

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

CONTRÔLE TRADUCTIONNEL DES FONCTIONS DES MACROPHAGES PAR LES RÉPRESSEURS 4E-BP1 ET 4E-BP2

Par

Mirtha WILLIAM

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Krista Heinonen
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Katherine Borden
Département de Pathologie et
Biologie Cellulaire, Faculté de médecine
Université de Montréal

Examineur externe

Josée Dostie
Département de Biochimie et Centre de
recherche sur le cancer Goodman
Université McGill

Directeur de recherche

Maritza Jaramillo
INRS-Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ma thèse à l'Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand Frappier (INRS-IAF), au laboratoire des interactions hôte-pathogènes sous la supervision de la Professeure Maritza Jaramillo. Ce projet de thèse a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et ma bourse doctorale soutenue par l'INRS-IAF.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de recherche, Maritza Jaramillo, de m'avoir accueilli comme sa première étudiante pour démarrer son laboratoire ; pour la confiance qu'elle m'a accordé en me confiant son premier projet de recherche ; pour son encadrement scientifique et aussi, à lui témoigner ma reconnaissance pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté pour mon installation au Québec.

Un grand merci au CRSNG pour le financement de mon projet et à l'INRS-IAF pour ma bourse doctorale.

Tous mes sincères remerciements aux membres de mon jury : les Professeures, Krista Heinonen, Josée Dostie et Katherine Borden qui ont accepté d'évaluer ma thèse.

Je tiens à remercier les professeurs Albert Descoteaux, Krista Heinonen, Denis Girard et Tommy Alain qui ont participé à l'encadrement de mon projet de recherche et pour toutes leurs recommandations.

A tous les collaborateurs et membres des laboratoires des Professeurs : Maritza Jaramillo, Ola Larsson, Tommy Alain, Léon C. van Kempen, Simona Stäger, Charles M. Dozois, qui ont contribué à l'aboutissement de mes publications.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire, passés et présents qui ont manifesté de l'intérêt pour mon projet et ont contribué à son succès, notamment : Sophie Chagneau, Visnu Chaparro, Louis-Philippe Leroux, Jennifer Raisch, Mirana Rakotomanga, Elizabeth Roussel, Noushin Saljoughian et Aude Zimmermann.

Mes chaleureux remerciements à mes amis, Rachel Pierrelas, Samira Ferdinand, Patricia Marie-Luce, Mireilla Mazio, Isabelle Armand, le Docteur Sarah Maylin, et à mon professeur du collège Paul Symphor de la ville du Robert (Martinique) et amie Monique Arcade, merci à tous pour votre soutien et vos encouragements.

Mes sincères remerciements à Yves Pierre-Louis et sa famille, Brenda Paris et sa famille qui m'ont chaleureusement accueilli à mon arrivée au Québec en m'offrant l'hospitalité et en me traitant comme un membre de leur famille et par dessus tout pour votre amour et soutien grandement manifesté.

J'adresse tous mes remerciements à chère ma famille, mes sœurs et frères, Ismaëlle, Nella, Daniel, Sylviane, Elsa et Willy qui a pris à cœur mon projet d'avenir, dans la confiance, vous m'avez soutenu, encouragé dans les moments de faiblesses et de souffrances morales.

A mes neveux et nièces (Maëva, Maëlys, Dennys, Alexane, Mathys, Mildred et Kaélodie) qui sont fiers d'être aux études en même temps que tatie.

A mes très chers parents à qui dans leur grand âge j'ai imposé une telle charge et qui attendent dans la patience et le silence l'aboutissement de mon projet de vie.

Et bien sûr à toi, mon cher et tendre amour, Alain Nadeau, qui s'est greffé en cours de route et à embrasser pleinement mon projet professionnel, pour m'encourager, me conseiller, me changer les idées par toutes les activités qu'il m'a faites découvrir (la pêche, les randonnées, le ski, la voile), une bouffée d'air pur m'est apparu, pour ton soutien à tous niveaux, je t'adresse toute ma gratitude. Un grand et profond merci à toi !

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réussite de mon projet, un grand merci à vous tous !

CONTRIBUTIONS

Mes travaux de recherche contribuent à l'avancement des connaissances sur le rôle du contrôle traductionnel dans l'activation des macrophages. Nous sommes les premiers à comparer l'efficacité traductionnelle des transcrits liés à l'immunité dans les macrophages WT et déficients en 4E-BP1/2.

Nous montrons pour la première fois que :

- 4E-BP1/2 contribuent à réguler les réponses pro- et anti-inflammatoires dans les macrophages.
- L'axe mTOR-4E-BP1/2 contrôle un programme traductionnel aboutissant à la régulation transcriptionnelle de gènes anti-inflammatoires.
- 4E-BP1/2 contribuent à la régulation des fonctions dans les macrophages telles que la capacité bactéricide et la migration cellulaire.

Ce travail permet de mieux comprendre comment la traduction de l'ARNm contribue aux programmes de l'expression des gènes dans les cellules immunitaires.

Cette recherche apporte des perspectives d'investigation à approfondir sur le translatome des macrophages afin d'obtenir un profil traductionnel complet des ARNm régulés par 4E-BP1/2 dans les fonctions immunologiques.

Nos résultats suggèrent que l'activité dérégulée des 4E-BP1/2 dans les conditions pathologiques pourrait contribuer à la progression des maladies (infections, cancers) et proposent l'axe mTOR-4E-BP1/2 comme une cible thérapeutique.

RÉSUMÉ

Les macrophages sont des sentinelles du système immunitaire inné qui gouvernent l'apparition et la résolution des réponses inflammatoires lors de l'intrusion des pathogènes. L'activation des macrophages nécessite une synthèse rapide des protéines pour répondre efficacement aux signaux externes. La signalisation à travers « mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 » (mTORC1) est un régulateur majeur de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les macrophages. Cependant, il n'a pas été élucidé si une telle régulation dépend du contrôle sélectif de l'initiation de la traduction par les principaux effecteurs de mTORC1, les « eIF4E-binding proteins » 1 et 2 (4E-BP1/2). Pour comprendre le rôle des 4E-BP1/2 sur les fonctions des macrophages, nous avons comparé l'efficacité traductionnelle des transcrits immunitaires dans les macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse de souris C57BL/6 de type sauvage (WT) et déficientes pour 4E-BP1/2 (4E-BP1/2 DKO). L'étude du transcriptome a révélé l'existence de transcrits (*Il-10*, *Ptgs2/Cox-2*, *Ccl5* et *Cxcl10*) dont la traduction est contrôlée par 4E-BP1/2. Nous avons trouvé, d'une part, que les macrophages 4E-BP1/2 DKO produisent davantage de protéines endogènes IL-10 et PGE₂ en réponse à la stimulation par le LPS. En conséquence, l'activation à la hausse de la signalisation IL-10-STAT3 et PGE₂-C/EBPβ a renforcé l'expression de gènes anti-inflammatoires (*sll1ra*, *Nfil3*, *Arg1*, *Serpinb2*) ce qui a entraîné une diminution de la capacité bactéricide des macrophages déficients en 4E-BP1/2. D'autre part, nous avons montré que l'absence de 4E-BP1/2 mène à une production plus élevée de chimiokines CCL5 et CXCL10 dans les macrophages stimulés avec le LPS, ce qui a favorisé leur activité chimiotactique envers les cellules T CCR5⁺ et CXCR3⁺. En accord avec ces données, le traitement des macrophages WT avec des inhibiteurs de mTORC1 a conduit à l'hypophosphorylation des 4E-BP1/2 (activation) et donc à une diminution de la sécrétion de CCL5 et CXCL10 aux cellules WT. Par contre, les macrophages dérivés de souris « Knock-in (KI) » pour la phosphorylation d'eIF4E sur la sérine 209 ont produit des niveaux similaires de CCL5 et CXCL10. Donc, l'état de phosphorylation d'eIF4E ne semble pas avoir un effet sur la synthèse de ces chimiokines.

En conclusion, nos données prouvent que l'axe mTORC1-4E-BP1/2 contrôle la traduction des ARN codant pour des médiateurs pro- et anti-inflammatoires et suggèrent qu'une activité dérégulée de 4E-BP1/2 pourrait reprogrammer l'environnement transcriptionnel et traductionnel en faveur des maladies.

Mots clés : macrophage ; mTORC1 ; traduction ; ARNm ; eIF4E-binding proteins 1 and 2 ; inflammation ; LPS

ABSTRACT

Macrophages are sentinels of the innate immune system that govern the onset and the resolution of inflammatory responses during pathogen intrusion. Activation of macrophages requires rapid protein synthesis to respond effectively to external signals. mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is a major regulator of pro- and -anti-inflammatory cytokine production by macrophages. However, it has not been elucidated whether such regulation depends on selective control of translation initiation by the main effectors of mTORC1, the eIF4E-binding proteins 1 and 2 (4E-BP1/2). To understand the role of 4E-BP1/2 on macrophage functions, we compared translational efficiency of immune transcripts in bone marrow-derived macrophages of wild type (WT) C57BL/6 and double-knockout 4E-BP1/2 (4E-BP1/2 DKO) mice. The study of the transcriptome revealed the existence of transcripts (*Il-10*, *Ptgs2/Cox-2*, *Ccl5* and *Cxcl10*) whose translation is controlled by 4E-BP1/2. We found that 4E-BP1/2 DKO macrophages produce more endogenous IL-10 and PGE₂ proteins in response to LPS stimulation, which results in a decrease in their bactericidal capacity. Accordingly, upregulation of IL-10-STAT3 and PGE₂-C/EBP β signaling enhanced the expression of anti-inflammatory genes (*sll1ra*, *Nfil3*, *Arg1*, *Serpinb2*). On the other hand, we have shown that the elevated production of CCL5 and CXCL10 chemokines in LPS-stimulated macrophages, is 4E-BP1/2-dependent, which has favored their chemotactic activity towards CCR5⁺ and CXCR3⁺ T cells. Treatment of WT macrophages with mTORC1 inhibitors led to hypophosphorylation of 4E-BP1/2 (activation) and thus decreased secretion of CCL5 and CXCL10. In contrast, macrophages derived from mice mutated at the residue where eIF4E is phosphorylated (i.e. eIF4E S209A) produced similar levels of CCL5 and CXCL10. Thus, the phosphorylation status of eIF4E did not affect the synthesis of these chemokines.

In conclusion, our data show that the mTORC1-4E-BP1/2 axis controls translation of mRNAs encoding pro- and -anti-inflammatory mediators and suggests that a deregulated activity of 4E-BP1/2 in macrophages could reprogram the transcriptional and translational environment in favor of diseases.

Key words: macrophage; mTORC1; translation; mRNA; eIF4E-binding proteins 1 and 2; inflammation; LPS

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
CONTRIBUTIONS	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIII
CHAPITRE I. INTRODUCTION	1
1. La machinerie et les étapes de traduction de l'ARN les chez les eucaryotes.....	2
1.1 La traduction coiffe-dépendante.....	3
1.1.1 Initiation de la traduction.....	3
a) La coiffe	3
b) La queue Poly (A).....	5
c) Les ARNs de transfert	6
1.1.2 Mécanismes d'initiation de la traduction.....	7
a) Formation du complexe de pré-initiation (PIC) 43S	7
b) Formation du complexe eIF4F.....	8
c) Formation du complexe 48S.....	8
1.1.3 Elongation de la traduction	10
1.1.4 Terminaison de la traduction	12
1.1.5 Le recyclage des composants de la traduction	12
1.2 La traduction coiffe-indépendante ou médiée par les « internal ribosomal entry sites (IRES) »	13
1.3 Mécanismes alternatifs de la traduction coiffe dépendante ou indépendante	14
1.3.1 Mécanisme d'initiation de la traduction médié par les isoformes : eIF4E2 et eIF4E3	14
1.3.2 Mécanisme d'initiation de la traduction médiée par CBC.....	15
1.3.3 Mécanisme d'initiation : « Cap-independent translation enhancers » (CITEs)	18
2. Mécanismes de régulation de la traduction	20
2.1 Mécanismes indépendants de l'activité d'eIF4E	20
2.1.1 Régulation de la traduction par l'activité d'eIF2	20
2.1.2 Régulation de la traduction de l'ARN par les « RNA-binding proteins (RBPs) »	22
2.1.2a Les motifs RNA binding protein domain (RDB)	24
a) Le motif « terminal oligopyrimidine motif (TOP) » :.....	23
b) Le cadre de lecture ouverte en amont (uORF) :	24
c) Les éléments IRES :	24
d) La queue Poly(A) :.....	25
e) Les éléments de polyadénylation cytoplasmiques (CPE) :.....	25
f) Les éléments AU-rich (AREs) :.....	25
g) Les sites des microARNs, miRNA response element (MRE) :.....	25
2.1.2b Les principaux RBPs qui régulent la traduction.....	27
a) « La-related protein 1 » (LARP1).....	26

b) PTB/hnRNP1	27
c) Poly(A)-binding protein (PABP)	28
d) Cytoplasmic polyadenylation element-binding proteins (CPEB)	28
2.1.3 Régulation de la traduction de l'ARN par les « long non-coding RNAs »	28
2.1.4 Régulation de la traduction de l'ARN par le complexe « IFN- γ activated inhibitor of translation (GAIT).....	29
2.1.5 Régulation de l'élongation de la traduction.....	31
2.2 Mécanismes dépendants de l'activité d'eIF4E	31
2.2.1 Axe MNK.....	31
2.2.2 Axe mTORC1.....	34
a) Découverte de mTOR :	34
b) Structure de mTOR :	35
c) Description du complexe mTORC1 :	37
3. Le contrôle traductionnel via les protéines 4E-BPs	43
3.1 Les protéines 4E-BPs	43
3.1.1 Structure des 4E-BPs	43
3.1.2 Principaux mécanismes de régulation de l'expression des 4E-BPs	44
3.2 Mécanisme de régulation du complexe eIF4F via 4E-BP1/2	46
3.3 Le rôle des protéines 4E-BP1/2 dans l'expression des gènes.....	48
3.4 Le contrôle traductionnel de la réponse immunitaire par les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2.....	49
3.5 Contrôle traductionnel de processus biologiques par les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2.....	51
4. Méthodes d'exploration du contrôle traductionnel : le Translatome	54
4.1 "Polysomes Profiling"	54
4.2 "Ribosomes Profiling"	55
4.3 "Translating Ribosome Affinity Purification" (TRAP).....	55
4.4 Avantages et limites.....	56
5. Les macrophages.....	58
5.1 Origine et développement des macrophages.....	58
5.2 Fonctions des macrophages.....	59
5.3 Activation ou polarisation des macrophages.....	60
5.4 Régulation des macrophages par mTOR.....	61
5.5 Activation des macrophages par le lipopolysaccharide	62
5.6 Rôle du contrôle traductionnel dans les fonctions des macrophages	63
 CHAPITRE II. Motivation et Objectif	 66
 CHAPITRE III. PREMIÈRE PUBLICATION	 68
Résumé de la première publication	69
Abstract.....	73
Introduction.....	74
Materials and Methods.....	75
Results.....	82
Discussion.....	102
Acknowledgements.....	107
 CHAPITRE IV.DEUXIÈME PUBLICATION	 110
Résumé de la deuxième publication	111

Abstract	114
Introduction	115
Results	118
Discussion	129
Materials and Methods	133
CHAPITRE V. DISCUSSION	142
1. L'impact de 4E-BP1/2 dans le contrôle traductionnel des macrophages.....	143
2. Effets des 4E-BP1/2 sur les fonctions anti-inflammatoires des macrophages.....	153
3. Effets des 4E-BP1/2 sur la fonction chimiotactique des macrophages.....	156
CHAPITRE VI. CONCLUSION GÉNÉRALE	159
BIBLIOGRAPHIE	161

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I INTRODUCTION

Figure 1.1 Eléments structurels impliqués dans la traduction de l'ARNm.	3
Figure 1.2 Structure de la coiffe.	4
Figure 1.3 Polyadénylation de la queue Poly(A).	5
Figure 1.4 Structure de l'ARN de transfert.	6
Figure 1.5 Les étapes de l'initiation de la traduction.	9
Figure 1.6 Voie d'élongation de la traduction eucaryote.	11
Figure 1.7 Rôle de CBC dans l'expression des gènes.	18
Figure 1.2 Les différents modes d'initiation de la traduction.....	20
Figure 1.9 Régulation de l'activité d'eIF2.	22
Figure 1.10 Motifs des RBD et interactions des RBPs avec l'ARNm.	23
Figure 1.11 Modèle d'ARNm avec une uORF.	24
Figure 1.12 Régulation traductionnelle par le complexe GAIT.	30
Figure 1.13 Voie de signalisation MAPK.	33
Figure 1.14 Structure des domaines de mTOR.	35
Figure 1.15 Complexes mTORC1 et mTORC2, différents fonctions cellulaires	36
Figure 1.16 Complexes mTORC1 et mTORC2, différents partenaires d'interaction.....	36
Figure 1.17 Les complexes mTORC1 et mTORC2, cascades de signalisation.	40
Figure 1.18 Proéines régulées par S6K et fonctions.....	42
Figure 1.19 Structure et sites de phosphorylation de 4E-BP1.....	44
Figure 1.20 Inhibition du complexe eIF4F (43S) via 4E-BP1/2.	46
Figure 1.21 Structure cristallographique d'eIF4E-eIF4G et eIF4E-4E-BP.	47
Figure 1.22 Principe du Polysome profiling et Ribosome profiling.	57

CHAPITRE III. PREMIÈRE PUBLICATION

FIGURE 3.1. 4E-BP1/2 limit translational efficiency of <i>Il-10</i> , <i>Cox-2</i> and other immune-related mRNAs in macrophages.	83
FIGURE 3.2. LPS-induced <i>Il-10</i> mRNA translation is under the control of 4E-BP1/2.	86
FIGURE 3.4. IL-10–STAT3-mediated anti-inflammatory responses are amplified in 4E-BP1/2 DKO macrophages.	90
FIGURE 3.5. 4E-BP1/2 limit <i>Cox-2</i> translational efficiency and PGE ₂ synthesis.	93
FIGURE 3.6. PGE ₂ -C/EBP β -mediated anti-inflammatory responses are augmented in 4E-BP1/2 DKO macrophages	96

FIGURE 3.7. LPS-inducible pro-inflammatory gene expression is reduced in 4E-BP1/2 DKO macrophages.98

FIGURE 3.8. 4E-BP1/2 regulate macrophage bactericidal capacity through the control of IL-10 and PGE₂ signaling.....99

Supplemental Figure 3.1. The mTORC1-4E-BP1/2 axis contributes to regulate IL-10 and COX-2 production in LPS-stimulated macrophages.109

CHAPITRE IV. DEUXIÈME PUBLICATION

FIGURE 4.1. The mTORC1-4E-BP1/2 axis regulates cellular translation initiation and CCL5 and CXCL10 secretion by LPS-stimulated macrophages.120

FIGURE 4.2. Translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs is repressed by 4E-BP1/2 in macrophages122

FIGURE 4.3. LPS-induced *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA translation is regulated by 4E-BP1/2 in macrophages.125

FIGURE 4.4. LPS induces CCL5 and CXCL10 protein synthesis via 4E-BP1/2-dependent and MNK-eIF4E-independent mechanisms in macrophages.126

Supplemental Figure 4.1. Viability assessment of LPS-stimulated BMDM exposed to mTOR inhibitors.140

Supplemental Figure 4.2. Secondary structures of murine *Ccl5* (left panel) and *Cxcl10* (right panel) 5' UTRs as predicted by RNAfold.....141

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE III PREMIÈRE PUBLICATION

Supplemental Table 3.1. List of primers used for RT-qPCR107

CHAPITRE IV DEUXIÈME PUBLICATION

Supplemental Table 4.1. List of primers used for RT-qPCR139

LISTE DES ABRÉVIATIONS

40S, 60S, 80S	ribosomal subunit
4E-BP	eIF4E-Binding Protein
AGO	Argonaute
Anota	Analysis of translational activity
ARE	AU-Rich Element
ARG1	Arginase 1
asTORi	Active-site mTORC1/2 inhibitors
ATP	Adenosine Triphosphate
BMDM	Bone marrow-derived macrophage
CAFs	Cancer-associated fibroblasts
CBP	Cap-Binding Protein
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5
CCR5	C-C motif chemokine receptor 5
C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein beta
CFU	Colony forming unit
CM	Conditioned medium
COX-2	Cyclooxygenase 2
Con A	Concanavilin A
Cp	Ceruloplasmin
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CstF	Cleavage stimulating Factor
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3
DKO	Double-knockout
DNA	Desoxyribonucleic acid
DSE	Downstream Sequence Element
eEF	eukaryotic translation Elongation Factor
eIF	eukaryotic translation Initiation Factor
eIF4F	eukaryotic translation Initiation Factor 4F
eRF	eukaryotic translation Release Factor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FDR	False discovery rate

FKBP12	FK504-binding protein of 12 kDa
FRB	FKBP12-Rapamycin Binding domain
GAP	GTPase-activating protein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAIT	IFN-Gamma-Activated Inhibitor of Translation
GCN2	General Control Nonrepressed 2
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucléotide Exchange Factor
GP63	Glycoprotein 63
m ⁷ GTP	7-methylguanosine Triphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HuR	Hu antigen R
IER3	Immediate early response 3
IFIT2	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	IFN- γ -induced protein 10 kDa
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF	Interferon Regulatory Factor
IRF7	Interferon Regulatory Factor 7
ITAF	IRES Trans-acting factors
KD	Knock-down
KI	Knock-in
LA	La Antigen
LARP	LA-Related Protein
LBP	LPS-binding Protein
LCCM	L929 fibroblast-conditioned culture medium
LncRNA	Long non-coding RNA
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEK	MAPK/ERK Kinase
MFE	Minimum Free Energy

mLST8	mammalian Lethal with Sec13 protein 8
MMPs	Metalloproteinases
MNK	MAPK-interacting protein kinases
mRNA	messenger RNA
mRNP	Messenger RiboNucleoParticule
mTOR	mammalian/mechanistic Target of Rapamycin
mTORC	mTOR complex
Mx1	Mx dynamin like GTPase 1
NF-IL3	Nuclear factor interleukin 3 regulated
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NOS2	Nitric oxide synthase 2
ORF	Open Reading Frame
PABP	Poly(A)-Binding Protein
PAP	Poly(A) Polymerase
PAS	PolyAdenylation Signal
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHAS-1	Phosphorylated Heat- And Acid-stable Protein Regulated by Insulin 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIC	Pre-initiation complex
PKB	Protein Kinase B
Poly(I:C)	Polyinosinic Polycytidylic Acid
PRAS40	Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa
PTB	Polypirimidine Tract-Binding Protein
PTC	Peptidyl Transferase Center
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide syntase 2
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
Raptor	Regulatory-Associated Protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma
RBD	RNA-Binding Domain
RBP	RNA-Binding Protein
RFLAT-1	Rantes factor of late activated T lymphocytes 1
Rheb	Ras homlog enriched in brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RISC	RNA-Induced Silencing Complex

RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RRM	RNA recognition motif
rRNA	Ribosomal RNA
RSK	p90 Ribosomal S6 Kinase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
S6	Ribosomal protein S6
S6K	40S ribosomal S6 Kinase
SerpinB2	Serpin family B member 2
shRNA	small hairpin RNA
sIL1ra	Secreted interleukin 1 receptor antagonist
siRNA	small interfering RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Tumor-associated macrophages
TC	Ternary complex
TIA1	T-cell-restricted Intracellular Antigen 1
TIAR	TIA-Related protein
TISU	Translation Initiator of Short 5' UTR
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TLR	Toll-like Receptor
TOP	Terminal oligopyrimidine Tract
tRNA	Transfert RNA
tRNAi	Initiator tRNA
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Complex
TTP	TristetraProlin
UTR	UnTranslated Region
WT	Wild Type

CHAPITRE I.

INTRODUCTION

1. LA MACHINERIE ET LES ÉTAPES DE TRADUCTION DE L'ARN CHEZ LES EUCARYOTES

La régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes est un processus extrêmement complexe et indispensable pour le bon fonctionnement de la cellule. Elle comprend deux grandes étapes : la transcription et la traduction. La transcription est l'étape de synthèse de l'ARN pré-messager (pré-ARNm) à partir d'une molécule d'ADN par une enzyme, l'ARN polymérase II, et se déroule dans le noyau. Après sa synthèse, le pré-ARNm va subir de nombreuses modifications co-transcriptionnelles nécessaires à sa maturation. Parmi ces modifications, se distinguent : l'épissage du pré-ARNm qui va conduire à la formation d'un ARNm mature dépourvu d'introns (séquences non codantes) mais constitué d'exons (séquences codantes) et d'une phase de lecture ouverte (ORF, open reading frame). À l'extrémité 5' de l'ARNm, se forme une structure appelée la coiffe, caractérisée par un groupement méthyle porté par un nucléotide, la guanosine et à l'extrémité 3' s'ajoute une succession de ribonucléotides de type adénosine nommée la queue poly(A). Les modifications aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm sont fondamentales pour sa stabilité, son transport, sa protection et pour favoriser l'initiation de sa traduction. Après sa maturation, l'ARNm est transporté dans le cytoplasme pour y être traduit. À ce stade, le devenir de l'ARNm est dépendant des besoins cellulaires. Plusieurs possibilités se présentent à lui : il sera stocké sous forme de particules ribonucléoprotéiques appelés « messenger ribonucleoprotein » (mRNP) ou dégradé par les exoribonucléases (Ramanathan *et al.*, 2016) ou couvrira un besoin immédiat de la cellule et atteindra son but ultime par sa synthèse en protéines.

La traduction de l'ARNm en protéines a lieu dans le cytoplasme, c'est la dernière étape de l'expression des gènes qui va convertir l'information génétique en outil fonctionnel. Pour cela, elle nécessite l'interaction de nombreuses protéines, notamment des facteurs d'initiation. Chez les eucaryotes, deux voies principales sont disponibles pour le recrutement des ribosomes à l'ARNm : la traduction coiffe-dépendante et la traduction coiffe-indépendante. La majorité des ARNm (>90%) utilisent le mécanisme d'initiation de la traduction coiffe-dépendante (von der Haar *et al.*, 2004; Walters & Thompson, 2016). Le processus de traduction de l'ARNm dépendant de la coiffe comprend plusieurs étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes. Chacune de ces étapes est minutieusement régulée par diverses protéines aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm de manière spécifique au type cellulaire et à l'espèce (Jackson *et al.*, 2010a; Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Yamashita & Takeuchi, 2017).

Mon travail de recherche porte essentiellement sur la régulation traductionnelle de l'ARNm en protéines au niveau de l'initiation et décrit dans cette première section les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus translationnel.

1.1 La traduction coiffe-dépendante

L'ARNm est par nature porteur de l'information génétique de la cellule. Pour que cette information soit scrupuleusement décodée, l'ARNm sera pris en charge par le ribosome, qui au sein d'un complexe multiprotéique va initier la traduction.

1.1.1 Initiation de la traduction

L'initiation de la traduction correspond au recrutement et à la formation du ribosome 80s sur l'ARNm. Cette étape constitue l'étape limitante de la traduction car elle fait intervenir plusieurs mécanismes et des éléments régulateurs en *cis* contenus dans les extrémités 5' et 3' « untranslated region (UTR) », région non traduite de l'ARNm (Figure 1.1) que nous allons approfondir dans les sections suivantes.

