internal Ribosomal Entry Site)-dépendante de génomes viraux dont le virus de l'hépatite C (VHC). Les objectifs de ma thèse étaient de développer une lignée cellulaire exprimant une forme mutante de RACK1 incapable de se lier au ribosome afin d'étudier spécifiquement la fonction ribosomique de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante virale et cellulaire. Mon travail de thèse a permis de créer un double mutant de RACK1 humaine, décrit dans la littérature comme incapable de se lier au ribosome dans la levure en mettant en œuvre des techniques de knock-in CRISPR Cas9 et des techniques de gain et perte de fonction. La caractérisation fonctionnelle du modèle a montré qu'il n'était pas adapté pour étudier le rôle ribosomique de RACK1. En utilisant différents types d'IRES associés à des gènes rapporteurs j'ai identifié que RACK1 pourrait être impliquée dans un mécanisme universel de la traduction des ARN viraux médiée par des IRES, et observé que RACK1 régule la traduction IRES-dépendante d'ARNm cellulaires pouvant être impliqués dans la progression du cancer. Des résultats préliminaires suggèrent qu'en réponse au stress cellulaire l'expression de RACK1 permettrait de moduler le phénotype des macrophages associés à la tumeur. Ces travaux de thèse offrent une meilleure compréhension du rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante dans les hépatocytes ainsi que sa fonction au sein du microenvironnement tumoral dans le but de valider RACK1 comme une cible thérapeutique pour lutter contre l'infection virale et ses pathologies associées.

Mots-clés : RACK1, traduction, IRES, microenvironnement tumoral

Résumé en anglais

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) is a protein involved in many cellular functions. The alteration of its homeostasis is described in hepatocellular carcinoma (HCC) where its overexpression promotes tumor growth and chemoresistance. Associated with the ribosome, it has been identified as a host factor necessary for IRES (Internal Ribosomal Entry-Site)-dependent translation of viral genomes including hepatitis C virus (HCV). The objectives of my thesis were to develop a cell line expressing a mutant form of RACK1 unable to bind to the ribosome in order to specifically study the ribosomal function of RACK1 in viral and cellular IRES-dependent translation. In my thesis work I created a double mutant of human RACK1, described in the literature as unable to bind to the ribosome in yeast by implementing CRISPR Cas9 knock-in techniques and techniques of gain and loss of function. The functional characterization of this model showed that it was not suitable to study the ribosomal role of RACK1. Using different types of IRES I identified that RACK1 might be involved in a universal mechanism of IRES-mediated viral RNA translation, and observed that RACK1 regulates IRES-dependent translation of cellular mRNAs that may be involved in cancer progression. Preliminary results suggest that in response to cellular stress the expression of RACK1 would modulate the phenotype of tumor-associated macrophages. This thesis work offers a better understanding of the role of RACK1 in IRES-dependent translation in hepatocytes as well as its function within the tumor microenvironment in order to validate RACK1 as a therapeutic target to fight viral infection and its associated diseases.

Keywords : RACK1, translation, IRES, tumor microenvironment