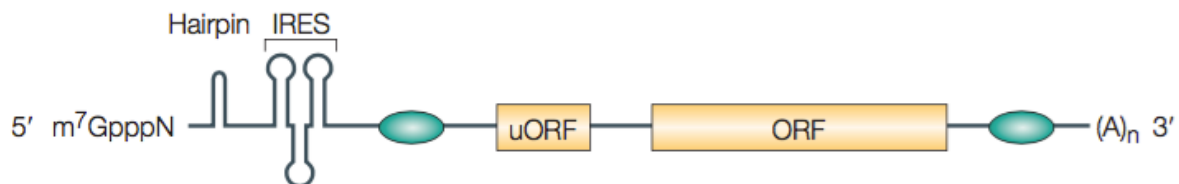


Figure 1.1 Eléments structurels impliqués dans la traduction de l'ARNm.

L'extrémité 5' comprend : la coiffe m⁷G, une structure secondaire, hairpin et les « internal ribosome entry sites (IRES) » ; suivi par des ronds verts pour représenter les éléments régulateurs en *cis* qui encadrent l'uORF (upstream open reading frame) et l'ORF ; à l'extrémité 3', la queue Poly(A) (Gebauer & Hentze, 2004).

a) La coiffe

La coiffe des ARNm est représentée chimiquement par un résidu guanosine méthylé en position N7 et reliée par une liaison caractéristique 5'-5' sur le premier nucléotide de l'ARNm (m⁷GpppN) (Reddy *et al.*, 1992) (Figure 1.2). La formation de la coiffe a lieu dans le noyau au cours de la transcription par l'ARN polymérase II. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la synthèse de la coiffe, impliquent trois activités enzymatiques : une ARN 5'-triphosphatase qui hydrolyse le phosphate γ situé à l'extrémité triphosphorylée des molécules d'ARNm ; une ARN

guanylyltransférase qui catalyse l'ajout d'un groupement guanosine monophosphate (GMP) à l'extrémité diphosphorylée permettant la formation d'une extrémité avec un résidu guanosine rattaché par une liaison 5'-5' au premier nucléotide de l'ARNm et enfin une ARN (guanine-7) méthyltransférase qui assure la méthylation du résidu guanosine en position N7 (Reddy *et al.*, 1992). La structure de la coiffe joue un rôle primordial dans plusieurs processus biologiques : l'épissage, le transport nucléocytoplasmique de l'ARNm, la stabilité de l'ARNm et un rôle important dans l'initiation de la synthèse protéique (Ramanathan *et al.*, 2016; Topisirovic *et al.*, 2011). Les ARNm possédant une structure m⁷GpppN à l'extrémité 5' sont dégradés plus lentement ; ainsi, la coiffe protège les ARNm contre les nucléases cellulaires et facilite leur traduction (Grudzien *et al.*, 2006). En revanche, les ARNm non coiffés ne sont pas traduits efficacement (Ramanathan *et al.*, 2016). Des études ont montrées que le groupement m⁷GpppN situé à l'extrémité 5' des ARNm facilite la liaison des ARNm au ribosome à l'initiation de la traduction par la reconnaissance de façon spécifique de la structure de la coiffe par les facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction (Gebauer & Hentze, 2004; Mitchell *et al.*, 2010).

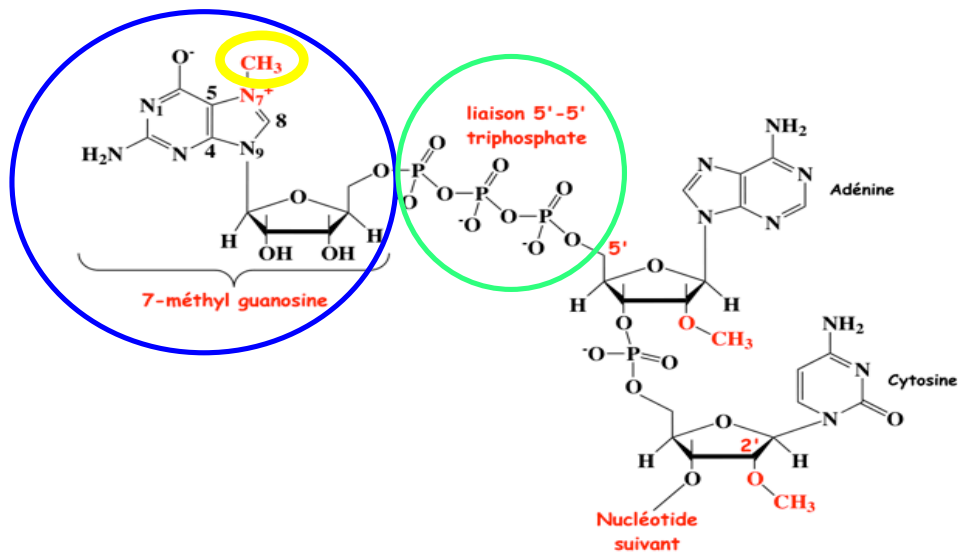


Figure 1.2 Structure de la coiffe.

Structure chimique de la coiffe (cercle bleu) constituée d'un résidu guanosine méthylé en position N7 (cercle jaune) sur le premier nucléotide de l'ARNm liée par une liaison 5'-5' triphosphate (cercle vert). (Jaspard, 2011)

b) La queue Poly (A)

L'extrémité 3' de l'ARNm se termine par une succession de nombreux ribonucléotides de type adénosine appelé : « la queue poly(A) » (Figure 1.3). Cette séquence poly(A) est synthétisée par une enzyme nucléaire, la polymérase poly(A) lors de la maturation de l'ARNm dans le noyau. La localisation du site Poly(A) est déterminée par deux séquences : le signal de polyadénylation (PAS) AAUAAA situé en amont du site de clivage et la séquence riche en G/U, appelée « Downstream Sequence Element (DSE) » située en aval. La séquence AAUAAA est reconnue par deux complexes protéiques : le facteur de spécificité de clivage et de polyadénylation « Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor (CPSF) » et le facteur de stimulation du clivage « Cleavage stimulating Factor (CstF) ». Ces protéines reconnaissent ensemble les séquences AAUAAA et G/U sur les substrats des ARN synthétisés et agissent pour favoriser le clivage de l'ARN entre ces éléments *cis*. De plus, la Poly(A) polymérase est recrutée dans ce complexe pour conduire à la polyadénylation de l'extrémité 3' de l'ARNm (Proudfoot, 2011). La liaison de la protéine « Poly(A) Binding Protein (PABP) » sur la queue Poly(A) naissante permet la stabilisation du complexe et stimule la Poly(A) polymérase qui ajoute des nucléotides supplémentaires. La queue poly(A) est impliquée dans plusieurs processus comme la stabilité de l'ARNm en le protégeant de la dégradation par les endonucléases, elle participe au transport nucléo-cytoplasmique et joue un rôle important dans le recrutement du ribosome pour permettre la traduction de l'ARNm en protéine (Dreyfus & Regnier, 2002).

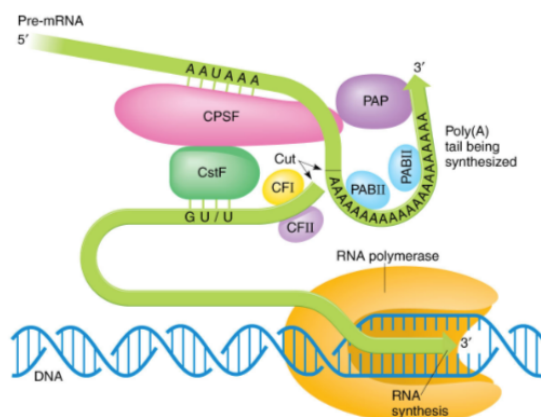


Figure 1.3 Polyadénylation de la queue Poly(A).

Les facteurs CPSF (en rose) et CstF (en vert) s'apparient aux séquences correspondantes de part et d'autre du site de clivage et de polyadénylation. La protéine PAP (en violet) ajoute les ribonucléotides pour former la queue poly(A) et recrute les protéines PABII (en bleu) pour protéger l'extrémité 3' du transcrit. (Russell, P.J., 2010).

c) Les ARNs de transfert

L'ARN de transfert (ARNt) est une petite molécule d'ARN de 70 à 100 nucléotides qui est impliqué dans la synthèse des protéines (Figure 1.4). Son rôle est de transférer les acides aminés vers les ribosomes fixés sur l'ARNm où les protéines sont en cours d'assemblage. L'ARNt porte à son extrémité 3' l'un des vingt acides aminés qu'il transporte au ribosome. À l'extrémité 5', une séquence d'acide aminé correspondant à l'anticodon qui s'apparie avec le codon de l'ARNm (Hershey *et al.*, 2012). L'acide aminé est chargé sur l'ARNt grâce à des enzymes, les aminoacyl-ARNt-synthétases qui vont mettre en relation un codon et un acide aminé. Le premier codon indispensable pour le démarrage de la traduction est la méthionine. La traduction est initiée lorsque l'ARN de transfert initiateur (ARNti) assure la lecture des codons de l'ARNm par l'intermédiaire de son anticodon au niveau des sites A et P de la petite sous-unité du ribosome et apporte la méthionine (ARNti-Met) fixée à son extrémité 3' au centre du peptidyl-transférase situé dans la grande sous-unité du ribosome et ainsi commence la synthèse de la chaîne polypeptidique (Kolitz & Lorsch, 2010; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). En plus de l'ARNti, de nombreux facteurs d'initiation sont nécessaires pour l'amorçage de l'initiation de traduction.

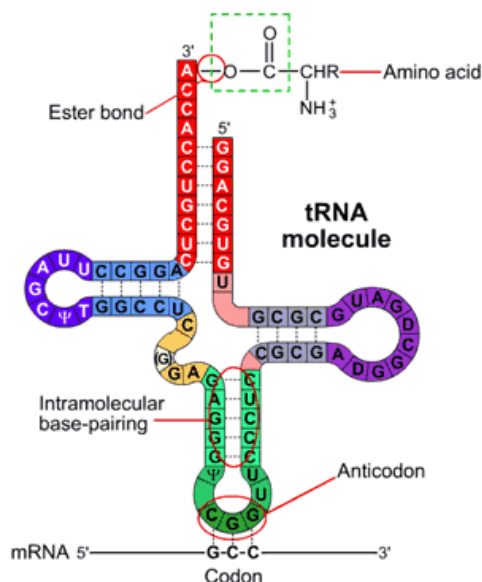


Figure 1.4 Structure de l'ARN de transfert.

L'ARNt est une molécule avec une structure en L inversée conservée. Une extrémité de l'ARNt contient une boucle anticodon qui se couple avec l'ARNm spécifiant un certain acide aminé. L'autre extrémité de l'ARNt possède un acide aminé attaché au groupement 3'OH via une liaison ester. L'ARNt avec un acide aminé attaché est dit « chargé ». (Wiley, 2002)

1.1.2 Mécanismes d'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est un processus complexe qui consomme beaucoup d'énergie et qui nécessite l'implication de nombreux facteurs interagissant ensemble pour former la machinerie traductionnelle qui va se lier à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ces facteurs d'initiation eucaryotique « eukaryotic Initiation Factors » (eIFs) sont au moins au nombre de 12 et s'organisent entre eux en formant plusieurs complexes ayant des rôles bien distincts (Figure 1.5) :

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

L'initiation de la traduction débute par l'assemblage du complexe ternaire (TC) composé de l'ARNti-méthionine (ARNti-Met), du facteur d'initiation eIF2 et du GTP. L'association de ce complexe TC avec la sous-unité 40S du ribosome va aboutir à la formation du complexe de pré-initiation 43S appelé le « pre-initiation complex » (PIC). Cet assemblage se fait par l'intermédiaire de plusieurs facteurs d'initiation : eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. Ces facteurs participent à la reconnaissance du codon d'initiation AUG en facilitant la liaison du TC et le chargement de l'ARNm par le PIC (Van Der Kelen *et al.*, 2009).

Le facteur eIF2 joue un rôle particulier dans l'initiation de la traduction. Il comprend trois sous-unités : α , β , et γ . La sous-unité γ possède une activité GTPase et un site de liaison au GTP et à l'ARNti-Met. L'hydrolyse du GTP provoque une perte d'affinité d'eIF2 pour l'ARNti-Met et sa dissociation de celui-ci. Sous sa forme inactive, eIF2 est complexé au GDP ; cet échange GDP-GTP est facilité par le facteur eIF2B qui possède une activité « Guanosine Exchange Factor » (GEF) (Preiss & M, 2003). eIF2 possède un site de phosphorylation, la sérine 51, sur la sous-unité régulatrice α . Sa phosphorylation en conditions de stress par différentes kinases, telles que « Pancreatic Endoplasmic Reticulum eIF2 kinase » (PERK), « double-strand RNA-activated Protein kinase » (PRK), « General control of Nitrogen metabolism kinase 2 » (GCN2) et « Heme-Regulated eIF2 α kinase » (HRI), bloque l'échange GDP-GTP maintenant ainsi eIF2 lié au GDP dans son état inactif et renforçant l'activité d'eIF2 pour son régulateur eIF2B (Hershey *et al.*, 2012).

Les facteurs eIF3 et eIF5 fixés à la sous-unité 40S du ribosome interagissent avec le PIC (Fraser *et al.*, 2007). eIF3 stabilise la sous-unité 40S et empêche sa réassociation avec la sous-unité 60S (Holcik & Pestova, 2007) produisant ainsi un effet négatif sur la formation du ribosome 80S. Ces associations protéiques contribuent à la formation de la machinerie traductionnelle et ont un impact fonctionnel majeur sur l'initiation de la traduction.

b) Formation du complexe eIF4F

Le complexe eIF4F est formé de trois protéines : eIF4A, eIF4E et eIF4G. eIF4A est une ARN hélicase ATP-dépendante, qui déroule les structures secondaires de l'ARNm permettant ainsi la liaison du complexe 43S sur l'ARNm. eIF4E est un facteur d'initiation limitant et possède une forte affinité pour la coiffe, m⁷GTP de l'ARNm. eIF4E permet la liaison d'eIF4G mais d'autres protéines rentrent en compétition avec eIF4G au niveau du site de fixation sur eIF4E, les protéines « eIF4E-Binding proteins » (4E-BPs) qui font l'objet de mon étude et seront détaillées dans une autre section. eIF4G est une protéine d'échafaudage entre la coiffe m⁷GTP et le complexe eIF4F (Hershey *et al.*, 2012; Hinnebusch, 2015). eIF4G sert d'adaptateur pour tous les facteurs d'initiation. La formation du complexe eIF4F va guider la liaison d'eIF4E à la structure m⁷G de la coiffe.

c) Formation du complexe 48S

Le complexe 43S est recruté à l'ARNm par le complexe eIF4F pour former ensemble le complexe 48S (Van Der Kelen *et al.*, 2009). eIF4A déroule les structures secondaires de l'ARNm pour permettre le balayage de l'ARNm du 5' vers le 3' par le complexe 43S jusqu'à la rencontre du codon d'initiation AUG. À ce stade, les protéines eIF1 et eIF1A vont rejoindre le PIC pour contrôler la progression du ribosome pour bloquer les mésappariements en dissociant le complexe et en protégeant la reconnaissance du codon d'initiation.

Le facteur eIF5B agit au site d'initiation ; il est responsable de l'hydrolyse du GTP ce qui entraîne la dissociation du PIC (Algire *et al.*, 2005). L'association de la sous-unité 60S et 40S va conduire à la formation du ribosome 80S qui permet ainsi la synthèse des protéines.

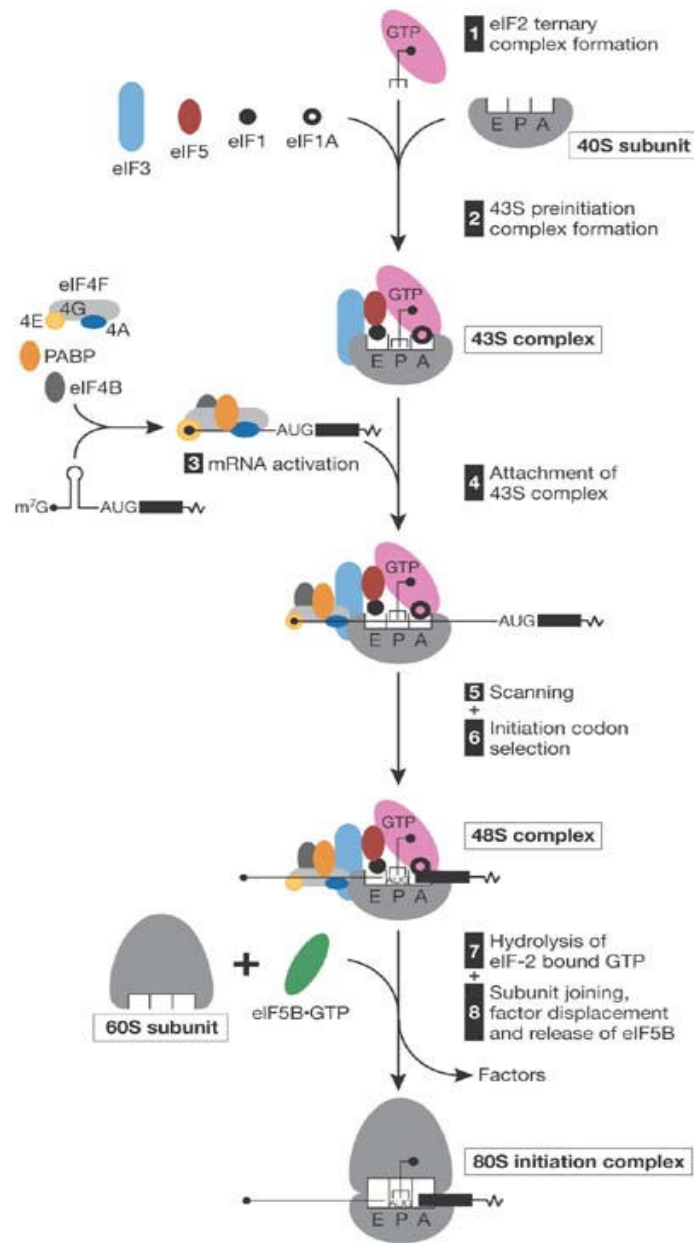


Figure 1.5 Les étapes de l'initiation de la traduction.

(1) Le complexe ternaire composé d'eIF2-GTP-Met-RNAti recrute les facteurs d'initiation eIF3, 1, 1A, 5 et la sous-unité 40S pour former en (2) le complexe de pré-initiation 43S. (3) Liaison du complexe eIF4F via eIF4E à la coiffe m⁷G de l'ARNm. (4) Recrutement du complexe 43S par le complexe eIF4F pour former le complexe 48S. (5) Balayage du 5' UTR. (6) Sélection du codon AUG. (7) Hydrolyse du GTP lié à eIF2 suite à l'assemblage de la sous-unité 60S médié par eIF5B. (8) Libération d'eIF5B et formation du complexe d'initiation 80S qui va amorcer la traduction (Holcik & Pestova, 2007).

1.1.3 Elongation de la traduction

Le mécanisme de l'élongation de la traduction est un système bien conservé entre les procaryotes et les eucaryotes (Rodnina & Wintermeyer, 2009). L'élongation comprend des cycles répétés de 3 processus : la sélection de l'aminoacyl-RNAt, la formation de la liaison peptidique et la translocation (Figure 1.6). Ces processus conduisent à une série de réarrangements structuraux du ribosome (Noeske & Cate, 2012; Zhang *et al.*, 2009). Le ribosome compétent pour l'élongation comprend trois sites de liaison pour l'ARNt : un site A (Accepteur) pour l'aminoacyl-ARNt, le site P (Peptidyl) pour le peptidyl-ARNt et le site E (Exit) pour l'ARNt désacétylé. Suite à l'initiation de traduction, le ribosome 80S est chargé sur l'ARNm pour commencer l'élongation. La première étape correspond à la sélection de l'aminoacyl-ARNt par la formation d'un complexe ternaire entre l'aminoacyl-ARNt, le facteur d'élongation « eucaryotic elongation factor 1A » (eEF1A) et une molécule de GTP au site A du ribosome. Suite à l'appariement du codon et de l'anticodon, le ribosome change de conformation qui mène à l'hydrolyse du GTP par le facteur eEF1A suivie de la dissociation d'eEF1A-GDP du site A du ribosome. Une fois l'aminoacyl-ARNt chargé dans le site A, la deuxième étape s'installe par la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé porté par l'aminoacyl-ARNt et l'extrémité C-terminale du polypeptide naissant au niveau du site P. Cette liaison covalente est catalysée par le site actif du ribosome appelé « Peptidyl Transferase Center » (PTC). La troisième étape est la translocation, le ribosome se déplace d'un codon sur l'ARNm de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Ainsi le peptidyl-ARNt est déplacé du site A vers le site P. Cette translocation est provoquée par le facteur eEF2 et dépend de l'hydrolyse du GTP complexé à eEF2. L'avancée du ribosome sur l'ARNm est unidirectionnelle et se fait par la différence d'affinité entre les sites A, P et E. Ensuite, le facteur eEF1B stimule l'échange GDP-GTP ce qui entraîne la réactivation d'eEF1A. La translocation du peptidyl-ARNt au site P libère le site A qui peut accueillir un nouvel aminoacétyl-ARNt. L'ARNt déacétylé restant est transféré au site E puis libéré. Le ribosome 80s se déplace ainsi sur l'ARNm jusqu'au codon stop de terminaison (Dever & Green, 2012).

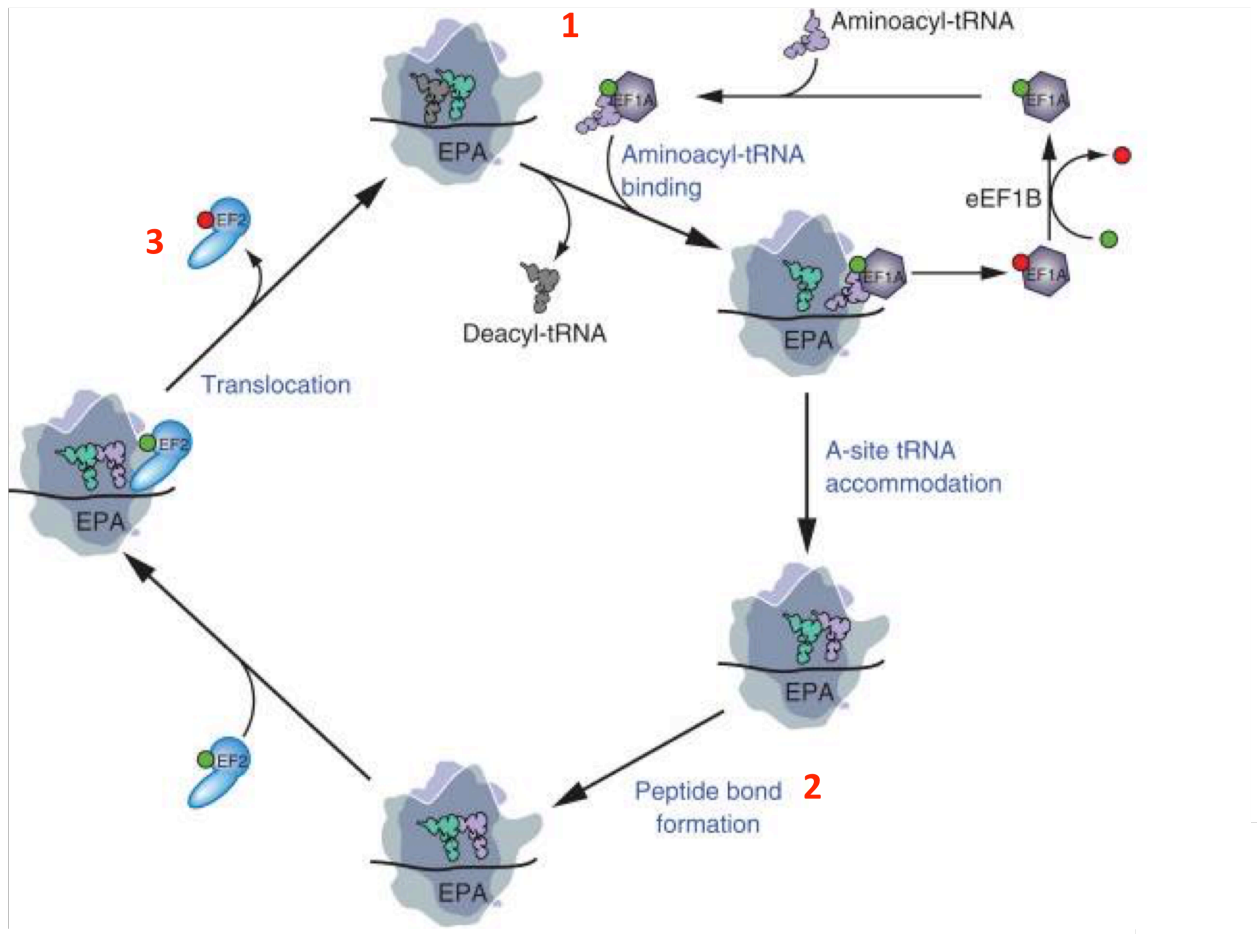


Figure 1.6 : Voie d'élongation de la traduction eucaryote.

1) Le complexe ternaire eEF1A-GTP-aminoacyl-ARNt lie l'aminoacyl-ARNt au ribosome 80S. Après la libération d'eEF1A-GDP, l'aminoacyl-ARNt est logé dans le site A, et eEF1A-GDP est recyclé en eEF1A-GTP par le facteur d'échange eEF1B. 2) La formation de la liaison peptidique s'accompagne d'une transition des ARNt du site A et du site P. 3) La liaison d'eEF2-GTP favorise la translocation des ARNt dans les sites P et E suivie par la libération d'eEF2-GDP. Le ribosome est maintenant prêt pour le prochain cycle d'élongation avec la libération de l'ARNt désacylé à partir du site E et la liaison d'eEF1A-GTP-aminoacyl-ARNt approprié au site A. GTP est représentée par une boule verte et le GDP par une boule rouge (Dever & Green, 2012).

1.1.4 Terminaison de la traduction

La terminaison de la traduction a lieu lorsqu'un des trois codons de terminaison (UAA, UGA ou UAG) appelés codons stop de l'ARNm atteint le site A du ribosome. À ce stade, il y a activation de deux facteurs protéiques : « eukaryotic release factor 1 » (eRF1) et eRF3 qui collaborent ensemble pour catalyser la terminaison. Le facteur eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon stop dans le site A de la petite sous-unité ribosomale. Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire du domaine N-terminal du facteur eRF1, cependant, les mécanismes ne sont pas encore bien compris. Le codon stop est reconnu par eRF1 au sein d'un complexe ternaire eRF1/eRF3 /GTP. Le facteur eRF3 possède une activité GTPase qui stimule la libération du peptide dans le centre PTC de la grande sous-unité ribosomale et augmente l'efficacité de terminaison par l'hydrolyse du GTP (Alkalaeva *et al.*, 2006). Après l'hydrolyse du GTP par eRF3, le facteur eRF1 déclenche l'hydrolyse du polypeptidyl-ARNt, libérant ainsi le polypeptide formé. À ce stade, le ribosome 80S est encore lié à l'ARNm, avec l'ARNt désacétylé dans son site P et eRF1 dans son site A, qui doit être désassemblé et libéré de l'ARNm pour permettre d'autres cycles de traduction (Jackson *et al.*, 2012).

1.1.5 Le recyclage des composants de la traduction

Le processus de recyclage des composants de la traduction commence après le relarguage de la chaîne polypeptidique. Les composants de la machinerie traductionnelle se dissocient : les sous-unités du ribosome, l'ARNm, l'ARNt désacétylé sont régénérés pour un nouveau cycle de traduction. La première étape du recyclage est la dissociation de la sous-unité ribosomale 60S, laissant un complexe 40S/ARNt désacétylé lié à l'ARNm. Deux facteurs, Dom34 et Hbs1 liés aux facteurs de terminaison eucaryotique eRF1 et eRF3 respectivement favorisent la dissociation des sous-unités ribosomales (Shoemaker *et al.*, 2010). Cette dissociation est médiée par une ATPase, ABCE1, de la famille ABC, qui convertit l'énergie chimique de l'hydrolyse de l'ATP en mouvements mécaniques qui peuvent séparer les sous-unités ribosomales. Ainsi, l'activité de dissociation de la sous-unité dépendante de Dom34 est également fortement favorisée (environ 20 fois) par la présence de ABCE1. Après l'hydrolyse de l'ATP, par ces facteurs, leur affinité pour les ribosomes est diminuée et les facteurs sont facilement chassés du complexe (Shoemaker & Green, 2011). Enfin l'hydrolyse de l'ATP sur ABCE1 est couplée à la dissociation des sous-unités. Les sous-unités ribosomales séparées sont ensuite liées par des facteurs d'initiation disponibles qui les préparent à des cycles ultérieurs d'initiation ou de réinitiation (Pisarev *et al.*, 2007).

1.2 La traduction coiffe-indépendante ou médiée par les « internal ribosomal entry sites (IRES) »

La majorité des ARNm utilise la voie classique de la traduction coiffe dépendante. Cependant, dans les conditions de stress, la machinerie cellulaire est perturbée et provoque un arrêt brutal de la synthèse de la majorité des protéines. Pour y remédier, une voie non conventionnelle, les IRES, va prendre le relai en permettant l'initiation de la traduction de certains ARNm indépendamment de la coiffe (Liu & Qian, 2014; Van Eden *et al.*, 2004). Les éléments IRES sont des séquences régulatrices d'ARN situés dans la structure 5' UTR des ARNm en amont du codon initiateur. Ils initient la traduction pendant le stress cellulaire, lorsque la traduction coiffe dépendante est compromise (Komar & Hatzoglou, 2011; Spriggs *et al.*, 2010). Les premiers IRES ont été retrouvés dans l'ARN génomique de deux picornavirus : le poliovirus et le virus de l'encéphalomyocardite. Ces virus induisent une traduction interne de l'ARNm de tous les membres de la famille des Picornaviridae (Pelletier & Sonenberg, 1988; Willcocks *et al.*, 2011). Les IRES viraux ont été découverts par la suite chez d'autres virus (Honda *et al.*, 1996; Isaksson *et al.*, 2007) suivi de l'identification des IRES cellulaires (Fernandez *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2010). Bien que les éléments IRES accomplissent la même fonction, ils diffèrent dans la séquence nucléotidique, dans la structure secondaire de l'ARN et dans l'exigence de facteurs agissant en *trans*. Parmi ces facteurs, les protéines « IRES trans-acting factors (ITAFs) » participent à l'amorçage de la traduction coiffe indépendante. Ces protéines liant l'ARN sont censées aider au bon repliement de la région IRES facilitant le recrutement de l'ARNm à la machinerie traductionnelle. Les éléments IRES peuvent être classés en deux catégories : ceux qui n'ont pas besoin de protéines pour l'assemblage du complexe d'initiation à la sous-unité ribosomale (Spahn *et al.*, 2004) et ceux qui ont besoin de facteurs d'initiation pour recruter la sous-unité ribosomale à l'ARNm (typiquement les IRES des Picornaviridae, des virus de l'hépatite C et des ARN cellulaires) (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000; Mitchell *et al.*, 2003; Pestova *et al.*, 1998). Dans cette dernière catégorie des groupes distincts peuvent être formés en fonction des motifs structuraux de l'ARN et protéines requises pour cette activité (Pacheco & Martinez-Salas, 2010). Les ITAFs sont des protéines de liaison à l'ARN qui agissent comme des régulateurs de transcription, des facteurs d'épissage, de transport d'ARN, de stabilité de l'ARN ou des protéines de contrôle de la traduction (Vazquez-Pianzola *et al.*, 2005; Weinlich *et al.*, 2009). Les ARNm contenant des IRES codent pour les protéines impliquées dans la croissance cellulaire, la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse (Komar & Hatzoglou, 2011; Spriggs *et al.*, 2010).

1.3 Mécanismes alternatifs de la traduction coiffe dépendante ou indépendante

1.3.1 Mécanisme d'initiation de la traduction médié par les isoformes : eIF4E2 et eIF4E3

eIF4E constitue une famille de trois isoformes : eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3 (Joshi *et al.*, 2005). eIF4E1 appelée couramment eIF4E, est le plus abondant dans la cellule et se lie à la coiffe avec une plus grande affinité qu'eIF4E2 et eIF4E3 (Osborne *et al.*, 2013). Dans des conditions bien définies, telle que l'hypoxie, eIF4E2 participe à l'initiation de la traduction dans les cellules humaines (Ho *et al.*, 2016). Lors d'une diminution de l'oxygène, mTORC1 est inhibée et 4E-BP séquestre eIF4E, bloquant ainsi l'initiation de la traduction (Braunstein *et al.*, 2007). Plusieurs mécanismes d'initiation de la traduction indépendant de la coiffe comme les IRES, les uORFs vont permettre la traduction d'ARNm requis lors d'un stress spécifique (Lu *et al.*, 2004). Cependant, dans le cas de l'hypoxie, un mécanisme alternatif dépendant de la coiffe utilise un homologue d'eIF4E, l'isoforme eIF4E2 (Rom *et al.*, 1998). Premièrement, le facteur de transcription, HIF-2 α est impliqué dans l'induction de gènes régulés par l'oxygène (Uniacke *et al.*, 2012). HIF-2 α interagit avec un motif de liaison à l'ARNm « RNA-binding motif 4 » (RBM4) situé dans le 3' UTR des transcrits contenant des éléments de réponse à l'hypoxie « RNA hypoxie response elements » (rHREs). Deuxièmement, le complexe HIF-2 α /RBM4 relie le 3' UTR à la coiffe 5' par l'intermédiaire d'eIF4E2, indépendamment des protéines de liaison Poly(A) (Uniacke *et al.*, 2012). eIF4E2 interagit avec eIF4A et eIF4G3 pour former un complexe hypoxique eIF4F, nommé eIF4FH qui va augmenter l'efficacité de la traduction indépendamment de l'abondance de l'ARNm (Ho *et al.*, 2016). Les niveaux d'eIF4E2, d'eIF4A et d'eIF4G3 ne changent pas dans l'hypoxie. HIF-2 α est essentiel pour l'activité d'eIF4E2 et pourrait être le seul activateur d'eIF4E2 dans l'hypoxie (Uniacke *et al.*, 2012). Cependant, le rôle d'eIF4E2 dans d'autres stress que l'hypoxie n'a pas encore été exploré chez l'homme (Melanson *et al.*, 2017).

L'isoforme eIF4E3 possède une structure différente des autres isoformes (eIF4E1 et eIF4E2). Contrairement à eIF4E1, il manque deux résidus aromatiques nécessaires pour la liaison à la coiffe. Cependant, une récente découverte (Osborne *et al.*, 2013) basée sur des approches biophysiques a montré qu'eIF4E3 est capable de se lier à la coiffe m⁷G de manière atypique et d'exercer un rôle de suppresseur de tumeurs dans les cellules. En effet, l'inhibition de l'activité des MNKs bloque la phosphorylation d'eIF4E1 sur la sérine 209 et ce qui entraîne une augmentation d'expression d'eIF4E3. De ce fait, eIF4E3 se lie à la coiffe et forme un

nouveau complexe avec eIF4F pour initier la traduction. Ainsi, MNKs régulent l'initiation de la traduction dépendante d'eIF4E3 (Landon *et al.*, 2014).

1.3.2 Mécanisme d'initiation de la traduction médiée par le « cap-binding complex » (CBC)

CBC est un complexe de polypeptides de 20 et 80 kDa appelé « cap-binding protein 20, 80 » CBP20 et CBP80. Il est présent chez tous les eucaryotes (Figure 1.7). Ce complexe a été purifié pour la première fois à partir d'extraits de cellules HeLa (lignée cellulaire cancéreuse, provenant d'un cancer du col de l'utérus) (Konarska *et al.*, 1984; Ohno *et al.*, 1987). CBP20 et CBP80 se lient de manière synergique à m⁷G. La structure cristallographique a révélé que la poche de liaison à m⁷G se trouve sur CBP20 (Mazza *et al.*, 2001) et elle est positionnée entre deux résidus de tyrosine Tyr20 et Tyr43 de la sous-unité CBP20 (Calero *et al.*, 2002). CBP80 provoque un changement de conformation dans la sous-unité CBP20 qui est nécessaire pour une liaison avec une forte affinité. La structure de CBP80 est hautement ordonnée et composée de trois domaines hélicolidaux. Le domaine N-terminal de CBP80 est similaire à « middle domain of eIF4G » (MIF4G) (domaine intermédiaire d'eIF4G) et est requis pour la traduction dépendante de la coiffe (Marintchev & Wagner, 2005). Le MIF4G et les domaines hélicoïdaux intermédiaires de CBP80 induisent une interaction avec CBP20.

En plus de sa liaison à m⁷G, CBC se lie directement à l'ARNm via les deux sous-unités. CBP20 contient un classique « RNA-recognition motif » (RRM). Un variant d'épissage de CBP20 qui ne se lie pas à CBP80 ni à m⁷G mais contient une partie du RRM qui a conservé une activité « RNA-binding » réduite (Pabis *et al.*, 2010). CBP80 se lie aussi à l'ARN (Castello *et al.*, 2012). CBC est un complexe avec plusieurs fonctions essentielles pour l'expression des gènes : il coordonne les événements du traitement de l'ARN, la transcription, l'épissage, l'export nucléaire du transcrit, la stabilité de l'ARN et la traduction. CBP80 contient un signal de localisation nucléaire et CBP20 est co-importé dans le noyau avec CBP80 (Lewis & Izaurralde, 1997).

CBC possède une fonction analogue à eIF4F dans la traduction, à l'exception du fait qu'il gère les premiers cycles de la traduction, connu sous le nom de cycle pionnier de la traduction. Initialement, le cycle pionnier de la traduction devait jouer un rôle de contrôle de qualité (Chiu *et al.*, 2004). Des preuves ont montré que les transcrits reliés à CBC peuvent subir de multiples cycles de traduction (Garre *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012). Cependant, contrairement au cycle de traduction standard d'eIF4F, le cycle pionnier de la traduction ne génère pas des quantités abondantes de protéines. Ce mécanisme d'initiation n'est pas bien défini. Il a été décrit

que CBC interagissait avec eIF4G dans des cellules de levure et de mammifères (Fortes *et al.*, 2000). Cependant, il a été démontré qu'une protéine présentant une similitude avec eIF4G appelée facteur d'initiation de la traduction dépendante de CBC « CBC-dependent translation initiation factor » (CTIF) interagissait avec CBP80 (Kim *et al.*, 2009a). CTIF est nécessaire dans l'initiation du cycle pionnier de la traduction mais n'intervient pas dans le mode de traduction standard (Choe *et al.*, 2012). CTIF interagit avec eIF3g, un composant du complexe eIF3 et recrute la sous-unité 40s du ribosome à CBC lié à l'ARNm pour le cycle pionnier de la traduction (Choe *et al.*, 2012). Une délétion de CTIF entraîne une redistribution de CBC dans les fractions polysomales, suggérant que CTIF est un composant essentiel pour le cycle pionnier de la traduction et qu'il fonctionne de manière similaire à eIF4G dans le mode standard de la traduction (Choe *et al.*, 2012). Contrairement à la traduction standard d'eIF4F où l'ARNm lié à eIF4E forme une structure circulaire ; cette circularisation n'a pas été observée dans la traduction dépendante de CBC (Rufener & Muhlemann, 2013). La transition du cycle pionnier de la traduction au mode standard et l'échange CBC pour eIF4F à la coiffe m⁷G sont régulés par des importines (Sato & Maquat, 2009). L'importine- α interagit avec CBP80 (Dias *et al.*, 2009). Dans le cytoplasme, l'importine- β interagit avec l'importine- α et favorise la dissociation de l'ARNm de CBC. Par la suite, eIF4E interagit avec m⁷G favorisant l'initiation de la traduction dépendante d'eIF4E (Sato & Maquat, 2009).

La traduction dépendante de la coiffe est le plus souvent rapidement dégradée par les voies de signalisation en réponse aux facteurs de stress physiologiques et environnementaux pour atténuer les dommages cellulaires et favoriser la survie des cellules. Cette régulation négative a lieu dans les infections virales, la privation d'acides aminés, l'hypoxie ou un choc thermique et accompagnée d'une phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α (décrit dans la section suivante 2.1). La phosphorylation d'eIF2 α diminue la traduction de la majorité des ARNm liés à CBC et eIF4E en limitant l'abondance des complexes ternaires tout en assurant la traduction sélective d'un sous-ensemble d'ARNm cellulaires qui initie la traduction par un mécanisme dépendant de la phase ouverte de lecture en amont (uORF). Ces ARNm codent spécifiquement des facteurs de transcription permettant aux cellules de s'adapter au stress et de restaurer la traduction (Holcik & Sonenberg, 2005).

Cependant, la traduction d'ARNm liés à CBC est maintenue pendant la privation de sérum et le choc thermique lorsque la traduction d'ARNm liés à eIF4E est comprise (Oh *et al.*, 2007). La privation de sérum n'entraîne pas la phosphorylation d'eIF2 α mais active de préférence 4E-BP1.

La restauration de la traduction d'ARNm liés à CBC est la première étape de normalisation de la traduction qui favorise la survie cellulaire après un stress en permettant la surveillance des ARNm nouvellement synthétisés.

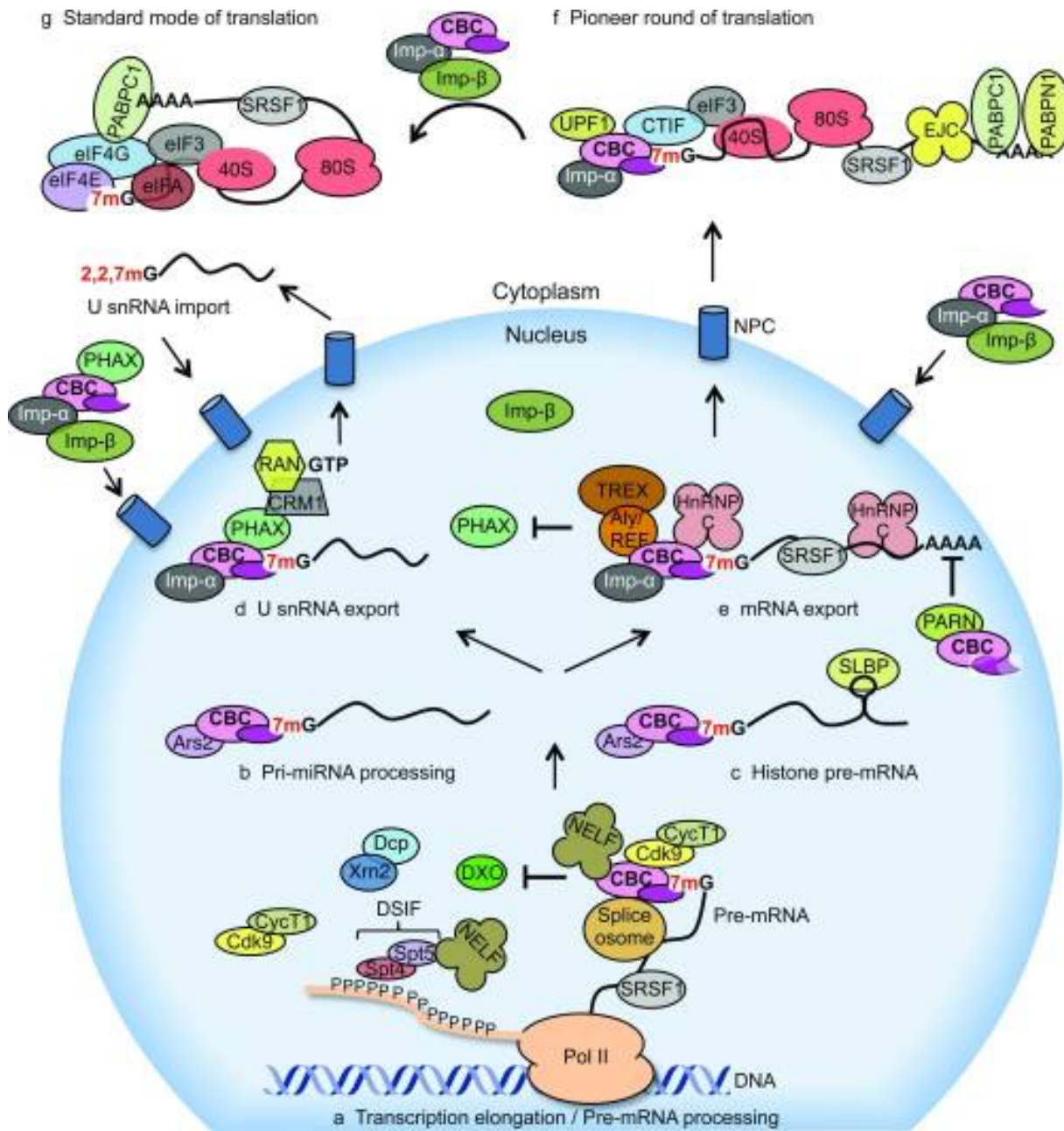


Figure 1.7 : Rôle de CBC dans l'expression des gènes.

(a) CBC (en rose) coordonne le traitement du Pre-mRNA, recrute les facteurs d'initiation de la transcription et il régule l'épissage constitutif et alternatif. (b) CBC favorise la biogénèse des miRNAs. (c) CBC assure le traitement de Pre-mRNA dans la transcription d'histones. (d) CBC initie et recrute les facteurs

d'exportation. (e) CBC participe à l'exportation de l'ARNm dans le cytoplasme. (f) CBC assure l'initiation du cycle pionnier de la traduction dans le cytoplasme. Interaction entre CBP80 et CTIF (en bleu) pour recruter la sous-unité 40s via eIF3 pour initier la traduction. L'importine β se lie à l'importine α , l'ARNM est libéré de CBC et se lie à eIF4E pour le passage à l'initiation en mode standard. (g) Mode de traduction standard médiée par la liaison d'eIF4E à la coiffe (Gonatopoulos-Pournatzis & Cowling, 2014).

1.3.3 Mécanisme d'initiation : « Cap-independent translation enhancers » (CITEs)

Un nouveau mécanisme d'initiation de la traduction eucaryotique qui ne dépend ni de la coiffe m^7G ni des IRES. Les CITEs sont des éléments de l'ARNm qui attirent des facteurs d'initiation clés en favorisant l'assemblage de complexes d'initiation de la traduction (Figure 1.8). À l'origine, les CITEs ont été découverts il y a plus de deux décennies dans des régions non traduites d'ARNm de certains virus de plantes, où ils fournissent des taux élevés de traduction d'ARNm de virus naturellement non coiffés (Kneller *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007). Cependant, cette découverte n'a pas été retenue dans le domaine de la traduction chez les mammifères en raison de la prédominance du concept d'éléments IRES cellulaires, utilisé pour expliquer de nombreuses propriétés des 5' UTR de ces ARNm apparemment non conventionnels (Terenin *et al.*, 2013).

Les CITEs sont situés dans les régions 5' UTR et 3' UTR de l'ARNm (Shatsky *et al.*, 2010) et sont couramment appelés 5' CITE et 3' CITE. Ils confèrent une initiation très efficace au codon AUG dans le 5' UTR de l'ARNm (Miller & White, 2006). Les CITEs n'agissent pas comme les IRES bien que certains coopèrent avec eux. Les découvertes de ces dernières années, démontrent que les CITEs existent et peuvent fonctionner dans les cellules animales et que le concept des IRES n'est plus le seul moyen de décrire la traduction indépendante de la coiffe (Shatsky *et al.*, 2018). La découverte des CITEs explique de nombreux cas intrigants de la traduction, par exemple, le cas de régulateurs d'ARN (Xue *et al.*, 2015). Les CITEs sont capables de recruter les facteurs d'initiation de la traduction en 5' ou en 3' UTR pour permettre l'assemblage du PIC et amorcer la traduction indépendamment de la coiffe.

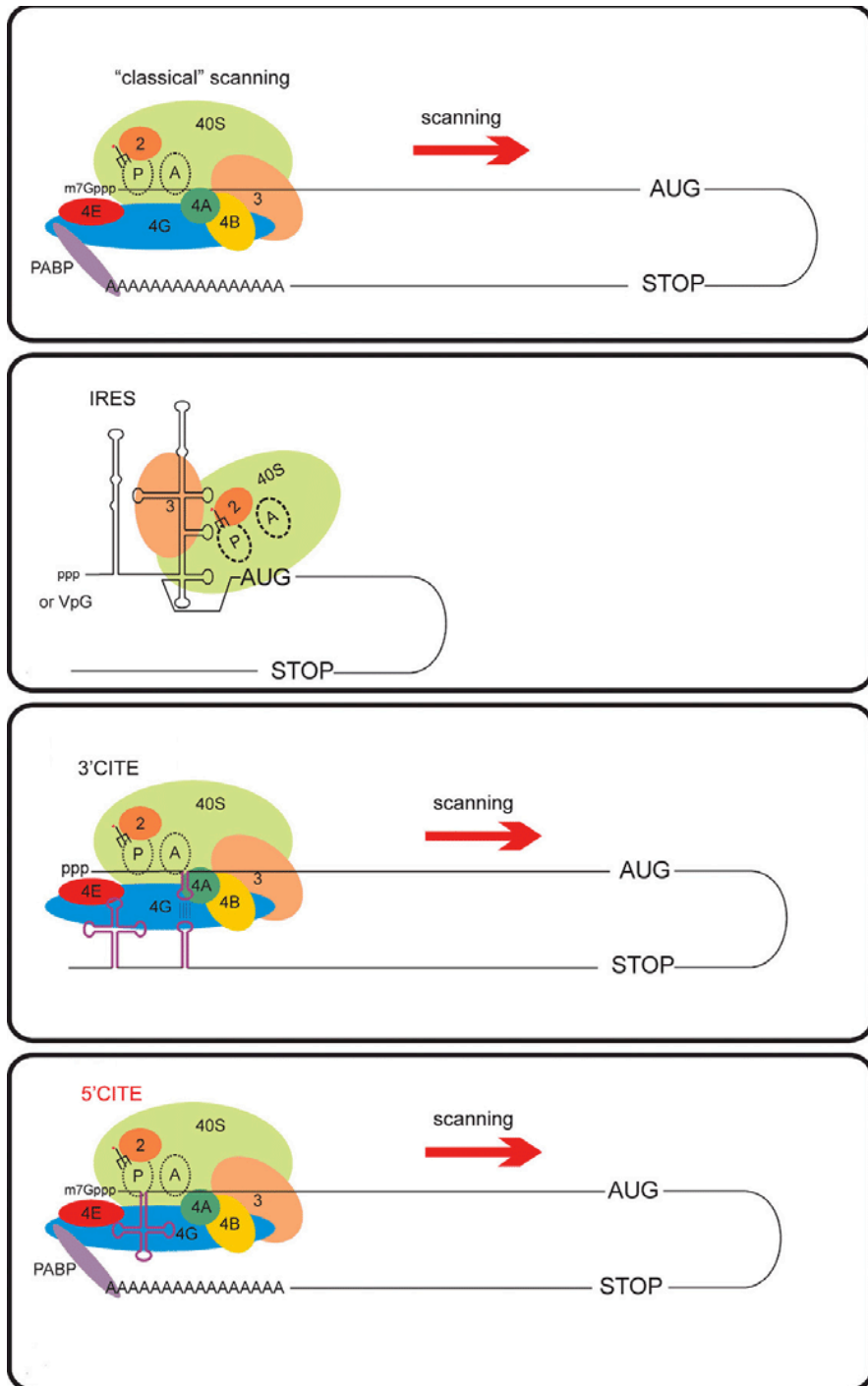


Figure 1.8 : Les différents modes d'initiation de la traduction.

(A) Mécanisme d'initiation de la traduction classique dépendant de la coiffe. (B) Mécanisme d'initiation de la traduction dépendant de l'IRES. (C) Mécanisme d'initiation de la traduction dépendant du 3' CITE (représenté en violet). eIF4E et eIF4G sont recrutées par le 3' CITE à l'extrémité 3' UTR de l'ARNm. Les longues tiges boucle vont permettre la circularisation de l'ARNm et le positionnement au 5' UTR. (D) Mécanisme d'initiation de la traduction dépendant du 5' CITE, le CITE situé dans la région 5' UTR va interagir de manière supplémentaire avec les facteurs d'initiation (Shatsky *et al.*, 2010).

2. MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA TRADUCTION

La régulation traductionnelle est un mécanisme essentiel pour moduler l'expression des gènes dans divers processus biologiques. Bien que ce mécanisme a largement été décrit dans le développement embryonnaire, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, l'homéostasie cellulaire (Hershey *et al.*, 2012; Holcik & Pestova, 2007; Kong & Lasko, 2012; Larsson *et al.*, 2007; Mamane *et al.*, 2007; Sonenberg & Hinnebusch, 2009) les mécanismes moléculaires qui contrôlent la traduction de certains de ces processus en réponse aux stimuli intra- et extra-cellulaires restent encore à élucider. La régulation traductionnelle exerce deux modes de contrôle sur la synthèse des protéines : un contrôle global et un contrôle spécifique. Le contrôle traductionnel global régule la majorité des ARNm et agit principalement sur les facteurs d'initiation de la traduction en modulant l'état de phosphorylations par l'activité des kinases et des phosphatases. A l'inverse, le contrôle de la traduction spécifique module un groupe d'ARNm sans affecter la synthèse protéique globale. Cette régulation spécifique de l'ARNm est dirigée par des complexes protéiques régulateurs qui vont reconnaître et se lier à des structures bien particulières présentes dans les régions 5' et 3' UTR de l'ARNm. Le processus traductionnel joue un rôle majeur dans le contrôle de l'abondance des protéines cellulaires (Schwanhauser *et al.*, 2011). Bien que toutes les étapes de la traduction soient hautement régulées, la majorité du contrôle traductionnel a lieu à l'étape d'initiation de la traduction lors du recrutement de l'ARNm et l'ARN^t-Met au ribosome par les nombreux facteurs d'initiation de la traduction (eIFs) (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Dans cette section, nous allons développer sur les mécanismes de régulation de la traduction qui sont indépendants de l'activité d'eIF4E. Par la suite, nous allons décrire les mécanismes qui nécessitent l'activité d'eIF4E, notamment, ceux qui sont régulés par les voies mTOR et MNK.

2.1 Mécanismes indépendants de l'activité d'eIF4E

2.1.1 Régulation de la traduction par l'activité d'eIF2

Le facteur d'initiation eIF2 joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des protéines. eIF2 intervient dans les premières étapes de l'initiation de la traduction au niveau de l'assemblage du complexe ternaire 43S. Son interaction avec le complexe TC se fait par l'intermédiaire de sa structure hétérotrimérique. En effet, eIF2 comprend trois sous-unités : eIF2 α , eIF2 β et eIF2 γ (Schmitt *et al.*, 2010). La sous-unité eIF2 α contient un site de

phosphorylation, la sérine 51. La sous-unité eIF2 β permet la sélection du codon d'initiation AUG et participe à l'efficacité de la traduction par sa liaison à l'ARNm. La sous-unité eIF2 γ possède un site de liaison au GTP et à l'ARN^{ti}-Met et joue un rôle dans la dissociation de l'ARN^{ti}-Met du complexe après l'hydrolyse du GTP en GDP et la reconnaissance du codon AUG.

Le facteur eIF2 est activé (eIF2-GTP), lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 51 par le facteur eIF2B, lequel possède une activité GEF. À ce moment, eIF2-GDP est séquestré par la sous-unité eIF2 γ . Ainsi, eIF2 α inhibe la synthèse des protéines (Figure 1.9). Chez les mammifères, la phosphorylation d'eIF2 α est aussi déclenchée par quatre protéines kinases : PKR, HRI, GCN2, PERK.

Les protéines PKR, GCN2 et PERK sont sensibles au stress cellulaire. L'activation de la PKR est déclenchée par les ARNs doubles brins correspondant à une réponse antivirale pouvant aboutir à l'apoptose des cellules infectées (Garcia *et al.*, 2007).

La protéine kinase PERK est activée par le stress cellulaire et également lors d'une augmentation de la synthèse des protéines pour éviter l'accumulation et des défauts de repliements des protéines (Harding *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 1999).

La kinase GCN2 est activée par divers stress cellulaires tels que la disponibilité en acides aminés, l'oxygène, le glucose, la privation de nutriments (Jiang & Wek, 2005; Ye *et al.*, 2010).

Une autre protéine kinase, « Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) » régule négativement l'activité d'eIF2B en phosphorylant la sous-unité catalytique d'eIF2B ϵ . L'inhibition d'eIF2B par GSK3 β conduit à la survie cellulaire par la voie PI3K-Akt, cependant, en l'absence d'acides aminés, de facteurs de croissance, elle entraîne l'apoptose (Wang & Proud, 2008).

Ainsi, par son activité régulatrice, le facteur eIF2 est fortement impliqué dans la régulation globale et spécifique de la traduction des ARNm en protéines.

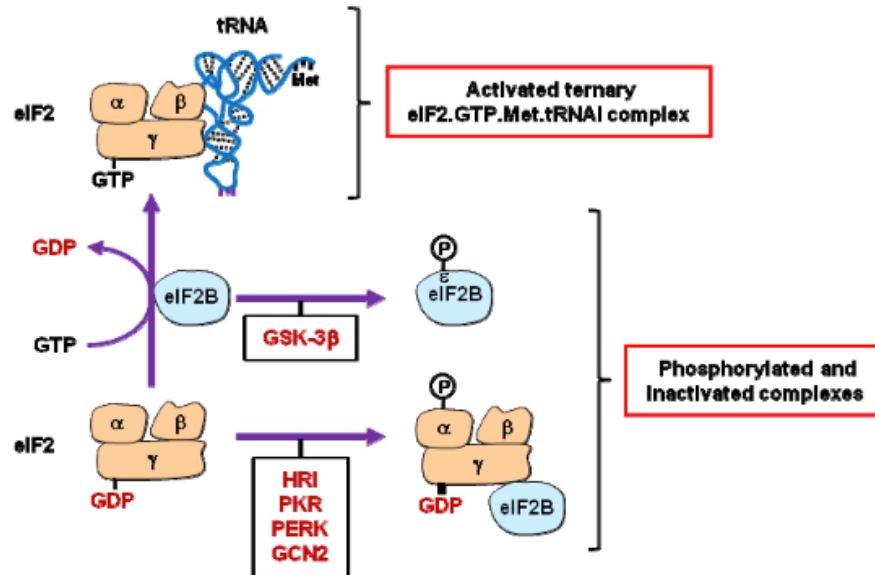


Figure 1.9 Régulation de l'activité d'eIF2.

Le facteur eIF2B favorise l'échange GTP-GDP qui active l'association du complexe ternaire. La phosphorylation de la sous-unité eIF2 α par une kinase (HRI, PKR, PERK ou GCN2) et d'eIF2B ϵ par GSK3 β inhibe les activités d'eIF2 et eIF2B (Lasfargues *et al.*, 2012).

2.1.2 Régulation de la traduction de l'ARN par les « RNA-binding proteins (RBPs) »

Les RBPs sont des protéines de liaison à l'ARNm qui vont agir comme des facteurs régulateurs aux extrémités 5' UTR et 3' UTR pour réprimer ou stimuler la traduction de sous-ensembles d'ARNm spécifiques. De plus, les RBP interagissent directement avec des séquences spécifiques ou des structures de l'ARNm appelées « RNA Binding Domain (RBD) » (Muller-McNicoll & Neugebauer, 2013) (Figure 1.10) pour contrôler l'expression de nombreux gènes et ainsi participer à la régulation de processus biologiques spécifiques comme l'apoptose (King *et al.*, 2014). Il existe plus de 1000 RBPs répertoriées à ce jour (Castello *et al.*, 2012; Castello *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016) qui se regroupent en complexes pour interagir avec l'ARNm en se liant aux RBD dont le nombre s'élève à plus de 40 (Muller-McNicoll & Neugebauer, 2013). La liaison des RBPs à l'ARNm dépend de la reconnaissance de courtes séquences d'acides nucléiques sur les RBDs. Les RBDs les plus connus sont « RNA recognition motif (RRM) » et « K-homology (KH) » qui présentent une affinité et une spécificité de liaison à l'ARNm. L'affinité des RBDs étant faible, les RBPs multiplient les sites de liaison pour augmenter leur affinité et spécificité (Auweter *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2008).

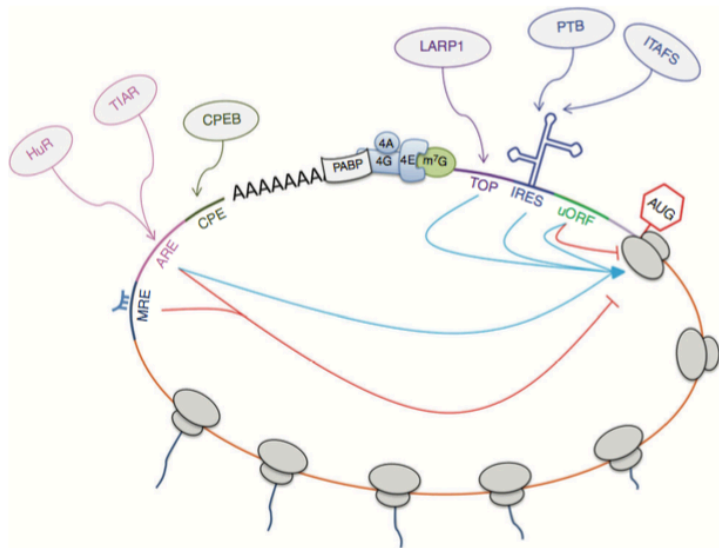


Figure 1.10 Motifs des RBD et interactions des RBPs avec l'ARNm.

Schéma représentatif de la régulation traductionnelle par les facteurs de liaison agissant en *trans* aux éléments agissant en *cis* sur un ARNm pseudo circularisé. En 5' UTR : Terminal oligopyrimidine motifs (TOPs), internal ribosome entry sites (IRESs) et uORFs. En 3' UTR : miRNA-responsive (MREs), AU-rich (AREs) et cytoplasmic polyadenylation (CPEs). Ils sont connus pour stimuler ou inhiber la synthèse des protéines. AUG indique le codon de démarrage de l'ORF (Harvey *et al.*, 2018).

En plus de la régulation globale de l'ARNm, les RBPs exercent un contrôle spécifique qui joue un rôle crucial dans le métabolisme des ARNm : la polyadénylation, l'export nucléaire, la localisation des transcrits, la stabilité et donc sur la synthèse des protéines (Martin & Ephrussi, 2009). Les motifs RBDs les plus utilisés par les RBPs sont les suivants :

2.1.2a Les motifs RNA binding protein domain (RBD)

a) Le motif « terminal oligopyrimidine motif (TOP) » :

Le motif TOP est situé dans la région 5' UTR de l'ARNm après la coiffe m⁷GTP et contient un résidu C invariable suivi de 4 à 15 bases pyrimidines avec une proportion similaire de C et de U. Le motif TOP est souvent suivi d'une région riche en CG, nécessaire pour le contrôle traductionnel (Avni *et al.*, 1997). La particularité de ce motif est de favoriser la traduction des ARNm en réponse aux facteurs de croissance et à l'insuline (Patursky-Polischuk *et al.*, 2014).

Jusqu'à ce jour, la seule protéine RBP connue pour interagir avec le motif TOP est LARP1, que nous allons détailler ci-après.

b) Le cadre de lecture ouverte en amont (uORF) :

Environ 50% des ARNm possèdent une uORF située dans la région 5'UTR (Wethmar *et al.*, 2014) (Figure 1.11). Ces petits éléments très conservés répriment la traduction de l'ORF (Chew *et al.*, 2016; Johnstone *et al.*, 2016). Les uORFs jouent un rôle important dans l'initiation de la traduction en conditions de stress, lorsque la traduction globale est diminuée par la phosphorylation d'eIF2 ce qui empêche la formation du complexe TC. Ces uORFs régulent de façon spécifique la traduction, il serait probable que cette régulation soit sous le contrôle des RBPs qui actuellement non pas été identifiées (Weingarten-Gabbay *et al.*, 2016).

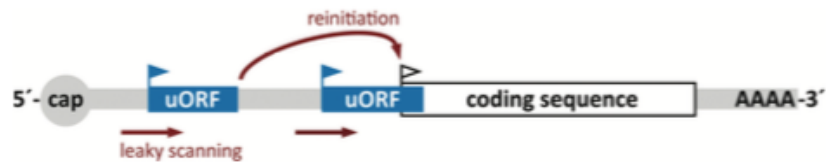


Figure 1.11 Modèle d'ARNm avec une uORF.

Deux uORFs (en bleu) précèdent l'ORF principal (en blanc, CDS). Les ribosomes peuvent initier la traduction après balayage du 5' jusqu'à l'ORF ou initier la traduction de la première uORF (Wethmar *et al.*, 2014).

c) Les éléments IRES :

Comme les uORFs, les IRES cellulaires permettent la traduction indépendante de la coiffe dans les conditions de stress notamment lors de l'apoptose précoce (Morley *et al.*, 2005). Ces éléments IRES sont des séquences situées dans la région 5' UTR et présentent environ dans 10% des ARNm (Weingarten-Gabbay & Segal, 2016). L'initiation de la traduction interne est amorcée par les RBPs qui facilitent le repliement des éléments IRES et le recrutement de la machinerie traductionnelle (Spriggs *et al.*, 2005). Les facteurs ITAFs ont été repotés comme facilitant l'activité des IRES (King *et al.*, 2010). Les IRES offrent une autre voie de régulation de la synthèse protéique lorsque la voie dépendante de la coiffe est compromise.

d) La queue Poly(A) :

La queue Poly(A) est impliquée dans la régulation de la traduction globale et spécifique de l'ARNm. Cette régulation est efficace selon la taille de la queue Poly(A). Le taux de traduction sera plus élevé plus la chaîne de polyadénylation est longue. Inversement, une chaîne de polyadénylation inférieure à 50 (A) est réprimée traductionnellement. Le contrôle de la traduction au niveau de la queue Poly(A) est activé par la liaison des PABPs qui recrutent les facteurs d'initiation de la traduction (Ivanov *et al.*, 2016).

e) Les éléments de polyadénylation cytoplasmiques (CPE) :

Les CPE sont des séquences de six nucléotides riches en pyrimidine UUUUUAU situées dans la région 3' UTR de l'ARNm et retrouvées dans 20 à 30% des gènes des vertébrés (Pique *et al.*, 2008). Les CPE contrôlent la traduction d'ARNm spécifiques par la liaison des RBPs, CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein) et vont activer ou inhiber la traduction (Ivshina *et al.*, 2014), dans certains processus biologiques comme, la gamétogénèse, la progression du cycle cellulaire et la plasticité synaptique.

f) Les éléments AU-rich (AREs) :

Les AREs sont des séquences riches en adénine et uridine, AUUUA, situées à l'extrémité 3' UTR de l'ARNm qui coopèrent avec de nombreux RBPs pour réguler au niveau post-transcriptionnel l'expression des gènes, tels que les cyclines, les facteurs de transcription, les suppresseurs de tumeurs et les oncogènes (Eberhardt *et al.*, 2007). La régulation de la traduction par les ARE-binding protein (ARE-BP) comprend deux groupes : ELAV family et NF90, responsables de la stabilité de l'ARNm et de la stimulation de la traduction. Parmi eux, TTP, TIAR, TIA1, AUF1, BRF1, KSRP sont impliqués dans la dégradation de l'ARNm et de la répression de la traduction (Garneau *et al.*, 2007).

g) Les sites des microARNs, miRNA response element (MRE) :

Les microARNs (miARNs) sont des oligonucléotides courts d'environ 22 nucléotides qui sont des régulateurs majeurs de l'expression génique et de la fonction au niveau post-transcriptionnel. Ils régulent plusieurs fonctions biologiques : développement, différenciation cellulaire, prolifération, apoptose et croissance tumorale (Bartel, 2009). Les miARNs sont

synthétisés dans le noyau par la transcription d'un précurseur appelé pri-miARN sous l'action de la polymérase II. Le clivage de ce pri-miARN par une endonucléase Drosha et son co-facteur Pasha abouti à la formation d'un pré-miARN. Celui-ci est transporté dans le cytoplasme par l'exportine 5, où il sera pris en charge par une ribonucléase, Dicer en interaction avec les protéines de la famille Argonaute (Ago) pour son processus de maturation. La molécule de miARN mature formée va s'incorporer dans le complexe « RNA-induced silencing complex (RISC) » qui va guider le miARN à l'ARN cible. Le mode d'action du miARN avec l'ARNm se fait par complémentarité de séquences selon deux mécanismes : lorsqu'il y a une complémentarité parfaite entre le microARN et l'ARNm, le complexe RISC déclenche l'action des ribonucléases responsables de cliver et de dégrader l'ARNm. Un autre mécanisme a lieu, lorsque la complémentarité est partielle, le miARN lié au 3' UTR de l'ARNm va inhiber la traduction en protéines (Gu *et al.*, 2009).

Les ARNm possèdent dans leur structure 3' UTR des séquences MRE correspondant à des sites de liaison pour les miARNs. Cette particularité de sites MRE sur l'ARNm fait d'eux des éléments agissant *in trans* de façon similaire aux RBPs. Les miRNAs et les RBPs utilisent des mécanismes similaires de régulation de l'ARNm avec une certaine compétition pour des sites de liaison (Cottrell *et al.*, 2018).

Les miARNs interfèrent avec la machinerie traductionnelle à différents niveaux pour inhiber la traduction. A l'étape d'initiation de la traduction, la protéine Ago2 se lie à la coiffe m⁷G par compétition avec eIF4E (Kiriakidou *et al.*, 2007). Aussi, le miARN, let-7 endogène réprime le processus de reconnaissance de la coiffe par un mécanisme encore inconnu (Mathonnet *et al.*, 2007).

2.1.2b Les principaux RBPs qui régulent la traduction

Les RBPs participent à plusieurs aspects du cycle de vie de l'ARN : la stabilité, la localisation et la traduction en apportant un autre type de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle (Harvey *et al.*, 2018).

a) « La-related protein 1 » (LARP1)

LARP1 est une protéine de liaison à l'ARNm possédant une expression principalement cytoplasmique. C'est une grande protéine de 150 kDa qui appartient à une famille de protéines très conservées qui partage le motif La « La motif » (LAM) se liant à l'ARNm. Le LAM se produit en tandem avec un domaine motif de reconnaissance de l'ARN « RNA recognition motif-like »

(RRM-L) dans la région centrale de la protéine, avec un domaine interagissant avec PABP, tandis que le C-terminal contient un domaine hautement conservé connu sous le nom de région DM15 ou domaine LARP1 (Bousquet-Antonelli & Deragon, 2009). LARP1 s'associe avec des ARNm contenant un motif d'oligopyrimidine en 5' terminal (5' TOP) d'une manière dépendante de mTORC1. Le rôle de LARP1 est encore controversé. Des études récentes ont décrit que LARP1 est impliquée dans le contrôle traductionnel des TOP mRNA et dans leur stabilité (Aoki *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2017; Philippe *et al.*, 2018; Tcherkezian *et al.*, 2014). LARP1 est recrutée à l'ARNm par des interactions avec des facteurs de traduction, y compris PABP et stimule à la fois la synthèse protéique générale et la traduction spécifique des ARNm contenant un 5' TOP (Tcherkezian *et al.*, 2014). Cependant, des travaux ultérieurs ont proposé que LARP1 reconnaît les extrémités 5' TOP des ARNm et réprime leur traduction (Fonseca *et al.*, 2015). Cette étude a montré que la déplétion de LARP1 avec un ARN interférent (RNAi) protégeait la traduction des ARNm 5' TOP suite à l'inhibition de mTORC1 avec la rapamycine et confirmait que LARP1 réprime la traduction des ARNm 5' TOP en compétition avec eIF4F pour la liaison à leur extrémité 5' (Fonseca *et al.*, 2015). Une analyse structurale récente de la région DM15 (domaine situé en C-terminal) de LARP1 a révélé que LARP1 se lie directement à la coiffe et au 5' TOP des ARNm empêchant à la fois l'accès d'eIF4E à la coiffe et l'assemblage d'eIF4F, confirmant ainsi le modèle précédent (Lahr *et al.*, 2017). Les protéines 4E-BP1/2 ont été liées au contrôle de la traduction des ARNm 5' TOP en aval de mTORC1 (Thoreen *et al.*, 2012) mais la contribution des 4E-BPs serait contestée. L'identité du facteur qui réprime la traduction des 5' TOP serait fort probable attribué à LARP1.

b) PTB/hnRNP1

« Poly pyrimidine tract binding protein » (PTB) est aussi connue sous le nom de « heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1 » (hnRNP1), une RBP ubiquitaire qui se lie aux éléments polypyrimidines (CU-rich elements). La PTB se lie spécifiquement à l'ARNm via quatre RRM. Cependant, les mutations qui affectent la liaison à l'ARNm et diminuent la fonction de PTB (Mickleburgh *et al.*, 2014). Des séquences de localisation situées dans le domaine N-terminale de la PTB permettent son transport dans le cytoplasme où elle va se lier à l'ARNm cellulaire mais aussi, à l'ARN viral (King *et al.*, 2014). Le rôle de la PTB est de réguler l'épissage, la localisation, la stabilité et la traduction de l'ARNm (Xue *et al.*, 2009).

c) Poly(A)-binding protein (PABP)

PABP appartient à une famille de RBPs bien conservée, impliquée dans divers processus de l'expression des gènes notamment la régulation de l'initiation de la traduction (Ivanov *et al.*, 2016). PABP se lie à la queue Poly(A) de l'ARNm dans le noyau via les domaines RRM situés en N-terminal. PABP est la première protéine identifiée qui protège la queue poly(A) de l'ARNm de la dégradation (Bernstein *et al.*, 1989). Cependant, PABP a d'autres rôles fondamentaux dont son impact dans l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. Elle interagit avec le complexe eIF4F par l'intermédiaire de la sous-unité eIF4G et augmente l'affinité de la liaison eIF4E et l'activité de l'hélicase eIF4A (Bi & Goss, 2000). L'interaction entre eIF4G et Poly(A) stabilise l'ARNm dans une conformation en boucle fermée ce qui améliore l'assemblage du PIC et le recyclage des ribosomes (Rajkowitsch *et al.*, 2004). PABP est régulée par deux protéines PABP-interacting protein 1 and 2 (Paip 1 et 2). La liaison de Paip1 à PABP améliore son affinité pour eIF4G tandis que Paip2 est un inhibiteur compétitif de l'interaction PABP-eIF4G (Martineau *et al.*, 2008) et pourrait inhiber l'interaction de PABP avec la queue Poly(A). De plus PABP favorise l'assemblage du complexe de terminaison de la traduction et la libération du peptide par son interaction avec eRF3a, assurant une reconnaissance fidèle du codon de terminaison (Ivanov *et al.*, 2016).

d) Cytoplasmic polyadenylation element-binding proteins (CPEB)

Les CPEBs sont une famille conservée de protéines regroupées en deux sous familles : CPEB1 et CPEB2-4. Elles possèdent toutes une région C-terminale qui contient des RRM, ces motifs constituent deux RRM en tandem, suivis d'un domaine de liaison au zinc (Afroz *et al.*, 2014). Toutes les CPEBs reconnaissent les mêmes ARNm contenant des CPE mais avec des affinités différentes (Ortiz-Zapater *et al.*, 2011). Une fois liée à l'ARNm, les CPEBs recrutent différents complexes protéiques qui stimulent ou inhibent l'élongation de la queue Poly(A) des ARNm contenant des CPE (Ivshina *et al.*, 2014). Ainsi les CPEBs peuvent agir comme des « switches » post-transcriptionnels régulant l'expression des gènes par la modification de la queue poly(A).

2.1.3 Régulation de la traduction de l'ARN par les « long non-coding RNAs »

Les longs ARN non codants (lncRNAs) sont une classe très diversifiée de molécules d'ARN d'une longueur de plus de 200 nucléotides qui ne codent pas pour les protéines. Ils sont

transcrits par la polymérase II, comme l'ARNm, ils possèdent à l'extrémité 5' une coiffe m⁷G et en 3' une queue poly (A), cependant, ils manquent une séquence codante. Les lncRNAs sont des régulateurs importants de l'expression des gènes. Ils sont localisés à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Bien qu'ils ne soient pas traduits en protéines, ce sont des molécules fonctionnelles (Marchese *et al.*, 2017). Les lncRNAs possèdent de nombreuses fonctions dans les processus cellulaires : l'empreinte génétique (Kanduri, 2016), la différenciation, le développement (Fatica & Bozzoni, 2014) et une réponse antivirale (Fortes & Morris, 2016).

Les lncRNAs agissent au niveau post-transcriptionnel comme des régulateurs de l'épissage, de la traduction de l'ARNm, de la stabilité de l'ARNm et interagissent avec les miARNs (Quinn & Chang, 2016). Une fonction globale des lncRNAs dans la répression de la traduction est leur interaction avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4A et avec la protéine de liaison PABP (Quinn & Chang, 2016). De plus, la dérégulation des lncRNAs est liée à différentes pathologies humaines incluant les cancers, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Wapinski & Chang, 2011).

2.1.4 Régulation de la traduction de l'ARN par le complexe « IFN- γ activated inhibitor of translation (GAIT)

Le complexe GAIT est un groupe de protéines qui agit ensemble pour inhiber de façon sélective la traduction. La formation de ce complexe hétérotétramérique est induite par l'interféron- γ (IFN- γ). Le complexe GAIT est constitué de : glutamyl-prolyl tRNA synthetase (EPRS), NS1-associated protein 1 (NSAP1), ribosomal protein L13a et glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Une fois formée, le complexe GAIT se lie au 3' UTR de l'ARNm par l'intermédiaire d'eIF4G pour empêcher le recrutement du complexe d'initiation 43S à la coiffe m⁷G (Figure 1.12). La répression d'un régulon post-transcriptionnel par le système GAIT pourrait contribuer à la résolution de l'inflammation chronique (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). L'étude d'une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, la céruloplasmine (Cp) dans des monocytes humains traités par IFN- γ a montré une induction transcriptionnelle de la Cp. Les investigations ont indiquées une présence abondante d'ARNm de Cp, mais les résultats indiquent une inhibition de la traduction. La synthèse protéique totale n'était pas altérée confirmant une inhibition sélective des transcrits (Mukhopadhyay *et al.*, 2009).

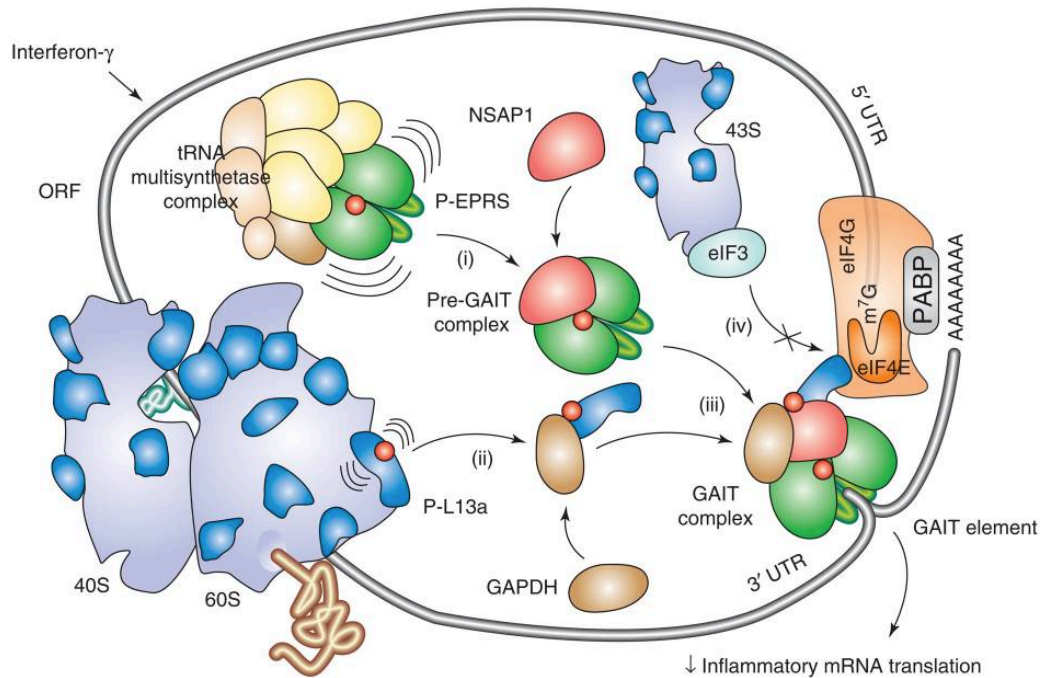


Figure 1.12 Régulation traductionnelle par le complexe GAIT.

Le traitement par l'IFN- γ déclenche le contrôle traductionnel dans lequel le GAIT module l'expression d'ARNm cibles. (i) l'IFN- γ induit la phosphorylation et la libération d'EPRS (vert) à partir du complexe d'ARNt multisynthétase (jaune), EPRS phosphorylé (P-EPRS) interagit avec NSAP1 (rouge clair) et forme le complexe pré-GAIT inactif. (ii) L13a phosphorylée et libérée de la sous-unité 60S du ribosome, P-L13a (bleu) se lie à GAPDH (brun) pour rejoindre le pré-GAIT et former le complexe fonctionnel GAIT. (iii) Le complexe GAIT se lie au 3' UTR des transcrits ciblés par l'interaction de PABP (gris) avec eIF4G (orange) et la queue Poly(A). P-L13a interagit avec eIF4G pour bloquer le recrutement d'eIF3 (bleu clair) et réprimer la traduction. eIF4E liée à la coiffe (orange foncé). (Mukhopadhyay *et al.*, 2009)

2.1.5 Régulation de l'élongation de la traduction

La majeure partie de la régulation de la traduction se produit à l'étape d'initiation mais elle peut être aussi contrôlée à l'étape de l'élongation. Cependant, les mécanismes de régulation de l'élongation, ainsi que leur impact sur les processus physiologiques, sont encore mal compris. Toutefois, l'élongation de la traduction peut être régulée par les voies mTOR et MAPK en réponse à de nombreux stimuli (Lopez-Pelaez *et al.*, 2012). Parmi ceux-ci, l'activation des TLRs dans les macrophages déficients en MAPK kinase kinase 8 (MAP3K8, également connue sous le nom de COT et TPL2) entraîne une phosphorylation réduite du facteur d'élongation eEF2K. Ceci suggère un rôle pour MAP3K8 dans la régulation de l'élongation de la traduction (Lopez-Pelaez *et al.*, 2012). Dans sa forme non phosphorylée, eEF2K agit comme un répresseur traductionnel en phosphorylant eEF2. L'activation des protéines MAPK p38 γ (également connue sous le nom MAPK12) et p38 δ (également connu sous le nom MAPK13) dans un modèle d'hépatite induite par LPS stimule l'activité eEF2 dans les macrophages (Gonzalez-Teran *et al.*, 2013). En conséquence, la traduction du TNF est régulée à la hausse, ce qui induit l'apoptose et la nécrose des cellules hépatiques.

2.2 Mécanismes dépendants de l'activité d'eIF4E

La protéine eIF4E représente un point central d'activation de l'initiation de la traduction. Son activité est régulée par son interaction avec les protéines de liaison tel que les 4E-BPs médiée par la voie mTORC1 et par sa phosphorylation sur la sérine 209 par la kinase MNK médiée par la voie MAPK (Fukunaga & Hunter, 1997; Muller *et al.*, 2013).

2.2.1 Axe MNK

L'activité d'eIF4E est régulée par la voie « MAPK-interacting protein kinases (MNKs) » MNK1 et MNK2, lesquelles phosphorylent l'unique résidu, la sérine 209 sur eIF4E (Fukunaga & Hunter, 1997) (Figure 1.13). MNK1 et MNK2 appartient à la famille des protéines sérine/thréonine kinases qui sont activées soit par ERK ou p38 MAPK en réponse aux facteurs extracellulaires (facteurs de croissance, stress) (Furic *et al.*, 2010; Joshi & Plataniias, 2015). Les protéines MNKs peuvent interagir avec le complexe eIF4F par la liaison à la partie C terminale d'eIF4G pour médier la phosphorylation d'eIF4E (Ueda *et al.*, 2004). La phosphorylation d'eIF4E semble être essentielle pour son activité oncogénique (Furic *et al.*, 2010). Par conséquent, la mutation du site de phosphorylation d'eIF4E a montré une diminution de son potentiel

oncogénique in vivo et in vitro comparé à la protéine de type sauvage (Topisirovic *et al.*, 2004; Wendel *et al.*, 2007). Les effets de la phosphorylation d'eIF4E sur la traduction coiffe-dépendante ne sont pas totalement bien compris. Plusieurs hypothèses ont été émises, que la phosphorylation d'eIF4E réduit son affinité pour la coiffe ce qui facilite la libération des facteurs d'initiation en les rendant disponible pour la traduction d'un nouvel ARNm. En conséquence, la phosphorylation d'eIF4E augmente la vitesse de dissociation du complexe 43S de la coiffe (Scheper *et al.*, 2002; Slepencov *et al.*, 2006). Selon les conditions expérimentales la phosphorylation d'eIF4E était montrée pour corrélérer avec un taux de traduction global augmenté (Walsh & Mohr, 2004) ou diminué (Naegele & Morley, 2004). Il a été reporté que la phosphorylation d'eIF4E affecte sélectivement un sous ensemble d'ARNm tel que *Mcl-1* (Wendel *et al.*, 2007) et également des ARNm codant des protéines qui jouent un rôle dans l'inflammation (*Ccl2*, *Ccl7*) et dans la progression des tumeurs (*Mmp3* et *Mmp9*) (Furic *et al.*, 2010). Récemment, de nouvelles données ont décrit que la phosphorylation d'eIF4E favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases à travers le contrôle traductionnel des ARNm *Snail* et *Mmp-3* (Robichaud *et al.*, 2015). De plus, le contrôle traductionnel dans le microenvironnement tumoral affecte la progression du cancer (Robichaud *et al.*, 2018a). Ces découvertes suggèrent que la phosphorylation d'eIF4E module la réponse inflammatoire et stimule la tumorigénèse par une régulation sélective d'ARNm qui code des protéines essentielles pour ces processus.

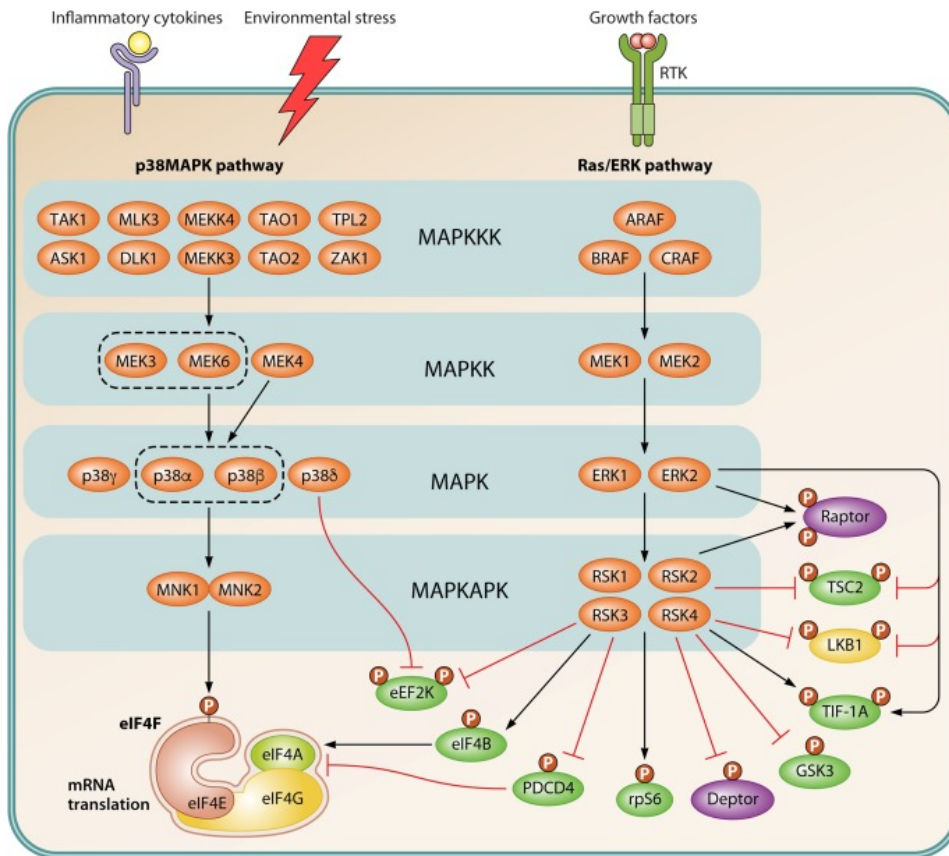


Figure 1.13 Voie de signalisation MAPK.

Les voies Ras/ERK (à droite) et p38MAPK (à gauche) sont activées par différents stimuli : cytokines inflammatoires, stress, facteurs de croissance. La signalisation Ras/ERK stimule l'activité de RSK et de MNK. MNK interagit avec eIF4G (jaune) et phosphoryle eIF4E (rouge), sur la sérine 209, un site qui augmente son potentiel oncogénique et facilite la traduction d'ARNm spécifiques. Après la stimulation de Ras/ERK, l'activation de RSK phosphoryle des régulateurs de la traduction (vert). (Roux & Topisirovic, 2018).

2.2.2 Axe mTORC1

« mammalian/mechanistic target of rapamycin » (mTOR) est une protéine de 289 kDa possédant une activité enzymatique sérine/thréonine kinase, elle fait partie de la famille des « Phosphatidylinositol-3 Kinase related-Kinases » (PIKK).

a) Découverte de mTOR :

Très conservée entre les espèces, mTOR a été découverte en 1994 comme étant la cible de la rapamycine chez les mammifères. La rapamycine est un antibiotique et antifongique de la famille des macrolides, elle a été isolée dans les années 1970 à partir d'un champignon *Streptomyces hygroscopicus* retrouvé dans le sol de l'île de Pâques. En plus de ces propriétés antifongiques, l'étude de la rapamycine a permis de lui attribuer d'autres propriétés : immunosuppressives, anti-prolifératives, anti-apoptotiques et de mettre en évidence dans la levure son interaction avec TOR puis avec mTOR chez les mammifères. La rapamycine se lie à la protéine « FK504-binding protein of 12kDa » (FKBP12), une petite protéine de la famille de FKBP qui forme un complexe avec la rapamycine, FKBP12/Rapamycine. L'étude des cibles de ce complexe a conduit à la découverte des gènes *tor1* et *tor2* (Heitman *et al.*, 1991). Le complexe FKBP12/rapamycine se lie au domaine « FKBP12-*rapamycin-binding domain* » (FRB) de la protéine mTOR et inhibe son activité catalytique (Soliman *et al.*, 2010). mTOR existe sous forme de deux complexes protéiques distincts dans leur fonction, leur structure protéique et leur mécanisme d'action, appelés mTORC1 et mTORC2 (Laplante & Sabatini, 2012; Wullschleger *et al.*, 2006). En plus de leur différence structurale et fonctionnelle, ces complexes n'ont pas la même sensibilité pour la rapamycine. mTORC1 est sensible à la rapamycine et intègre divers signaux de facteurs de croissance, du statut d'énergie, d'acides aminés, d'oxygène, de stress génotoxique pour réguler de nombreux processus cellulaires : la croissance cellulaire, la prolifération (Schmelzle & Hall, 2000). Tandis que mTORC2 est insensible à la rapamycine et contrôle l'organisation du cytosquelette et la survie cellulaire (Garcia-Martinez & Alessi, 2008; Guertin & Sabatini, 2007; Sarbassov *et al.*, 2005). La découverte de la rapamycine comme inhibiteur de mTORC1 a contribué fortement à l'avancement des connaissances sur le rôle de mTOR dans de nombreux processus cellulaires (Zoncu *et al.*, 2011) et son implication majeure dans l'initiation de la traduction en réponse aux nutriments (Hara *et al.*, 1998) mais également aux stimuli externes (Soliman, 2013; Van Der Kelen *et al.*, 2009). Des études ont montré que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine est incomplète, elle supprime efficacement la phosphorylation des protéines ribosomales S6 kinases (S6Ks) mais pas des 4E-BPs (Choo *et al.*, 2008).

b) Structure de mTOR :

mTOR est constituée de 2549 acides aminés et de plusieurs structures de domaines conservées. Les motifs répétés d'une vingtaine d'acides aminés sont présents dans quatre protéines « Huntingtin (H), elongation factor 3 (E), a subunit of protein phosphatase 2A (A), and TOR (T) » (HEAT). Ces répétitions HEAT créent une structure en superhélice qui facilite l'interaction protéine-protéine. En aval de la répétition HEAT, se trouve un domaine « FRAP, ATM, and TRRAP » (FAT) de 550 acides aminés qui aurait un rôle de structure d'échaffaudage ou de liaison protéique (Keith & Schreiber, 1995). Le domaine FAT est suivi d'un domaine de liaison « FKBP12-Rapamycin ». Un domaine catalytique de kinase « kinase domain » (KD), un domaine auto-inhibiteur ou répresseur « repressor domain » (RD) et un domaine « carboxy-terminal FAT » (FATC). Le domaine FATC est essentiel pour l'activité kinase de mTOR (Figure 1.14).

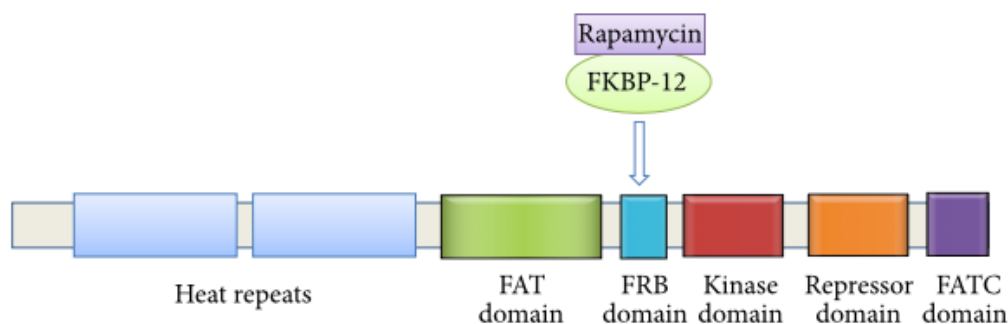


Figure 1.14 Structure des domaines de mTOR.

Heat repeats structure qui facilite l'interaction protéique. FAT région en aval des Heat repeats suivi du domaine FRB de liaison du complexe rapamycine/FKBP-12. Le FRB est suivi par le domaine catalytique kinase, un domaine répresseur et le domaine FATC essentiel pour l'activité kinase de mTOR. (Showkat et al., 2014)

mTOR interagit avec différentes protéines et forme deux complexes multiprotéiques qui sont structurellement et fonctionnellement distincts : les complexes mTORC1 et mTORC2. Ils sont différents dans leur composition en protéines, leurs sensibilités à la rapamycine, leurs signaux en amont et leurs substrats (Laplante & Sabatini, 2009) (Figure 1.15)

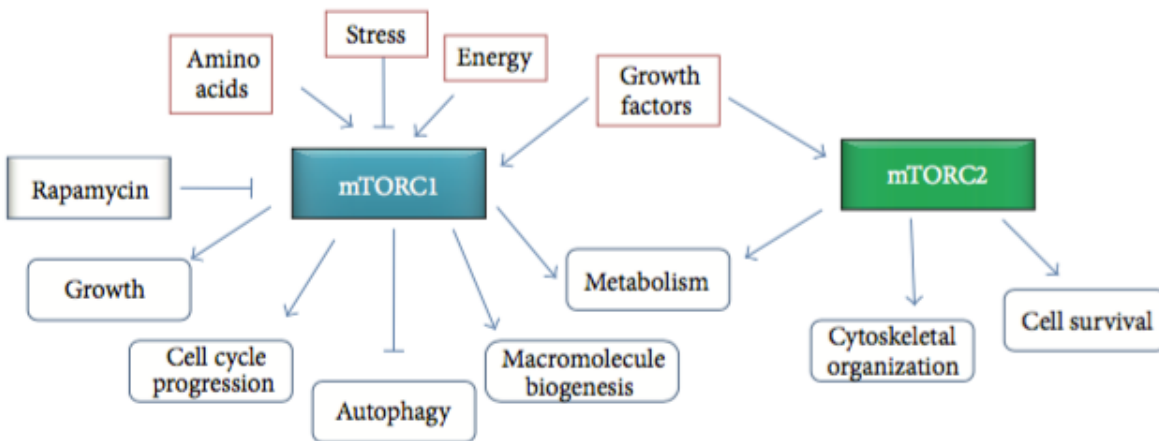


Figure 1.15 Complexes mTORC1 et mTORC2, différentes fonctions cellulaires (Showkat *et al.*, 2014)

Le complexe mTORC1 est actif à l'intérieur d'un complexe multiprotéique composé d'une protéine d'échaffaudage Raptor (regulatory-associated protein of TOR), d'une GTPase β -subunit like protein g β L connue sous le nom mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8), de PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 KDa) et de Deptor (disheveled, Egl-10, pleckstrin DEP domain containing mTOR interacting protein) (Guertin & Sabatini, 2007) (Figure 1.16, gauche).

Le complexe mTORC2 se distingue de mTORC1 par les protéines «Rapamycin-insensitive companion of mTOR» (Rictor), «mammalian Stress-activated protein kinase, (SAPK) interacting protein 1» (mSIN1) et «Protein observed with Rictor» (Protor). mLST8, Deptor et PRAS40 sont également présentes sur mTORC1 (Figure 1.16, droite).



Figure 1.16 Complexes mTORC1 et mTORC2, différents partenaires d'interaction.

mTORC1 est composé de mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 et Deptor. mTORC2 est composé de mTOR, Rictor lié à Protor, mLST8, mSin1 et Deptor (Showkat *et al.*, 2014).

c) Description du complexe mTORC1 :

Raptor est une protéine de 150 kDa constitutivement liée à mTORC1. Elle contient un domaine N-terminal hautement conservé suivi de trois répétitions HEAT et sept répétitions WD40. Raptor fonctionne comme une protéine d'échaffaudage de mTORC1 pour faciliter la phosphorylation des effecteurs en aval S6K1 et 4E-BP1. Elle joue un rôle important dans la régulation de l'activité de mTORC1 en réponse à l'insuline, aux nutriments et aux niveaux d'énergie (Kim *et al.*, 2002). mTORC1 est régulée par le statut de phosphorylation de Raptor : la phosphorylation des sérines 722/792 de Raptor médiée par AMPK est nécessaire pour l'inhibition de mTORC1 et l'arrêt du cycle cellulaire induit par le stress d'énergie (Gwinn *et al.*, 2008). Alors que la phosphorylation de Raptor sur les sérines 719/721/722 médiée par RSK est essentielle pour l'activation de mTORC1 par la stimulation des mitogènes (Carriere *et al.*, 2008).

mLST8 est une petite sous-unité protéique de 36 kDa de mTORC1 et mTORC2 qui se lie au domaine kinase de mTOR pour réguler positivement son activité kinase (Kim *et al.*, 2003). Le mécanisme par lequel mLST8 exerce sa fonction dans le complexe mTORC1 reste encore à élucider. Selon des études de cristallographie, mLST8 assurerait la stabilité du domaine kinase de mTORC1 dans une conformation active (Yang *et al.*, 2013).

PRAS40 est également une petite sous-unité de 28 kDa de mTORC1, elle régule négativement la fonction de mTORC1. Elle a été décrite comme étant un substrat d'Akt qui sous l'activation de l'insuline phosphoryle PRAS40 sur la thréonine 246. PRAS40 s'associe à mTORC1 par l'intermédiaire de Raptor pour inhiber l'activité de mTORC1. La phosphorylation de PRAS40 par Akt conduit à son inhibition et sa dissociation du complexe mTORC1 (Sancak *et al.*, 2007).

Deptor est une protéine de liaison de mTOR de 48 kDa qui inhibe les fonctions de mTORC1 et mTORC2. La surexpression de Deptor diminue l'activité de mTORC1 et mTORC2 (Peterson *et al.*, 2009).

d) Régulation de la voie mTORC1

mTORC1 est activée en réponse à différents stimuli extracellulaires : facteurs de croissance, cytokines, acides aminés, stress, récepteur d'antigènes, hormones, nutriments, oxygène, statut d'énergie (Fingar & Blenis, 2004) qui déclenchent une cascade de signalisation

en amont de mTORC1 dont la fonction est de réguler la croissance, la prolifération et la survie cellulaire (Figure 1.17).

L'activation des récepteurs tyrosine kinases (RTK) par les hormones ou les facteurs de croissance tel que l'insuline/IRS ou «insulin-like growth factor 1 » (IGF/IGFR) phosphorylent des protéines d'échaffaudages par exemple « GTPase-activating proteins » (GAP) qui déclenchent l'activation des voies de transduction du signal comme la « Phosphoinositide 3-kinase » (PI3K). La PI3K activée va convertir la phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP₃). Cette voie est régulée négativement par la phosphatase et suppresseur de tumeur «Phosphatase and Tensin homolog » (PTEN). PIP₃ se lie au domaine «pleckstrin homology domains » (PH) d'Akt et de «Phosphatidylinositide-dependent protein kinase 1 » (PDK1) entraînant leur recrutement à la membrane plasmique. La sérine/thréonine kinase PDK1 phosphoryle Akt sur la thréonine 308 (Engelman *et al.*, 2006).

La protéine d'échaffaudage, hamartine (TSC1) et la protéine tubérine possédant une activité GAP (TSC2) sont des suppresseurs de tumeurs codées par les gènes «tuberous sclerosis complex » (*tsc1* et *tsc2*). Elles forment un complexe TSC1/TSC2 et la phosphorylation de TSC2 par Akt conduit à son inhibition et à la libération de Rheb (Ras homolog enriched in brain). Rheb est une petite GTPase qui active mTORC1 (Dan *et al.*, 2014). La protéine Rheb est active sous la forme Rheb-GTP et peut activer mTORC1. L'hydrolyse du GTP par le complexe TSC1/TSC2 inactive Rheb sous la forme Rheb-GDP qui bloque l'activation de mTORC1 (Manning *et al.*, 2002).

mTORC1 peut être aussi activée indépendamment du complexe TSC1/TSC2 par Akt. La phosphorylation de la protéine PRAS40 par Akt bloque l'inhibition de mTORC1 et stabilise l'interaction mTORC1-Raptor (Sancak *et al.*, 2007). L'activation de mTORC1 conduit alors à la phosphorylation de S6K et des 4E-BPs qui régulent la traduction (Mamane *et al.*, 2006).

La prolifération et la croissance cellulaire sont régulées par mTORC1 selon la disponibilité des nutriments et l'équilibre énergétique. Les acides aminés sont indispensables à l'activation de mTORC1 (Hara *et al.*, 1998). En réponse aux acides aminés, un ensemble de protéines «Ras-related GTP-binding protein (Rag GTPases)» recrutent mTORC1 à la membrane lysosomale par leurs interactions avec Raptor (Sancak *et al.*, 2008). La localisation de mTORC1 à la membrane lysosomale va faciliter l'interaction entre mTORC1 et Rheb qui induit son activation (Sancak *et al.*, 2008). Les protéines Rag sont des hétérodimères RagA ou RagB liées à RagC ou RagD, et leur activité est régulée par un complexe appelé Ragulator. De plus, la

protéine adaptatrice p62 interagit avec Raptor pour favoriser l'interaction entre mTORC1 et les Rag GTPases et permettre ainsi sa translocation au lysosome (Duran *et al.*, 2011).

mTORC1 régule également le statut d'énergie dans la cellule en contrôlant le flux de glucose. Lorsque le taux de glucose diminue, en parallèle le taux d'ATP cellulaire diminue entraînant l'inhibition de mTORC1. Les changements dans l'équilibre énergétique cellulaire ont un impact sur la signalisation de mTORC1 à travers la sérine/thréonine kinase, «AMP-activated protein kinase (AMPK)» qui comprend une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ (Kahn *et al.*, 2005; Shaw, 2009). La manque de nutriments ou une anomalie des mitochondries affectent le ratio AMP/ATP intracellulaire qui active l'AMPK. L'AMP ou l'ADP s'associent à la sous-unité γ de l'AMPK, qui stimule la phosphorylation de la sous-unité α sur la thréonine 172 par la sérine/thréonine kinase 11 (STK11/LKB1) (Liver kinase B1) (Shaw, 2009). Suite à son activation, l'AMPK supprime la synthèse des protéines et limite la prolifération et la croissance via l'inhibition de mTORC1 en phosphorylant TSC2 et Raptor ce qui entraîne la séquestration des protéines 14-3-3 (Gwinn *et al.*, 2008). La voie AMPK/mTORC1 régule l'équilibre énergétique et la prolifération cellulaire. mTORC1 est aussi inhibée dans les conditions d'hypoxie par l'intermédiaire de la protéine «Regulated in Development and DNA damage response 1 (REDD1)». L'augmentation de l'expression de la protéine REDD1 conduit à sa liaison aux protéines 14.3.3 en bloquant ainsi la phosphorylation de TSC2 ce qui inhibe le complexe TCS1/TCS2 (DeYoung *et al.*, 2008).

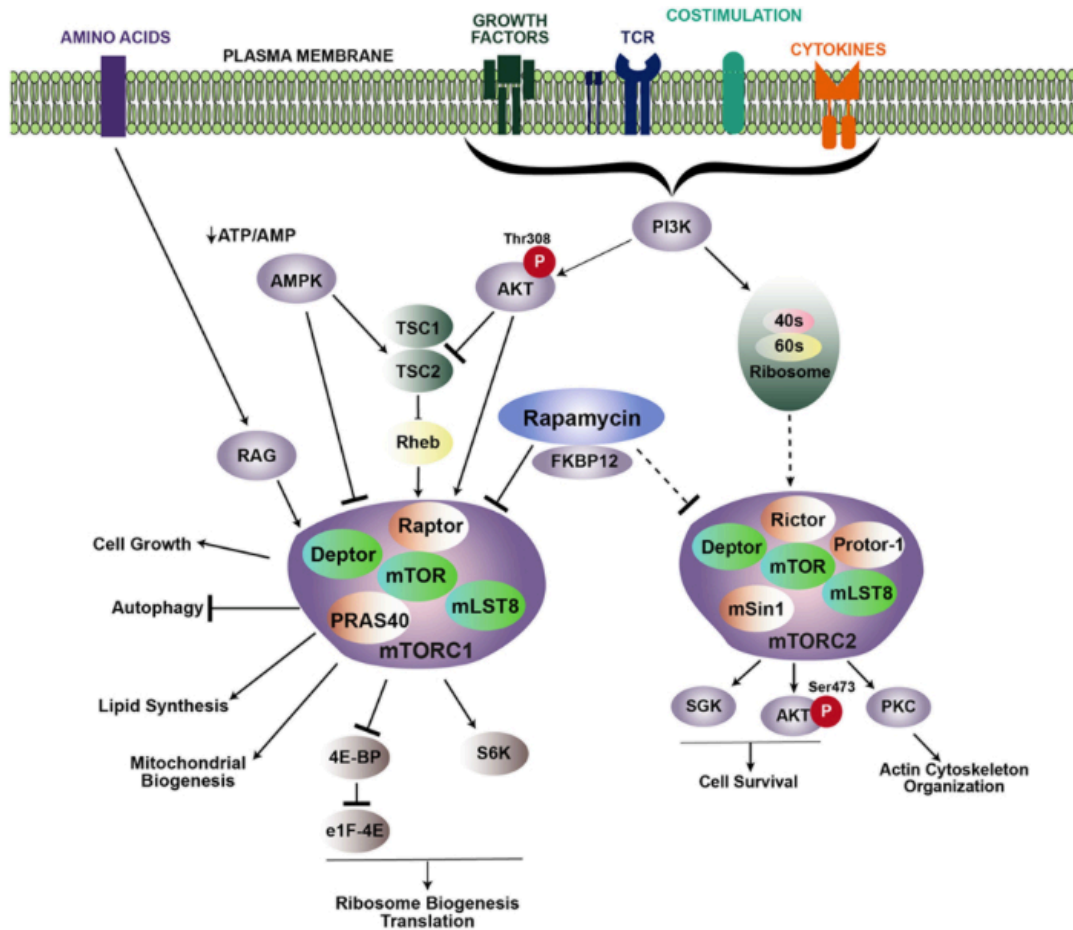


Figure 1.17 Les complexes mTORC1 et mTORC2, cascades de signalisation.

Les stimuli externes activent la PI3K, lequel recrute Akt à la membrane. La phosphorylation Akt sur sa thréonine 308 conduit à l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 qui libère Rheb pour activer mTORC1. Le complexe rapamycine/FKBP12 inhibe mTORC1. La régulation en amont de mTORC2 est moins bien connue, l'association avec les ribosomes active mTORC2. mTORC2 est insensible à la rapamycine mais un traitement prolongé peut réduire son activité. L'activation de mTORC1 entraîne l'inhibition de 4E-BP et l'activation de S6K. Les flèches représentent l'activation et les barres l'inhibition. Les lignes discontinues indiquent que le mécanisme exact est inconnu (Keating & McGargill, 2016).

e) Régulation de la machinerie traductionnelle par mTORC1

mTORC1 régule la synthèse des protéines globale et spécifique via deux principaux effecteurs : S6K et 4E-BPs, les plus étudiées et impliquées dans la régulation traductionnelle (Hay & Sonenberg, 2004). Les protéines 4E-BPs seront discutées dans la section 3).

f) Régulation de la traduction par S6K

Chez les mammifères, les sérine/théonine kinases S6Ks sont au nombre de deux S6K1 et S6K2. Elles appartiennent à la famille des kinases AGC « protein kinase A, G and C families »

(PKA, PKG, PKC) et leur activation est régulée par PDK1 et mTORC1 (Fenton & Gout, 2011). S6K1 et S6K2 partagent 70% d'homologie (Fenton & Gout, 2011), cependant, la mieux caractérisée est S6K1. L'activité de S6K1 est régulée par phosphorylations séquentielles sur plusieurs sites sérine/thréonine. S6K1 est activée par mTORC1 qui phosphoryle la thréonine 389 située dans le motif hydrophobique (HM) (Pullen *et al.*, 1998) suivi par la phosphorylation de la thréonine 229 par PDK1 qui renforce l'activation de S6K1. Suite à un traitement à la rapamycine, la phosphorylation de la thréonine 229 est perdue tout comme celle de la thréonine 389 alors que PDK1 est insensible à la rapamycine. Ces données suggèrent que la phosphorylation de thréonine 229 est dépendante de celle de la thréonine 389 (Keshwani *et al.*, 2011).

S6K1 contient dans son N-terminal un motif conservé appelé «TOR signaling (TOS)» qui interagit avec Raptor et permet à mTORC1 d'induire la phosphorylation de S6K1 (Schalm & Blenis, 2002). Le domaine C-terminal de S6K1 porte un motif RSPRR qui confère un rôle inhibiteur à cette région, dans laquelle se lie un régulateur négatif de S6K1 (Schalm *et al.*, 2005). Une mutation de la région C-terminale de S6K1 conduit à sa phosphorylation par mTORC2 (Ali & Sabatini, 2005).

S6K1 est activée par une grande variété de signaux extracellulaires et possède de nombreux substrats impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire, l'épissage, la transcription, la survie cellulaire et la synthèse des protéines (Figure 1.18). Parmi ces substrats, le premier à avoir été identifié et aussi le plus connu est la protéine ribosomale S6 (rpS6) une sous-unité du ribosome 40S qui a un rôle clé dans la croissance cellulaire et la prolifération (Montagne *et al.*, 1999; Radimerski *et al.*, 2002). Suite à l'activation de S6K1 par mTORC1, S6 est activée par S6K1 sur cinq sites de sérines en C-terminal dans un ordre séquentielle : S236 > S235 > S240 > S244 > S247 (Meyuhas, 2008).

En plus de mTORC1, S6K1 peut être phosphorylée par une autre voie de signalisation, la voie «mitogen-activated protein kinase » (MAPK). La MAPK induit la phosphorylation de S6K1 sur le domaine auto-inhibiteur C-terminal, en contrôlant ainsi son activation (Dufner & Thomas, 1999).

Une fonction importante de S6K1 est la régulation de l'initiation de traduction par la phosphorylation d'un composant du complexe de liaison à la coiffe, sur la sérine 422, eIF4B (Raught *et al.*, 2004). S6K1 régule également l'initiation de la traduction en phosphorylant PDCD4, un suppresseur de tumeur qui est un régulateur négatif eIF4A et induit sa dégradation par une ubiquitine ligase, β TRCP (Dorrello *et al.*, 2006). S6K1 contrôle l'étape d'élongation de la

traduction, il inactive «eukaryotic elongation factor-2 (eEF2) kinase (eEF2K)» lui-même étant un régulateur négatif d'eEF2 en phosphorylant sa sérine 366 (Wang *et al.*, 2001). eIF4B est aussi phosphorylée par S6K1 pour stimuler le recrutement de eIF4B à eIF4A en augmentant ainsi son activité (Holz *et al.*, 2005).

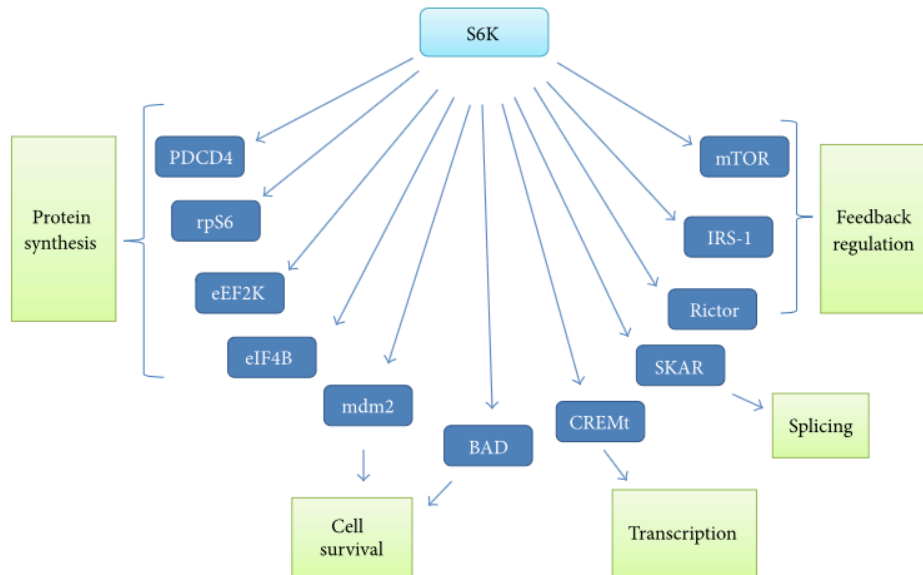


Figure 1.18 Substrats et fonctions de S6K.

La kinase S6K contrôle l'activité des différents substrats (en bleu) impliqués dans divers aspects du métabolisme cellulaire (en vert) (Showkat *et al.*, 2014).

3. LE CONTRÔLE TRADUCTIONNEL VIA LES PROTÉINES 4E-BPs

3.1 Les protéines 4E-BPs

Chez les mammifères, la famille des protéines 4E-BPs est constituée de 3 protéines, 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3. Elles sont codées par des gènes différents et présentent un haut degré d'homologie (Fonseca *et al.*, 2014; Pause *et al.*, 1994; Poulin *et al.*, 1998).

La mieux caractérisée est 4EBP1, elle est la plus abondante dans les tissus impliqués dans l'homéostasie du glucose et des lipides, y compris le tissu adipeux, le pancréas, le muscle et le foie (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 2001). Le gène *4e-bp1* localisé sur le chromosome humain 8p12, comprend trois exons et code pour une polyprotéine de 118 acides aminés qui est identique à 56% à 4E-BP2 (Pause *et al.*, 1994). La protéine PHAS-I retrouvée phosphorylée en réponse aux facteurs de croissance et aux esters de phorbol chez le rat, est identique à 93% à son homologue humain, 4E-BP1 (Pause *et al.*, 1994). Tandis que 4E-BP2, exprimée de façon ubiquitaire (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1996) est plus abondante dans le cerveau et les lymphocytes (So *et al.*, 2016). Contrairement à 4E-BP1 et 4E-BP2, 4E-BP3 est plus faiblement exprimée dans la plupart des tissus (So *et al.*, 2016; Tsukumo *et al.*, 2016a; Tsukumo *et al.*, 2016b). La protéine de 100 acides aminés partage 57% et 59% d'identité avec 4E-BP1 et 4E-BP2, respectivement. Le gène *4e-bp3* contient 3 exons, s'étend sur 1,9 kb et est localisé sur le chromosome 5q31.3 (Poulin *et al.*, 2003).

Les protéines 4E-BPs sont de faibles poids moléculaire, environ 20 kDa. Leur principale fonction est d'inhiber l'initiation de la traduction coiffe-dépendante par leur liaison à eIF4E, inactivant ainsi son rôle d'initiateur de la traduction (Showkat *et al.*, 2014; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Elles sont souvent décrites comme étant les principaux répresseurs traductionnels. Bien qu'elles exercent les mêmes fonctions, elles présentent des caractéristiques différentes dans leur structure.

3.1.1 Structure des 4E-BPs

La structure des 4E-BPs contient trois domaines nécessaires pour leur interaction protéique (Figure 1.19). 4E-BPs se lie à eIF4E par un motif d'acides aminés qui est conservé entre les trois protéines et identifié (YxxxxLΦ). Deux autres motifs régulateurs retrouvés chez 4E-BP1/2, à l'extrémité N-terminale, un motif RAIP (Arg13, Ala14, Ile15 et Pro16) et à l'extrémité C-terminale un motif « TOR signaling » (TOS). Le motif TOS est présent sur PRAS40 et dans la

structure de d'autres substrats de mTOR comme S6K1 (Wang *et al.*, 2009). Le motif TOS est requis pour l'interaction des 4E-BPs avec Raptor. Le motif RAIP est impliqué dans la phosphorylation des résidus situés en N-et C-terminal (Musa *et al.*, 2016; Showkat *et al.*, 2014).

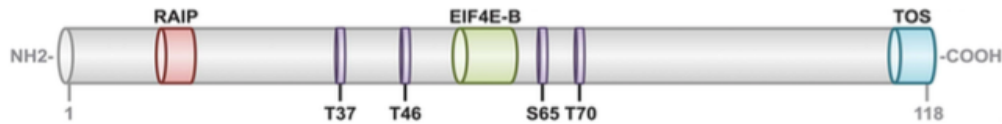


Figure 1.19 Structure et sites de phosphorylation de 4E-BP1.

4E-BP1 contient trois motifs : le site de liaison à eIF4E (YxxxxLΦ), en N-terminal le motif RAIP, en C-terminal le motif TOS. La phosphorylation de 4E-BP1 dépend de mTORC1 qui agit de façon hiérarchique T37 et T46 suivi de T70, S65 (Musa *et al.*, 2016).

3.1.2 Principaux mécanismes de régulation de l'expression des 4E-BPs

La transcription

Un mécanisme de régulation de l'expression de 4E-BP1 est sa transcription. La surexpression de 4E-BP1 dans plusieurs cancers est considérée comme un mauvais pronostic (Karlsson *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs de transcription régulent positivement 4E-BP1. C'est le cas de ATF4 qui en réponse au stress cellulaire active la transcription de 4E-BP1 (Yamaguchi *et al.*, 2008), également, Smad4 agit en réponse au TGFβ (Azar *et al.*, 2009). Cependant, l'activité des kinases PI3K et MAPK régulent négativement la transcription de 4E-BP1 via le facteur de transcription Erg-1 (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2003).

De plus, dans les cellules cancéreuses humaines, la transcription de 4E-BP3 est fortement induite ainsi que le niveau protéique après une inhibition prolongée de mTORC1 (Tsukumo *et al.*, 2016a). Contrairement aux protéines 4E-BP1/2 qui sont diminuées ou dégradées lors des traitements inhibiteurs de mTOR, 4E-BP3 est exprimée à de faibles niveaux dans les cellules mais fortement augmenté après l'inhibition de mTORC1 (Alain *et al.*, 2012b; Tsukumo *et al.*, 2016a). Une étude a montré que l'induction de 4E-BP3 est médiée par le facteur de transcription « Microphthalmia-associated transcription factor (TFE3) » qui est activé lors de l'inhibition de mTORC1 (Tsukumo *et al.*, 2016a). Le facteur de transcription TFE3 active la transcription de 4E-BP3 à travers la liaison d'éléments *cis* dans le promoteur d'*EIF4EBP3*. En conséquence, 4E-BP3 devient un important répresseur traductionnel à la phase tardive de l'inhibition de mTORC1. Cette régulation successive de 4E-BPs peut représenter une importante

fonction régulatrice pour un contrôle traductionnel rigoureux d'un ensemble d'ARNm lors d'une inhibition prolongée de mTORC1 (Tsukumo *et al.*, 2016b).

La phosphorylation

Les principaux sites de phosphorylation des 4E-BPs ont été identifiés dans la protéine 4E-BP1. Ils sont au nombre de sept : T37, T46, S65, T70, S83, S101, S112 chez l'humain et cinq T37, T46, S65, T70, S83 chez les rongeurs, ces derniers étant conservés entre les espèces (Martineau *et al.*, 2013). Cependant la capacité de 4E-BP1 à lier et inhiber eIF4E est régulée par la phosphorylation de quatre résidus : T37, T46, S65, T70. Ces résidus sont phosphorylés de façon hiérarchique, T37 et T46 suivis de T70 (Gingras *et al.*, 2001a). S101 est nécessaire pour la phosphorylation de S65 et S112 affecte la liaison à eIF4E sans interagir avec la phosphorylation des autres sites. S83 ne semble pas affecter l'initiation de la traduction (Martineau *et al.*, 2013). Les fonctions et la régulation de ces sites restent encore à explorer (Martineau *et al.*, 2013).

Des études ont montré que d'autres kinases phosphorylent 4E-BP1 de façon dépendante ou indépendante de mTOR (She *et al.*, 2010; Sikalidis *et al.*, 2013). Parmi ces kinases, GSK3 β a été décrit pour phosphoryler les résidus T37, T46 et diminue l'association de 4E-BP1 à eIF4E. GSK3 β phosphorylerait également les sites S65, T70 dans certaines cellules cancéreuses (Shin *et al.*, 2014). La MAPK p38 augmente la phosphorylation de 4E-BP1 lors de plusieurs stress cellulaire : infection virale, choc osmotique, radiation ultra-violet (UV) et dans l'apoptose induite par l'association TNF α /cycloheximide (CHX) (Janzen *et al.*, 2011; Walsh & Mohr, 2004). ERK phosphoryle 4E-BP1 sur la S65 et bloque TSC2, ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'activité de mTOR et donc le blocage de la phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR (Braunstein *et al.*, 2009). La résistance de la phosphorylation de 4E-BP1 à la rapamycine serait due à la kinase PIM qui via PIM2 active 4E-BP1 sur le site S65 ou régule l'activité de phosphatase spécifiques (Chen *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2003; Tamburini *et al.*, 2009). cdc2/«cyclin-dependent kinase» (CDK1) peut phosphoryler 4E-BP1 sur le site T70 dans les cellules HeLa (Heesom *et al.*, 2001). « Leucin-rich repeat kinase 2 » (LRRK2) affecte 4E-BP1 sur les sites T37/T46 (Saitoh *et al.*, 2002). Une autre kinase, la protéine «Ataxia Telangiectasia Mutated» (ATM) phosphoryle 4E-BP1 sur la S111 *in vitro*. De façon dépendante de ATM, le traitement à l'insuline *in vivo* inactive 4E-BP1 sur le S112 (Yang & Kastan, 2000). De plus, mTORC2 est une kinase qui pourrait phosphoryler 4E-BP1 (Laplante & Sabatini, 2012).

L'Ubiquitination

4E-BP lié à eIF4E est protégée de l'ubiquitination. Cependant, lorsque le niveau d'eIF4E est faible, 4E-BP non phosphorylée n'est plus protégée de l'ubiquitination par l'ubiquitine ligase E3, CUL3-KLHL25, et s'en suit la dégradation par le protéasome (Yanagiya *et al.*, 2012). Une étude précédente a montré que la forme phosphorylée de 4E-BP est ubiquitinée (Elia *et al.*, 2008). Ces auteurs ont observé une augmentation dans l'accumulation de 4E-BP hypophosphorylée par un inhibiteur du protéasome, MG132 et ont conclu que le traitement par MG132 cause la déphosphorylation de 4E-BP (Elia *et al.*, 2008). Ainsi, les taux de 4E-BP sont régulés par ubiquitination.

3.2 Mécanisme de régulation du complexe eIF4F via 4E-BP1/2

Les protéines 4E-BPs empêchent l'assemblage du complexe eIF4F par compétition avec eIF4G pour la liaison à eIF4E (Pause *et al.*, 1994). Lorsque mTORC1 est activée, elle phosphoryle les résidus thréonine 37 et thréonine 46 des 4E-BPs qui agissent comme des sites primant la phosphorylation de la sérine 65 et de la thréonine 70 (Gingras *et al.*, 2001b). La phosphorylation de 4E-BPs sur tous ces résidus entraîne leur dissociation d'eIF4E et permettent ensuite l'assemblage du complexe eIF4EF sur l'extrémité 5' UTR de l'ARNm pour commencer l'initiation de la traduction via l'axe mTORC1/4E-BP/eIF4E (Figure 1.20).

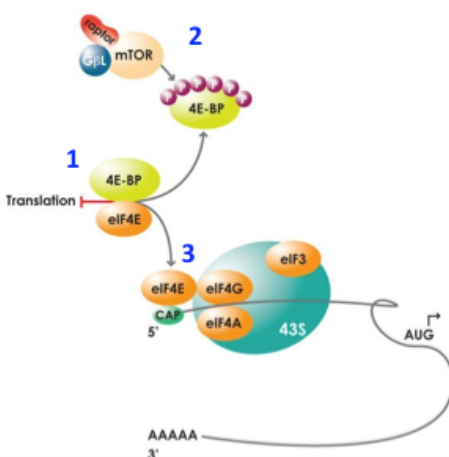


Figure 1.20 Inhibition du complexe eIF4F (43S) via 4E-BP1/2.

1)-Inhibition de l'initiation de la traduction par 4E-BPs. 2)-L'activation de la voie PI3K/Akt par différents stimuli active mTORC1 qui phosphoryle 4E-BPs sur tous ses résidus (Thr³⁷, Thr⁴⁶, Ser⁶⁵, Thr⁷⁰, Ser⁸³, Ser¹¹²). L'inactivation de 4E-BPs libère eIF4E. 3)-La liaison d'eIF4E à la coiffe permet le recrutement du complexe eIF4F à l'ARNm via l'interaction eIF4E-eIF4G pour déclencher l'initiation de la traduction (May, O. 2008).

Le mécanisme par lequel les protéines 4E-BP1/2 régulent l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe est la liaison à eIF4E. 4E-BPs possèdent des séquences en C-terminale du motif canonique qui contribuent à leur interaction avec eIF4E. Bien que les motifs non canoniques des 4E-BP1/2 ne soient pas conservés, elles se lient à la surface latérale hydrophobe conservée d'eIF4E et sont indispensables pour que les 4E-BP1/2 entrent en compétition avec eIF4G pour la surface dorsale d'eIF4E et réprimer la traduction (Figure 1.21). Cette interaction de 4E-BP1/2 avec eIF4E est une cible thérapeutique majeure pour inhiber la traduction (Gruner *et al.*, 2016).

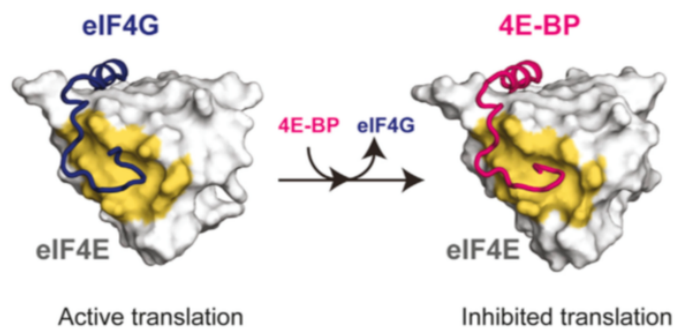


Figure 1.21 Structure cristallographique d'eIF4E-eIF4G et eIF4E-4E-BP.

Les structures cristallographiques du complexe eIF4E-eIF4G révèlent un contact latéral sur eIF4E. eIF4G et 4E-BP présentent une similitude de contacts latéraux sur eIF4E. Une liaison latérale plus forte de 4E-BP l'aide à déplacer eIF4G d'eIF4E. Modèle structural pour la conception d'inhibiteurs comme outils thérapeutiques (Gruner *et al.*, 2016).

3.3 Le rôle des protéines 4E-BP1/2 dans l'expression des gènes

Les protéines 4E-BP1/2 inhibent l'efficacité traductionnelle d'ARNm spécifiques et jouent un rôle important dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. En condition physiologique, la voie mTOR-4E-BP1/2 contrôle l'homéostasie de l'énergie cellulaire à travers la traduction de gènes mitochondriaux (*ATP5O*, *ATP5D*) impliqués dans la production d'ATP (Morita *et al.*, 2013). Ainsi 4E-BPs régulent la biogénèse et l'activité mitochondriale. De façon ciblée, l'axe mTORC1-4E-BP1/2 privilégie la traduction d'ARNm ayant une structure 5' UTR particulière leur conférant une certaine sensibilité à eIF4E. Ces gènes sont impliqués dans la prolifération et la survie (*CCND3*, *MCL1*, *BIRC5* et *BCL2*) (Gandin *et al.*, 2016).

Parmi ces sous-ensembles d'ARNm, on trouve des transcrits contenant des 5' UTR relativement longs et structurés, appelés ARNm « sensibles à eIF4E » et « sensibles à eIF4A » (Alain *et al.*, 2012b). Ces ARNm codent pour des protéines impliquées dans la survie et dans la prolifération cellulaire (cyclines, VEGF, Myc) (Kevil *et al.*, 1996; Rosenwald *et al.*, 1995; Zimmer *et al.*, 2000). Contrairement aux ARNm appelés gènes de ménages, qui ne possèdent généralement pas de 5' UTR structurés (par exemple, GAPDH et β -actine), la majorité des ARNm sensibles à eIF4E ont une structure qui les rend plus dépendants de l'activité de déroulement d'eIF4A dans le complexe eIF4F et donc très sensible aux niveaux d'eIF4E dans la cellule (Svitkin *et al.*, 2001). L'activité d'eIF4A en se liant à un domaine auto-inhibiteur d'eIF4G, fournit des moyens supplémentaires par lesquels eIF4E stimule sélectivement la traduction des ARNm hautement structurés (Feoktistova *et al.*, 2013). Un deuxième sous-ensemble d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans la fonction mitochondriale et la biogénèse (Morita *et al.*, 2013) mais ceux-ci n'ont pas de longs 5' UTR mais un 5' UTR très court inférieur à 30 nucléotides contenant un élément initiateur de la traduction appelé, « translation initiator of short 5' UTR » (TISU). Les ARNm possédant un 5' UTR court et un élément TISU sont dits « insensibles à eIF4A » (Gandin *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2017a; Sinvani *et al.*, 2015). L'ensemble de ces données montre le rôle crucial des protéines 4E-BP1/2 dans la régulation des mécanismes cellulaires.

3.4 Le contrôle traductionnel de la réponse immunitaire par les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2

Pour maintenir l'homéostasie cellulaire, le contrôle traductionnel offre à l'organisme la possibilité de répondre rapidement contre les agents étrangers et fournit une réponse ciblée et contrôlée en fonction des stimuli. En effet, la machinerie traductionnelle et ses régulateurs contrôlent la traduction des ARNm à travers plusieurs et indépendantes voies de signalisation qui agissent ensemble pour réguler les différents composants de la réponse immunitaire de l'hôte. Normalement, l'activation des mécanismes traductionnelles par la réponse immunitaire devrait aboutir très vite à la résolution d'une infection. Mais malheureusement, les agents pathogènes ont développé des stratégies pour interférer avec la machinerie traductionnelle de l'hôte et l'utiliser à leur avantage. Non seulement, les pathogènes sont capables de détourner la machinerie traductionnelle de l'hôte pour traduire leurs propres ARNm mais ils compétitionnent également avec les défenses de l'hôte pour inactiver la traduction de la cellule. C'est le cas de certains virus, le picornavirus, « encephalomyocarditis virus » (EMCV) supprime la traduction coiffe-dépendante en activant le répresseur traductionnel 4E-BP1. 4E-BP1 hypophosphorylée se lie à eIF4E et empêche la liaison d'eIF4G, bloquant ainsi l'assemblage du complexe eIF4F. Les mécanismes par lesquels EMCV active 4E-BP1 sont incertains (Gingras *et al.*, 1996). Cependant, il a été démontré plus tard que la protéine M du « vesicular stomatitis virus (VSV) » favorise l'accumulation de 4E-BP1 hypophosphorylée en inhibant la kinase Akt (Connor & Lyles, 2002; Dunn & Connor, 2011). D'autres virus activent la phosphorylation de 4E-BP1 pour stimuler la formation du complexe eIF4F et faciliter la traduction d'ARNm viral notamment certains virus ADN dont l'ARNm viral possède la même structure que l'ARNm de l'hôte (une coiffe et une queue poly(A)) : « Herpes simplex virus 1 (HSV-1) », « Human cytomegalovirus » (HCMV), « Virus Epstein-Barr » (EBV) (Buchkovich *et al.*, 2008; Walsh & Mohr, 2004; Walsh & Mohr, 2011).

La traduction d'ARNm codant des effecteurs cellulaires de l'immunité innée en réponse de l'hôte à travers la voie mTORC1-4E-BP1/2 contrôle également la production d'IFN-I. Comme démontré dans l'étude de Colina *et al.*, la réplication des virus à ARN (VSV, Influenza, Sindbis) est nettement supprimée dans les MEFs isolées de souris déficientes pour 4E-BP1/2 (Colina *et al.*, 2008). De plus, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui sont les principaux producteurs d'IFN-I (Xia *et al.*, 2014), dérivées de souris 4E-BP1/2 DKO produisent plus d'IFN-I en réponse au VSV rendant les souris 4E-BP1/2 DKO résistantes à l'infection. Le mécanisme moléculaire impliqué dans ces découvertes est la régulation accrue de la traduction de l'ARNm

de *Irf7* dans les MEFs 4E-BP1/2 DKO menant à une production élevée d'IFN-I (Colina *et al.*, 2008). En accord avec cette étude, Nehdi *et al.* ont confirmé que les MEFs déficients en 4E-BP1 ou 4E-BP2 produisent plus d'IFN-I ce qui entraîne une résistance à l'infection provoquée par l'augmentation de la traduction de *Irf7* par rapport aux cellules WT (Nehdi *et al.*, 2014). La réintroduction de l'un des répresseurs 4E-BPs rend les MEFs plus sensibles à l'infection virale. Ces données indiquent que la perte d'un des répresseurs de la traduction 4E-BP1 ou 4E-BP2 est suffisante pour atténuer un effet régulateur négatif sur la traduction de *Irf7* ce qui améliore la réponse immunitaire innée (Nehdi *et al.*, 2014). L'IFN-I est également important pour la défense de l'hôte contre les infections parasitaires, telles que la leishmaniose (Bogdan *et al.*, 2004). Bien que peu soit connu sur l'effet de l'infection parasitaire sur le contrôle traductionnel, *Leishmania* favorise sa survie dans les macrophages en régulant à la baisse la synthèse des protéines de l'hôte. Ce processus nécessite un gène clé de virulence de *Leishmania*, la glycoprotéine de surface GP63 (Joshi *et al.*, 2002). En plus de cliver et d'activer les phosphatases de l'hôte (Gomez *et al.*, 2009), la GP63 provoque également le clivage de mTOR, le domaine kinase catalytique de mTORC1 et de mTORC2 (Jaramillo *et al.*, 2011). Ceci active les répresseurs de traduction 4E-BP1/2 et favorise la survie de *Leishmania* dans les macrophages. De plus, *in vivo*, les souris déficientes en 4E-BP1/2 sont moins sensibles à la leishmaniose cutanée, en partie à cause de la production accrue d'IFN-I, ce qui conduit à une augmentation des taux de « inductible nitric oxide synthase (iNOS) » et de la production d'oxyde nitrique. Ainsi, la répression de la traduction des ARNm coiffe-dépendante de l'hôte par *Leishmania major* limite la synthèse des protéines anti-microbiennes de l'hôte, contribuant ainsi à la pathogenèse de la leishmaniose (Jaramillo *et al.*, 2011).

Un autre parasite protozoaire intracellulaire, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (qui sera détaillé dans la section 4.6) inactive 4E-BP1/2, ce qui augmente la formation du complexe eIF4F, et stimule de façon sélective la traduction des ARNs via l'axe mTORC1-4E-BP1/2 et favorise la survie du parasite (Leroux *et al.*, 2018).

Aussi, la bactérie *Legionella pneumophila*, contourne la réponse immunitaire de l'hôte, en déclenchant un programme d'ubiquitination et de dégradation des protéines Akt, mTOR qui empêche la phosphorylation des 4E-BP1/2 et donc mène à une inhibition de la synthèse des protéines de la cellule hôte (Ivanov & Roy, 2013).

En plus de la régulation de la réponse immunitaire lors des infections, 4E-BP1/2 sont également impliquées dans le processus de maturation des cellules souches hématopoïétiques multipotentes à l'origine des différentes lignées cellulaires : lymphoïde et myéloïde (Grolleau *et*

al., 1999). Au cours de la différenciation des cellules myéloïdes, l'absence des protéines 4E-BP1/2 entraîne une augmentation de précurseurs immatures associée à une diminution des granulocytes matures. Contrairement à la maturation des thymocytes qui n'est pas affectée. Ces résultats révèlent un rôle important des 4E-BP1/2 dans la traduction au niveau des phases précoces de la différenciation des granulocytes (Grolleau *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2009). Au cours du développement des lymphocytes T, 4E-BP2 a été montrée pour bloquer la phosphorylation d'eIF4E affectant la synthèse protéique dans les thymocytes. En conséquence, la prolifération et la maturation des cellules T sont compromises notamment, l'expression des molécules CD4, CD8 et « T cell receptor » (TCR) (Beretta *et al.*, 1998; Grolleau *et al.*, 1999). Aussi, 4E-BP2 est plus exprimée dans les lymphocytes et en plus, sa sensibilité à la rapamycine est plus élevée que 4E-BP1 retrouvée dans les cellules non lymphoïdes. L'inhibition de 4E-BP2 bloque la croissance et la prolifération des lymphocytes T et B matures (Abraham, 2016; So *et al.*, 2016). L'axe 4E-BP-eIF4E est sensible à la rapamycine dans les lymphocytes et favorise leur expansion clonale en coordonnant la croissance et la prolifération (So *et al.*, 2016).

Le niveau des 4E-BPs varie dans les tissus. Les cellules hématopoïétiques expriment en abondance 4E-BP1 et 4E-BP2 mais pas 4E-BP3 (Tsujiyama-Kohara *et al.*, 2001). La synthèse protéique est différente dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules progénitrices. Cette étude a montré que le déficit en 4E-BP1/2 a augmenté significativement la synthèse protéique globale dans les CSH mais pas dans les progéniteurs hématopoïétiques. Ces données ont permis de déterminer l'implication des répresseurs 4E-BP1/2 dans la régulation de la synthèse protéique dans les CSH (Signer *et al.*, 2016).

3.5 Contrôle traductionnel de processus biologiques par les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2

Ces dernières années, le rôle des répresseurs 4E-BP1/2 a été démontré dans plusieurs systèmes biologiques important et leur dérégulation a été associée à des pathologies majeures. C'est le cas dans la rythmicité circadienne qui est une propriété biologique fondamentale qui coordonne divers processus comportementaux, physiologiques et métaboliques. 4E-BP1 contrôle la traduction d'un neurotransmetteur, « vasoactive intestinal peptide » (VIP) impliqué dans la régulation du rythme circadien (Cao *et al.*, 2013). Les souris déficientes en 4E-BP2 ont montré un phénotype de type autiste dépendant de la signalisation de mTOR-eIF4E. Une mutation ponctuelle dans la région promotrice d'eIF4E amplifie son activité. Ces dysfonctionnements ont entraîné des désordres dans le contrôle post-synaptique de la

traduction des ARNm neuronaux (Gkogkas *et al.*, 2013). Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) englobent des comportements uniques en trois domaines : les interactions sociales, la communication et les intérêts et les comportements répétitifs ou restreints (Fombonne, 2009). La dérégulation de la machinerie traductionnelle régulant la traduction des ARNm synaptiques provoque des TSA par une synthèse accrue de protéines synaptiques (Kelleher & Bear, 2008).

En ligne avec les troubles neurologiques associés aux 4E-BP1/2, les stimuli nocifs contribuent de manière marquée au développement d'une hypersensibilité à la douleur. Ces signaux activent mTOR, impliquée dans l'hyperalgésie (Jiang *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2013). Des souris déficientes pour 4EBP1 ont présenté une hypersensibilité à la douleur mécanique mais non thermique, correspondant à une expression accrue d'une protéine post-synaptique d'adhésion cellulaire régulant la fonction de synapse excitatrice, la neuroligine 1 (Khoutorsky *et al.*, 2015).

Le contrôle traductionnel dépendant des 4E-BP/2 joue également un rôle dans la neuroplasticité. La synthèse des protéines est nécessaire dans l'apprentissage, la mémoire et le comportement. Des souris knock-out pour 4E-BP2 ont présenté une activité altérée dans les tests de l'apprentissage, de la mémoire et du comportement (Banko *et al.*, 2007).

Cette régulation par les 4E-BP1/2 s'étend au réseau de cellules souches embryonnaire où elles dirigent positivement et négativement la reprogrammation des cellules somatiques en contrôlant la traduction de p21, un inhibiteur de la reprogrammation des cellules somatiques, et p53 (Tahmasebi *et al.*, 2014).

Dans le diabète de type 2, la metformine, un antidiabétique oral, diminue la résistance de l'organisme à l'insuline. Une étude a montré que l'inhibition de mTOR par la metformine induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du foie et inhibe la traduction d'ARNm codant pour la protéine Mcl-1, anti-apoptotique. L'atténuation de l'expression des 4EBPs montre une résistance aux effets apoptotiques de la metformine (Bhat *et al.*, 2017).

La traduction dérégulée d'ARNm se produit fréquemment dans les tumeurs en raison d'une expression élevée d'eIF4E ou d'une hyperactivation de la voie mTORC1 qui conduit à l'inactivation des 4EBPs. Le ciblage de l'axe mTORC1-4E-BP-eIF4E est une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer et dans la prévention de la résistance au traitement. Des travaux ont montré qu'une expression modifiée d'eIF4E-4E-BP peut favoriser l'infection des cellules cancéreuses par un virus oncolytique, le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV1) (Workenhe *et al.*, 2014) lors d'une inhibition prolongée de mTOR avec les inhibiteurs du site actif

de TOR (asTORI). Ainsi, l'association pharmacovirale d'asTORi et de HSV1 peut cibler des cellules cancéreuses présentant un axe dérégulé d'eIF4E-4E-BP (Zakaria *et al.*, 2018).

Le manque d'apport en oxygène au niveau des tissus, définit l'hypoxie. En cas d'hypoxie, la traduction est inhibée (Kim *et al.*, 2009c). La délétion génétique des 4E-BP1/2 restreint la croissance tumorale et favorise la tolérance à l'hypoxie dans le cancer de la prostate induit par « Phosphatase and tensin homolog » (PTEN), un régulateur de la division cellulaire (Ding *et al.*, 2018). La tumorigénèse est augmentée chez les souris déficientes en p53 et en 4E-BP1/2. Cependant, les fibroblastes dépourvus de 4EBPs et exprimant p53, subissent une sénescence prématurée et résistent à la transformation induite par un oncogène, p53. Ces données soulignent l'importance de tenir compte de p53 pour cibler thérapeutiquement l'initiation de la traduction (Petroulakis *et al.*, 2009).

En plus de l'implication des 4E-BP1/2 dans la tumorigénèse, 4E-BP3 qui est induit au niveau transcriptionnel (Gingras *et al.*, 2001b), joue également un rôle important dans le contrôle de la traduction d'ARNm et dans la prolifération cellulaire (Tsukumo *et al.*, 2016b). Les études réalisées en l'absence de 4E-BP3 ont révélé qu'elle constitue un important effecteur de mTORC1 et un biomarqueur prédictif robuste de la réponse thérapeutique au traitement prolongé ciblant mTOR dans le cancer (Tsukumo *et al.*, 2016a).

4E-BP1/2 sont aussi impliquées dans le développement de l'obésité. Des souris Knock-out en 4E-BP1/2 et soumis à un régime alimentaire ont augmenté leur masse musculaire squelettique ce qui suggère une compensation avec l'activation de l'anabolisme musculaire. Ces résultats indiquent que les protéines 4E-BP1/2 peuvent prévenir une accumulation excessive de lipides dans le muscle squelettique et sont des régulateurs clés de l'homéostasie musculaire (Le Bacquer *et al.*, 2017).

4. MÉTHODES D'EXPLORATION DU CONTRÔLE TRADUCTIONNEL : LE TRANSLATOME

Le translatome définit l'ensemble des ARNm associés aux ribosomes au cours de la synthèse protéique (King & Gerber, 2016). Il permet d'évaluer le répertoire des protéines qui sont réellement exprimées dans une cellule. Plusieurs méthodes existent pour explorer avec précision la régulation de l'abondance des protéines : le « Polysome profiling », le Ribosome profiling » et le « Translating ribosome affinity purification » (TRAP) (King & Gerber, 2016). Parmi ces technologies, les plus couramment utilisés sont le « Polysome profiling » et le Ribosome profiling » (Figure 1.22).

4.1 « Polysome profiling »

Les ARNm activement traduits sont liés à plusieurs ribosomes formant le polysome. Les polysomes sont séparés des ARN libres, des sous-unités ribosomales 40S, 60S et des monosomes 80S par ultracentrifugation en gradient de sucrose (Masek *et al.*, 2011) (Figure 1.22A). L'analyse est basée sur le déplacement d'un ARNm dans le gradient polysomal indiquant une modification dans le statut de traduction de cet ARNm. Les changements dans le niveau total d'ARNm sont mesurés pour étudier la relation entre la transcription et la traduction dans différentes conditions. Après l'isolement de l'ARN à partir des fractions du gradient, la distribution des ARN spécifiques dans le gradient peut être évaluée par différentes méthodes : Northern blot, RTqPCR, ou au niveau global par le microarray ou le RNA-Seq (Spangenberg *et al.*, 2013).

La plupart des études génomiques ont utilisé le « Polysome profiling » pour comparer l'état de traduction des ARNm dans différents types cellulaires en condition non stimulée ou stimulée (Bjur *et al.*, 2013; Colina *et al.*, 2008; Herdy *et al.*, 2012b; Larsson *et al.*, 2010; Piccirillo *et al.*, 2014). En ce qui concerne le translatome des macrophages, plusieurs études ont mis en évidence les changements dans l'efficacité traductionnelle des ARNm spécifiques à travers cette approche (Kitamura *et al.*, 2008; Liepelt *et al.*, 2014; Schott *et al.*, 2014). Par exemple, pour identifier les mécanismes par lesquels l'IL-10 inhibe la production du TNF α dans les macrophages, le « Polysome profiling » a permis de démontrer que l'IL-10 régule la traduction du TNF α à travers la phosphatase SHIP1 dans les macrophages activés (Chan *et al.*, 2012). L'IL-10 déplace l'ARNm du *Tnfa* des fractions polysomales aux fractions monosomales pour inhiber sa traduction. L'inhibition de la phosphatase SHIP1 par un siRNA a restauré l'activité

traductionnelle du *Tnfa*. De plus les auteurs ont pu mettre en évidence que l'IL-10 inhibe la traduction du TNF α via la déphosphorylation de MNK1 par SHIP1. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par l'utilisation de souris déficientes pour SHIP1 (Chan *et al.*, 2012).

4.2 « Ribosome profiling »

Cette technique est basée sur le séquençage profond des fragments d'ARNm protégés par le ribosome qui persiste après le traitement du lysat cellulaire par des antibiotiques et des nucléases et permet de mesurer les positions exactes et les densités ribosomiques le long des molécules d'ARNm présentes dans une cellule (Figure 1.22B) (Ingolia *et al.*, 2012). Une étude a utilisé cette approche en combinaison avec le séquençage d'ARN à haut débit pour investiguer le rôle de l'IFN- γ dans la régulation des réponses inflammatoires dans les macrophages (Su *et al.*, 2015). Cette approche a fourni un translatome complet en quantifiant les fragments d'ARN protégés par le ribosome. L'analyse a été basée sur la comparaison de l'abondance de l'ARNm et les ARNm traduits activement dans les macrophages activés par le TLR2, traités ou non avec l'IFN- γ . Les changements dans le taux de traduction ont été obtenus en divisant les changements dans l'abondance de l'ARNm par les ARNm hautement traduits. Ce calcul a permis de connaître l'efficacité traductionnelle. Le traitement par l'IFN- γ a induit des changements significatifs dans l'efficacité traductionnelle de près de mille gènes. Ainsi, le Ribosome profiling a révélé un rôle important de l'IFN- γ dans la modulation de la traduction de l'ARNm au niveau du génome (Su *et al.*, 2015).

4.3 « Translating ribosome affinity purification » (TRAP)

La TRAP permet de mesurer les niveaux d'ARNm dans des types cellulaires spécifiques tels que les neurones et les cellules souches (Heiman *et al.*, 2014) et fournit des informations sur les protéines impliquées dans les fonctions cellulaires à un moment donné. Cette technique est capable de capturer le processus de traduction de l'ARNm d'une manière spécifique au type cellulaire. Elle est basée sur la purification par affinité des polysomes portant une sous-unité ribosomale marquée. Les ribosomes marqués par affinité par exemple avec la « Green Fluorescent Protein » (GFP) sont capturés dans les extraits cellulaires avec des anticorps spécifiques ou des ligands couplés à une matrice. Après plusieurs lavages, les ribosomes et les ARNm associés sont libérés de la matrice et les ARNm capturés sont analysés par « microarray » ou « RNA-seq ».

4.4 « Avantages et limites »

Les avantages du « Polysome profiling » sont l'identification des ARNm traduits au niveau du génome entier et la quantification du niveau d'expression de ces ARNs par le séquençage à haut débit. Le « Ribosome profiling » permet de déterminer le taux d'occupation des ribosomes par l'isolement des fragments d'ARNm protégés par les ribosomes, la position des sites d'initiation, la vitesse de traduction d'un ARNm et l'identification des ORFs et des sites d'arrêt. Le TRAP permet d'utiliser un nombre réduit de cellules $<10^6$ avec une spécificité du type cellulaire ou tissulaire. Contrairement au « Polysome profiling » et au « Ribosome profiling », le TRAP est une technique simple, peu coûteuse et robuste.

L'utilisation de ces technologies est limitée par une grande quantité de matériel de départ et possèdent un risque de contamination des fractions du gradient par les ARN ribosomiaux. Le « Polysome profiling utilise des équipements spécifiques et coûteux (ultracentrifugation et système de fractionnement des ARN). Le « Ribosome profiling » nécessite plusieurs étapes de traitement des lysats par des antibiotiques et de digestion par des nucléases, d'élimination des ARNm qui ne sont pas associés aux ribosomes et de purification des ARNm liés aux ribosomes ce qui peut introduire des biais significatifs dans le profile des séquences protégés par les ribosomes. De plus, le « Ribosome profiling » ne permet pas de distinguer les monosomes et les polysomes. L'analyse des ribosomes individuels et leurs empreintes au lieu des transcrits entiers conduit à une perte d'informations et ne permet pas d'évaluer l'efficacité de la traduction des ARNm mais seulement de mesurer la densité des ribosomes sur un transcrit donné. En revanche, le TRAP nécessite une modification génétique, par exemple, l'utilisation d'un transgène pour exprimer des protéines ribosomiales étiquetées et possède une faible résolution.

En définitive, le Ribosome profiling révèle les changements dynamiques du translatome dans différentes conditions ainsi que les mécanismes de contrôle agissant en *cis* et en *trans* interférant avec ces modifications. Tandis que, le Polysome profiling fournit l'efficacité traductionnelle d'ARNm spécifiques en réponse aux changements biologiques et préserve l'intégrité du transcrit pour des analyses ultérieures (Masvidal *et al.*, 2017a). Le TRAP fournit une analyse spécifique du translatome à un type cellulaire (c'est-à-dire dans un tissu, il est impossible d'isoler les ARNm liés aux polysomes dans un type cellulaire donné sans risque de contamination par les cellules environnantes). Cette approche est adaptée pour purifier des ARNm spécifiques en utilisant un transgène sous le contrôle d'un promoteur cellulaire donné.

De ce fait, notre objectif était d'évaluer les changements de l'efficacité de la traduction ce qui nous conduit à sélectionner le « Polysome profiling » pour notre étude.

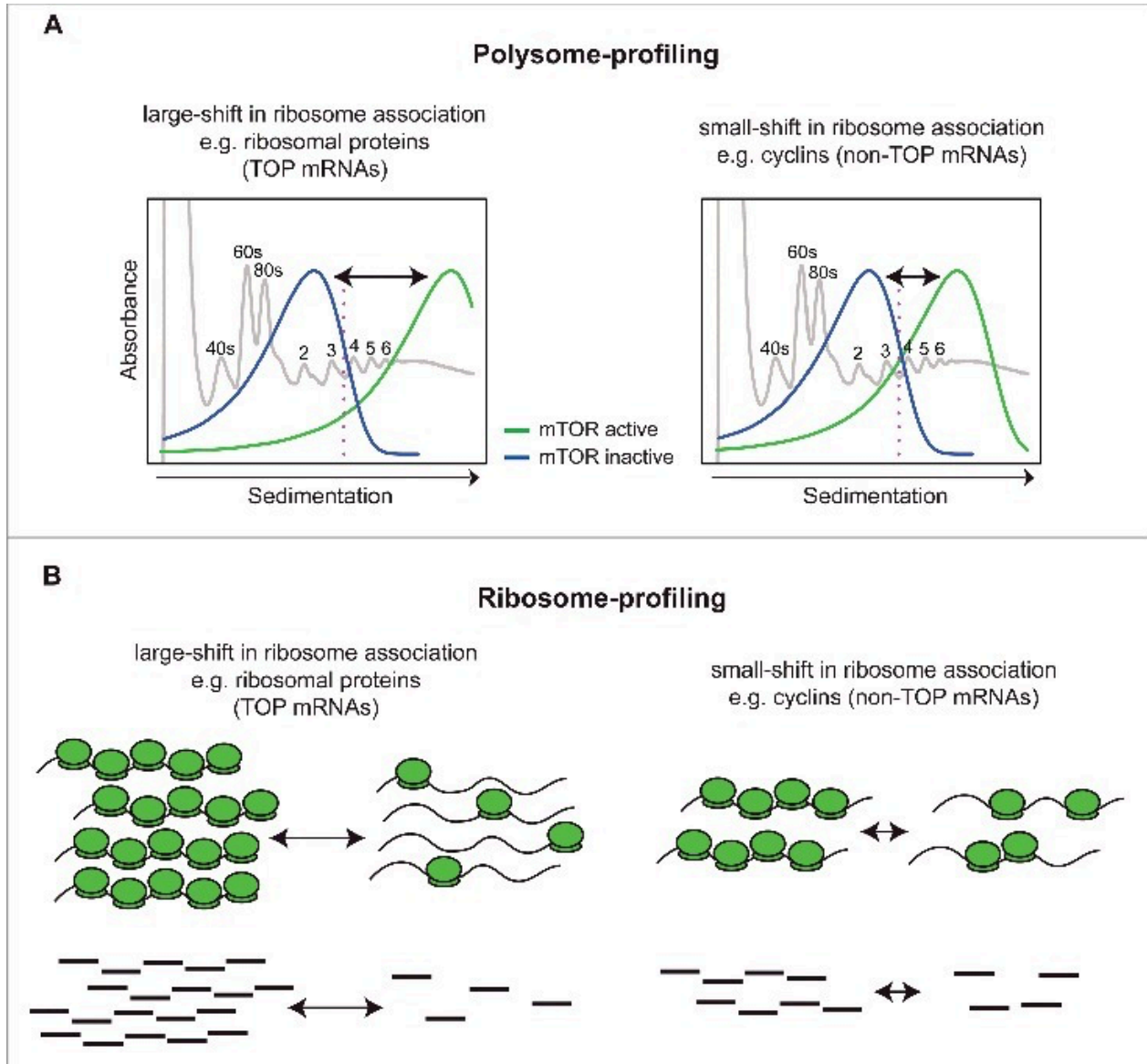


Figure 1.22 Principe du Polysome profiling et Ribosome profiling.

A) Polysome profiling. Différents profils de polysomes montrant l'efficacité de la traduction mesurée en quantifiant les ARNm traduits efficacement (l'ARN est associé à plus de trois ribosomes) indiqué par la ligne (rose en pointillée). A gauche, profile des ARNm TOP associé aux « heavy-polysomes ». A droite les ARNm associés aux « light polysomes ». Efficacité traductionnelle (vert). Inhibition de mTOR (bleu). B) Ribosome profiling. Quantité de fragments d'ARNm protégés par le ribosome. Quantification par RNA-Seq. Changements très différents dans les ARNm TOP et non-TOP. Ces changements conduisent à un biais favorisant l'identification d'ARNm TOP traduits différemment. (Masvidal *et al.*, 2017a)

5. LES MACROPHAGES

5.1 Origine et développement des macrophages

Les macrophages sont des cellules myéloïdes immunitaires qui jouent un rôle important dans la première ligne de défense contre les pathogènes, dans le maintien de l'homéostasie et dans la résolution de l'inflammation (Varol *et al.*, 2015). Découvert en 1883 par Elie Metchnikoff, les macrophages ont été décrits pendant longtemps comme provenant essentiellement de la différenciation des monocytes issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Mais à ce jour, notre compréhension sur l'origine, la différenciation, la distribution et les propriétés des macrophages a changé (Gordon, 2003; Gordon & Pluddemann, 2018). Les macrophages ont des origines mixtes. Les macrophages tissulaires sont dérivés de progéniteurs embryonnaires qui alimentent les tissus au cours du développement et cela avant la naissance (Ginhoux & Jung, 2014). Ces macrophages persistent dans le tissu fœtal jusqu'à l'âge adulte, sans être renouvelés par des cellules provenant de la moelle osseuse ou des monocytes sanguins.

Au cours du développement, l'hématopoïèse embryonnaire est constituée de deux phases bien distinctes : l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive (Traver & Zon, 2002). L'hématopoïèse primitive est issue de l'hématopoïèse précoce du sac vitellin embryonnaire et permet la croissance de précurseurs hématopoïétiques qui se différencient dans des structures appelées « îlots sanguins » menant à la formation de macrophages. L'hématopoïèse définitive a lieu dans les tissus embryonnaires et fœtaux localisés au niveau des régions de l'Aorte/Gonades/Mésonephros (AGM) (Cumano & Godin, 2007; Orkin & Zon, 2008). Les progéniteurs hématopoïétiques dérivés du sac vitellin et de l'AGM colonisent le foie fœtal, lequel devient le site hématopoïétique principal des cellules souches hématopoïétiques (CSH). D'autres sites apparaissent très rapidement : le thymus, la rate et finalement la moelle osseuse. L'hématopoïèse définitive sera donc à l'origine de la totalité des lignées sanguines du fœtus et de l'adulte (Traver & Zon, 2002). Plus tardivement, la génération des CSH s'établit définitivement dans la moelle osseuse (Kumaravelu *et al.*, 2002).

Les macrophages tissulaires issus du sac vitellin embryonnaire et du foie fœtal ont la capacité de s'auto-renouveler dans les tissus de façon indépendante du compartiment sanguin (Davies *et al.*, 2013; Schulz *et al.*, 2012). Leur mode différenciation est unique et ne nécessite pas un passage par un stade intermédiaire monocyttaire, signe caractéristique des macrophages

dérivés de la moelle osseuse, mais semble plutôt suivre une voie de différenciation accélérée pour devenir des macrophages matures dans les tissus foetaux (Ginhoux & Jung, 2014).

Les macrophages représentent une population très variée et sont identifiés selon leur localisation. Ainsi se distinguent, les cellules de Kupffer correspondant aux macrophages résidents du foie, les cellules microgliales sont les macrophages dans les tissus nerveux, les macrophages alvéolaires dans le poumon, les histiocytes dans les tissus conjonctifs, les cellules de Langerhans dans la peau, les ostéoclastes dans les tissus osseux, les macrophages intestinaux, les macrophages péritonéaux et les macrophages spléniques de la rate ; ils remplissent des fonctions spécifiques du microenvironnement local (Ginhoux & Jung, 2014; Murray & Wynn, 2011).

5.2 Fonctions des macrophages

Les fonctions des macrophages sont nombreuses dans le système immunitaire : l'élimination des pathogènes, l'initiation des réponses inflammatoires, la stimulation de la réponse immunitaire adaptative, l'homéostasie des tissus et la réparation des lésions tissulaires (Gordon & Pludemann, 2018). Les macrophages libèrent des médiateurs inflammatoires, notamment des cytokines et des chimiokines qui jouent un rôle fondamental dans l'initiation et la propagation du processus inflammatoires (Gordon, 2007). Ils maintiennent l'homéostasie tissulaire en supprimant les cellules apoptotiques et en produisant des facteurs de croissance. Ils ont été décrits pour être impliqués dans le développement de nombreux tissus (Wynn *et al.*, 2013). De plus, ils participent à la cicatrisation et à la présentation des antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif (Mills *et al.*, 2014). Dans l'organisme, ce sont les principaux producteurs de cytokines, ils initient et modulent les réponses de l'immunité innée et adaptative (Wynn *et al.*, 2013). Ils exercent leurs fonctions immunitaires grâce à l'expression de nombreux récepteurs membranaires appelés les « Pathogen recognition Receptor » (PRR) parmi lesquels les récepteurs « *Toll-like* » (TLR), les récepteurs du complément, les récepteurs *scavenger*, les récepteurs de type lectine impliqués dans la reconnaissance des motifs moléculaires très conservés et caractéristiques des microorganismes, les « Pathogen Associated Molecular Pattern » (PAMP) (Gordon & Read, 2002). La liaison des ligands aux PRR entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$ et $IL-6$), initiant la réponse inflammatoire. Le $TNF\alpha$ active les cellules endothéliales qui facilitent le recrutement de

leucocytes et de protéines sériques au site de l'infection. L'IL-1 β et l'IL-6 induisent les hépatocytes à sécréter les protéines de la phase aiguë telles que les collectrines et les pentraxines. Ces protéines opsonisent les produits microbiens et activent le système du complément pour éliminer les pathogènes.

5.3 Activation ou polarisation des macrophages

Les macrophages sont présents dans de nombreux tissus à des endroits stratégiques et s'adaptent à leur microenvironnement en modifiant leur phénotype et leur fonctionnement en fonction des signaux qu'ils reçoivent. Cette hétérogénéité est souvent appelée « activation » ou « polarisation » (Wynn *et al.*, 2013).

Le terme « activation » des macrophages décrit une activité microbicide dépendante de l'antigène, mais non spécifique (Martinez & Gordon, 2014).

Le terme « polarisation » est basé sur la classification de deux sous-populations de lymphocytes T « helper » murins, Th1 et Th2, exprimant un profil de cytokines distinct en fonction des stimuli rencontrés : soit l'interféron- γ (IFN- γ) pour le profil Th1 et soit l'IL-4 pour le profil Th2. Cette nomenclature a été décrite en 1986 par Tim Mosmann et s'est appliquée aux macrophages lorsque des effets différentiels de l'IL-4 par rapport à l'IFN- γ sur l'expression de gènes de macrophages ont été rapportés (Stein *et al.*, 1992). A partir de ces travaux est né le concept d'activation alternative des macrophages.

Les macrophages activés sont maintenant classés en deux sous-ensembles, appelés cellules M1 et M2. L'activation classique des macrophages ou le phénotype M1 est déclenchée par l'IFN- γ ou par des infections bactériennes ou des stimuli bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) (qui sera développé dans la section 4.5) et induisent la production accrue de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-6), une activité antimicrobienne, anti-tumorale et une grande capacité à présenter l'antigène.

L'activation alternative des macrophages est induite par l'IL-4 et l'IL-13 (Gordon, 2003). Le phénotype M2 participe aux réponses de type Th2, à la réparation tissulaire et à l'élimination des parasites et possède des fonctions immunorégulatoires (Gordon & Martinez, 2010). Les macrophages M2 sont divisés en trois sous-types : les macrophages M2a activés par l'IL-4 et l'IL-13, ils sont qualifiés de macrophages alternatifs et réparateurs, ils sont associés à la

réponse immunitaire de type allergique ou parasitaire. Les macrophages M2b et M2c sont qualifiés de macrophages régulateurs et anti-inflammatoires (Martinez & Gordon, 2014). Les macrophages M2b sont activés par les complexes immuns associés aux agonistes des TLRs. Les macrophages M2c sont activés par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le TGF- β (Mantovani *et al.*, 2004), ils participent à l'immunité suppressive.

Ces deux populations M1 et M2 ne représentent pas des sous-ensembles stables et différenciés mais présentent une grande plasticité et ont la capacité de s'adapter à un microenvironnement en mutation.

5.4 Régulation des macrophages par mTOR

Les macrophages répondent aux pathogènes et à d'autres stimuli nocifs (débris cellulaires, apoptotique ou nécrotiques) en initiant des réponses inflammatoires. L'activation des macrophages est médiée par des cascades de signalisation en aval des récepteurs de cytokines et des TLRs. La voie PI3K/Akt/mTOR converge des signaux inflammatoires et métaboliques en modulant leur phénotype d'activation M1 et M2 (Covarrubias *et al.*, 2015).

Plusieurs études indiquent que la signalisation PI3K/Akt/mTOR joue un rôle clé dans l'activation des macrophages (Powell *et al.*, 2012; Troutman *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014). Cependant, le rôle de mTOR dans le contrôle de l'activation des macrophages n'est pas encore bien défini. Des données récentes ont montré que des macrophages isolés de souris déficientes en Tsc1 ou Tsc2 favorise la production de cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS, soit une activation M1 et supprime l'activation M2 induite par IL-4 (Byles *et al.*, 2013; Covarrubias *et al.*, 2015). L'utilisation de la rapamycine pour inhiber mTORC1 a également montré l'expression d'un profil M1 et une réduction du profil M2 dans les macrophages humains et murins (Mercalli *et al.*, 2013; Weichhart *et al.*, 2008) et conduisant à la suppression des effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes (Zhu *et al.*, 2014) par la stimulation du facteur de transcription NF- κ B et le blocage de l'activité du facteur de transcription STAT3. Des effets similaires ont été observés dans les macrophages dérivés de souris déficientes en mTORC2 en réponse au LPS et accompagnés d'une haute mortalité par choc septique (Brown *et al.*, 2011; Festuccia *et al.*, 2014). En amont de mTOR, la PI3K/Akt restreint les réponses pro-inflammatoires et favorisent les réponses anti-inflammatoires dans les macrophages stimulés avec le LPS (Lopez-Pelaez *et al.*, 2011). Tandis que l'inhibition chimique, non spécifique de la voie PI3K, augmente l'activation

de NF- κ B et l'expression de l'oxyde nitrique synthétase inductible, favorisant une réponse M1 dans les macrophages (Luyendyk *et al.*, 2008; Weichhart & Saemann, 2009). En définitive, la régulation de facteurs de transcriptions impliqués dans la synthèse de médiateurs pro- et anti-inflammatoires par mTOR va guider le phénotype M1/M2 des macrophages.

5.5 Activation des macrophages par le lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS possède des chaînes de polysaccharides, de longueurs variables, du polysaccharide central et du lipide A et un antigène O. Le lipide A est une structure très conservée entre les pathogènes, il est reconnu par le TLR4 (Toll like Receptor 4). Le LPS présent dans l'organisme est d'abord reconnu par la protéine LBP (LPS-Binding Protein) (Steimle *et al.*, 2016). La LBP est une glycoprotéine de 60 kDa sécrétée par les hépatocytes et qui se retrouve dans le plasma (Chaby, 2004). Elle forme avec le LPS, un complexe LPS-LBP qui s'associe au CD14. Le CD14 est un récepteur exprimé à la surface des macrophages et plus faiblement des neutrophiles (Sladek & Rysanek, 2009). Il contient des domaines « Leucine-Rich Repeat (LRR) », tout comme les TLRs et est ancré à la membrane par une queue « Glycosylphosphatidylinositol (GPI) ». Le rôle du CD14 est de transmettre le LPS-LBP au TLR4 qui est associé à la protéine MD-2 (18,4 kDa) (Koraha *et al.*, 2005). Le complexe TLR4/MD-2 transmet un signal à la cellule qui induit des cascades d'activation telle que MAPK, NF- κ B. Puissante endotoxine, le LPS a été très utilisé pour comprendre les mécanismes de régulation de la signalisation cellulaire (Schilling *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 1999). Il module l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les macrophages (Liepelt *et al.*, 2014), ce qui représente un excellent agent immunomodulateur pour l'étude de la réponse immunitaire innée. L'efficacité de la traduction des ARNm est un élément majeur pour déterminer le taux de protéines nécessaires à la régulation cellulaire. Dans l'étude de Liepelt *et al.*, les auteurs ont analysé l'impact de la régulation post-transcriptionnelle sur la signalisation induite par le LPS et l'expression des cytokines dans les macrophages (Liepelt *et al.*, 2014). Pour cela, l'ARNm associé à hnRNP K a été immunoprécipité et analysé en puce à ADN « DNA microarray » (RIP-Chip). Pour identifier les ARNm, des extraits cytoplasmiques ont été préparés avec les macrophages stimulés 6h avec le LPS. L'analyse par « microarray » de ces ARNm a révélé 163 ARNm codant pour des protéines de la réponse immunitaire parmi lesquels 21 étaient liés à la signalisation du TLR4. Cette étude a mis en évidence l'inhibition traduction de « transforming

growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) » par le hnRNP K dans les macrophages non stimulés avec le LPS. Une autre étude a exploré la régulation traductionnelle d'ARNm spécifiques dans les macrophages stimulés par le LPS (Schott *et al.*, 2014). Les auteurs ont investigué par l'analyse des profils de polysomes puis séquençage (RNA-Seq) les changements traductionnels dans la phase précoce d'activation des macrophages pour identifier les ARNm dont la traduction est régulée après stimulation par le LPS. Cette étude a révélé que le mode de régulation actif le plus fréquent est la traduction qui est prédominant parmi les inhibiteurs de la signalisation de NF- κ B (*Nfkbid*, *Nfkbiz*, *Nr4a1*) et un facteur, *Ler3* qui module la survie des macrophages.

5.6 Rôle du contrôle traductionnel dans les fonctions des macrophages

Le contrôle traductionnel des fonctions des macrophages via les protéines 4E-BP1/2 n'a pas encore été bien défini et représente une partie du travail élaboré dans cette thèse. Cependant, certaines études ont démontré l'importance des changements dans l'efficacité de la traduction des ARNs spécifiques impliqués dans les fonctions des macrophages.

Comme décrit précédemment, les macrophages s'adaptent aux variations de leur environnement en modifiant leur phénotype ce qui entraîne des changements dans l'expression des gènes et par conséquent, des modifications dans le protéome. Mais pour bien comprendre les changements qui sont observés dans l'expression des protéines, une étude a décrit que les taux de synthèse et de dégradation des protéines jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'expression protéique au cours de la différenciation cellulaire (Kristensen *et al.*, 2013b). Ces données expliquent pourquoi une faible corrélation est généralement observée entre les changements d'expression dans le transcriptome et dans le protéome, pour les protéines dont l'expression diminue (Lee *et al.*, 2011). Les taux de dégradation sont maintenant des critères à prendre en compte pour prédire les changements d'expression d'une protéine et sont également disponibles dans « Encyclopedia of Proteome Dynamics » (Larance *et al.*, 2013).

Plusieurs travaux ont exploré la régulation traductionnelle dans les réponses inflammatoires des macrophages en réponse au LPS en utilisant une approche génomique. C'est le cas de la mise en évidence du contrôle traductionnel de l'ARNm d'un régulateur négatif de l'inflammation « Monocyte Chemotactic Protein-induced Protein 1 » (MCPIP1). De plus, un nouveau mécanisme de résolution de l'inflammation ayant un impact sur la synthèse de

plusieurs molécules dans les colites ulcéreuses a été décrit. Ce mécanisme consiste à bloquer l'expression de la protéine ribosomale L13a du GAIT complexe et va aboutir à un meilleur contrôle des réponses inflammatoires dépendantes de L13a (Poddar *et al.*, 2016). D'autres formes de régulation post-transcriptionnelle de la réponse immunitaire innée de l'IFN-I ont été également explorées dans les monocytes. L'extrémité riche en G présent dans un ADN synthétique, immunostimulant du TLR9 (CpG ODN) était responsable de l'activité inhibitrice dans les monocytes provoquant l'apoptose et l'arrêt global de la traduction. De ce fait, la production d'IFN-I a été hautement régulée au niveau transcriptionnel mais elle peut être inhibée au niveau post-transcriptionnel au cours d'un stress cellulaire sans affecter la sécrétion de chimiokines, telle que CXCL10 (Herzner *et al.*, 2016). Dans un cas d'utilisation d'interféron de type II, l'étude du génome dans les macrophages stimulés avec l'IFN- γ a identifié un nouvel opéron régulé post-traductionnellement. Ces ARNm ont été trouvés comme codant pour des protéines impliquées dans l'inflammation (Vyas *et al.*, 2009). La régulation traductionnelle de l'inflammation implique également les cyclooxygénases, dont la traduction de l'ARNm *Cox-1* a été augmentée en réponse à la stimulation par IL-4 dans les macrophages (Shay *et al.*, 2017).

L'expression traductionnelle de MCP1 est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-17 et joue un rôle dans la coordination des réactions inflammatoires (Dhamija *et al.*, 2013). En ligne avec ces études, l'exploration du contrôle traductionnel dans les macrophages avant et après stimulation par le LPS a révélé un profil d'ARN régulés traductionnellement à la hausse et à la baisse. Ces résultats ont montré que les gènes régulés négativement codent pour des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kitamura *et al.*, 2008).

L'exploration du contrôle traductionnel dans les macrophages, en contexte d'une infection parasitaire a été conduite dans notre laboratoire. Cette étude est l'une des premières à utiliser l'analyse du « Transcriptome-wide polysome profiling » pour mettre en évidence le profil traductionnel des macrophages infectés par le parasite intracellulaire, *T. gondii* (Leroux *et al.*, 2018). Cette étude a montré que *T. gondii* augmente de façon sélective la traduction d'ARNm sensibles à mTOR afin de maintenir la survie dans les cellules hôtes et favoriser sa réplication. Par une approche biochimique, l'inhibition de mTOR a réduit la réplication du parasite. Ce résultat a confirmé l'importance pour le parasite d'activer la traduction d'ARNm spécifiques pour maintenir sa réplication dans les macrophages. L'utilisation des deux souches de *T. gondii* de type I et II a montré qu'ils régulent l'activité de mTOR et la traduction d'ARNm soutenant l'idée d'un mécanisme de propagation du parasite. Parmi les ARNm activés traductionnellement,

plusieurs d'entre eux contenaient un motif 5' TOP et d'autres codant pour des protéines ribosomales. Certains ARNm jouent un rôle dans la progression du cycle cellulaire (RPS3, RPS7, RPS15a, RPL15 et RPL36a), la régulation de l'apoptose (RPS14, RPS29 et RPL7). De plus *T. gonfii* a inhibé la traduction de transcrits codant pour des protéines pro-apoptotiques telle que Foxo3a et médié l'activation de facteurs pro-survie et régulateurs du cycle cellulaire (Bcl2A1D, Cdk2, Hbegf et Id2). L'ensemble de ces données a montré que *T. gondii* régule l'efficacité de la traduction de certains ARNm en favorisant la survie de la cellule infectée permettant ainsi la réplication du parasite.

En outre, les macrophages ont un rôle essentiel dans l'immunité innée et peuvent être activés par divers stimuli au cours de la réponse immunitaire (Martinez & Gordon, 2014). Le contrôle traductionnel permet aux macrophages de contrôler rapidement les signaux de danger et de maintenir l'homéostasie cellulaire. Les investigations approfondies sur l'impact de cette régulation traductionnelle dans les fonctions des macrophages par les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2 apporteront par ce travail de recherche des données fondamentales pour comprendre la résolution de l'inflammation et palier aux défaillances immunitaires.

CHAPITRE II.

Motivation et Objectif

Le contrôle traductionnel est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes crucial permettant de maintenir un équilibre physiologique tout en réajustant rapidement les besoins cellulaires en protéines pour répondre efficacement aux changements provoqués par des stimuli externes notamment lors des infections (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Ce mécanisme de contrôle est médié principalement par la voie de signalisation PI3K/mTORC1 qui régule l'activité des effecteurs traductionnels, 4E-BP1/2 et S6Ks. Un processus biologique majeur régulé par cette voie signalétique est la réponse immunitaire innée. Une étude du translatome réalisée dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) déficientes pour les répresseurs traductionnels *Eif4ebp1* et *Eif4ebp2* a décrit que l'axe mTORC1-4E-BP1/2 régule la réponse immunitaire innée via le contrôle traductionnel d'*Irf7* (Colina *et al.*, 2008; Nehdi *et al.*, 2014). Par contre, ces études réalisées dans des MEFs pourraient ne pas refléter le répertoire complet d'ARNm régulés au niveau traductionnel dans les cellules immunitaires. Une seconde étude a montré l'implication des 4E-BP1/2 dans la résistance des macrophages à un parasite protozoaire via la production d'interféron de type I (IFN-I) et d'oxyde nitrique (NO). Cependant, les transcrits contrôlés traductionnellement via 4E-BP1/2 dans les macrophages restent encore à caractériser. Basé sur ces données, nous avons émis l'hypothèse que 4E-BP1/2 régulent la traduction de transcrits spécifiques impliqués dans les fonctions des macrophages.

Mon premier objectif sera d'identifier les ARNm reliés à la réponse immunitaire qui sont régulés au niveau traductionnel dans les macrophages par les répresseurs 4E-BP1 et 4E-BP2. Pour atteindre cet objectif, nous allons utiliser une approche génomique et bioinformatique pour explorer le translatome par l'analyse des profils de polysomes suivie du fractionnement de l'ARN et l'identification des cibles par une technologie de quantification de l'ARN à semi-haut débit. Nous allons valider l'expression basale des transcrits par RT-qPCR.

Mon deuxième objectif sera d'évaluer les changements dans l'activité traductionnelle des transcrits régulés par 4E-BP1/2 en présence d'un agent immunomodulateur par « Polysome profiling » et RT-qPCR.

Mon troisième objectif sera de déterminer le rôle des 4E-BP1/2 dans les fonctions des macrophages et les mécanismes moléculaires impliqués en utilisant les technologies de biologie moléculaire (RT-qPCR), biochimie (western blot) et d'immunologie (ELISA).

CHAPITRE III.

PREMIÈRE PUBLICATION

Résumé de la première publication

Manuscrit publié dans *The Journal of Immunology*

Date de publication : 30 Avril 2018 DOI: 10.4049/jimmunol.1701670

Titre : Les protéines 4E-BP1/2 limitent les réponses anti-inflammatoires des macrophages à travers la répression traductionnelle de l'interleukine-10 et la cyclo-oxygénase-2

Les macrophages représentent l'une des premières lignes de défense pendant les infections et sont essentiels pour la résolution de l'inflammation après l'élimination des pathogènes. L'activation ou la suppression rapide de la synthèse des protéines par des modifications de l'efficacité de la traduction permet aux cellules du système immunitaire, y compris les macrophages, de répondre rapidement aux déclencheurs ou signaux externes sans synthèse d'ARNm *de novo*. Les répresseurs traductionnels, les protéines se liant à eIF4E, 4E-BP1 et 4E-BP2 (4E-BP1/2) sont des régulateurs centraux de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires au cours d'infections virales et parasitaires. Cependant, il reste à établir si 4E-BP1/2 joue un rôle dans le contrôle traductionnel des réponses anti-inflammatoires. En comparant l'efficacité traductionnelle des transcrits immunitaires chez les macrophages de souris sauvages et « knock-out » en 4E-BP1/2, nous avons trouvé que la traduction des ARNm codant pour deux régulateurs majeurs de l'inflammation, IL-10 et PG-endoperoxyde synthase 2/cyclooxygénase-2, est contrôlée par 4E-BP1/2. La délétion génétique de 4E-BP1/2 dans les macrophages a augmenté la synthèse endogène des protéines IL-10 et PGE₂ en réponse à la stimulation de TLR4 et a réduit leur capacité bactéricide. Le mécanisme moléculaire impliqué a renforcé l'expression de gènes anti-inflammatoires (*sll1ra*, *Nfil3*, *Arg1*, *Serpinb2*) en raison de la régulation positive de la signalisation IL-10-STAT3 et PGE₂-C/EBP β . Ces données apportent la preuve que 4E-BP1/2 limitent les réponses anti-inflammatoires dans les macrophages et suggèrent qu'une activité dérégulée de 4E-BP1/2 pourrait être impliquée dans la reprogrammation des profils traductionnel et transcriptionnel des macrophages dans des conditions pathologiques telles que les infections et le cancer.

Contribution des auteurs :

Mirtha William : Conception, réalisation des manipulations (sauf Figure 2E et 2F), analyse et écriture du premier jet matériel et méthode

Louis-Philippe Leroux : Conception, réalisation des manipulations (Figure 2E et 2F), analyse et écriture du manuscrit

Visnu Chaparro : Bioinformatique, normalisation polysomes (Figure 1B, 1C, 2A) et analyse

Julie Lorent : Analyses bioinformatiques

Marie-Noël M'Boutchou : Analyse Nanostring (nCounter)

Tyson E. Graber : Analyse bioinformatique (Figure 1D, 1E)

Tania Charpentier : Analyse cytométrie en flux, ImageStream (Figure 3C, 3D) et écriture matériel et méthode ImageStream

Aymeric Fabié : Analyse cytométrie en flux, ImageStream (Figure 3C, 3D)

Tommy Alain : contributions aux nouvelles technologies et analyse

Charles M. Dozois : Conception et analyse, test bactéricide

Simona Stäger : Conception et analyse cytométrie en flux, ImageStream

Léon C. van Kempen : contributions aux nouvelles technologies et analyse, Nanostring

Ola Larsson : Conception, analyse, écriture et contributions aux nouvelles technologies et écriture du manuscrit

Maritza Jaramillo : Conception, analyse, contributions aux nouvelles technologies et écriture du manuscrit

eIF4E-binding proteins 1 and 2 limit macrophage anti-inflammatory responses through translational repression of Interleukin-10 and Cyclooxygenase-2

Mirtha William^{*}, Louis-Philippe Leroux^{*}, Visnu Chaparro^{*}, Julie Lorent[†], Tyson E. Graber[¶], Marie-Noël M'Boutchou^{‡,§}, Tania Charpentier^{*}, Aymeric Fabié^{*}, Charles M. Dozois^{*}, Simona Stäger^{*}, Léon C. van Kempen^{‡,§}, Tommy Alain[¶], Ola Larsson[†] and Maritza Jaramillo^{*,1}

^{*}INRS – Institut Armand Frappier and Centre for Host-Parasite Interactions, Laval, QC, Canada; [†]Department of Oncology-Pathology, Science for Life Laboratory, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; [‡]Department of Pathology, McGill University, Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, Montreal, QC, Canada; [§]Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Centre Groningen, The Netherlands; [¶]Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada ; [†]Department of Oncology-Pathology, Science for Life Laboratory, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; [‡]Department of Pathology, McGill University, Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, Montreal, QC, Canada; [§]Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Centre Groningen, The Netherlands; [¶]Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

¹To whom correspondence and requests for materials should be addressed: Maritza Jaramillo, INRS – Institut Armand Frappier and Centre for Host-Parasite Interactions, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7; Phone number (1)-450-687-5010, Ext 8872; Fax number (1) 450-686-5389; E-mail: maritza.jaramillo@iaf.inrs.ca

Short title: 4E-BP1/2 repress macrophage *Il-10* and *Cox-2* translation

Abstract

Macrophages represent one of the first lines of defense during infections and are essential for resolution of inflammation following pathogen clearance. Rapid activation or suppression of protein synthesis via changes in translational efficiency allows cells of the immune system, including macrophages, to quickly respond to external triggers or cues without *de novo* mRNA synthesis. The translational repressors eIF4E-binding proteins 1 and 2 (4E-BP1/2) are central regulators of pro-inflammatory cytokine synthesis during viral and parasitic infections. However, it remains to be established whether 4E-BP1/2 play a role in translational control of anti-inflammatory responses. By comparing translational efficiencies of immune-related transcripts in macrophages from wild-type (WT) and 4E-BP1/2 double knockout (DKO) mice, we found that translation of mRNAs encoding two major regulators of inflammation, interleukin-10 (IL-10) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2/cyclooxygenase-2 (PTGS2/COX-2), is controlled by 4E-BP1/2. Genetic deletion of 4E-BP1/2 in macrophages increased endogenous IL-10 and prostaglandin E₂ (PGE₂) protein synthesis in response to TLR4 stimulation and reduced their bactericidal capacity. The molecular mechanism involves enhanced anti-inflammatory gene expression (*sll1ra*, *Nfil3*, *Arg1*, *Serpinb2*) owing to the increase in IL-10-STAT3 and PGE₂-C/EBP β signaling. These data provide evidence that 4E-BP1/2 contribute to limit anti-inflammatory responses in macrophages, and suggest that deregulated activity of 4E-BP1/2 might be involved in reprogramming of the translational and downstream transcriptional landscape of macrophages during pathological conditions, such as infections and cancer.

Introduction

In eukaryotes, translational control (i.e. regulation of the efficiency of mRNA translation) mostly occurs at the rate-limiting initiation step during which the ribosome is recruited to the mRNA (Jackson *et al.*, 2010b). This process is facilitated by the eukaryotic translation initiation factor 4F (eIF4F), a heterotrimeric complex consisting of eIF4E, the mRNA 5'-m⁷G-cap-binding subunit; eIF4A, an RNA helicase; and eIF4G, a scaffolding protein. Assembly of eIF4F is blocked by a reversible association between eIF4E and eIF4E-binding proteins (4E-BPs), a family of repressor proteins that, in mammals, comprises 4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3 (Siddiqui & Sonenberg, 2015). The mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1) phosphorylates 4E-BP1 and 4E-BP2 (4E-BP1/2), promotes their dissociation from eIF4E, and thereby enables the assembly of a functional eIF4F complex. Conversely, in conditions of mTORC1 inhibition, hypophosphorylated 4E-BP1/2 and inducible 4E-BP3 bind with high affinity to eIF4E, prevent the formation of the eIF4F complex and thereby inhibit initiation of translation (Gingras *et al.*, 2001a; Tsukumo *et al.*, 2016a).

Translational control enables cells to rapidly adjust their proteomes in response to stress without the requirement of *de novo* mRNA synthesis (Masvidal *et al.*, 2017b). The ability to quickly modulate gene expression is a key feature of the immune system; therefore, several innate immune regulators are under translational control. For example, analysis of the translome (i.e. the transcriptome-wide pools of efficiently translated mRNA) in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from *Eif4ebp1*^{-/-}/*Eif4ebp2*^{-/-} double knockout (4E-BP1/2 DKO) mice identified *Irf7* as an mRNA translated in a 4E-BP1/2-sensitive fashion (Colina *et al.*, 2008). Moreover, similar studies on MEFs from mice mutated at the residue where eIF4E is phosphorylated (i.e. eIF4E S209A knock-in (KI)) demonstrated that translational efficiency of *Ikbα*, the inhibitor of NF-κB, is controlled by the MNK-eIF4E axis (Furic *et al.*, 2010; Herdy *et al.*, 2012a). The transcription factors IRF-7 and NF-κB promote the activation of *Ifnα* and *Ifnβ* genes (Honda *et al.*, 2005; Visvanathan & Goodbourn, 1989). Accordingly, 4E-BP1/2 DKO and eIF4E KI MEFs and mice are resistant to viral infections owing to enhanced type I IFN responses (Colina *et al.*, 2008; Furic *et al.*, 2010; Herdy *et al.*, 2012a). These findings support the notion that eIF4E-dependent translational control constitutes an important regulatory mechanism of innate immune responses. Yet, these studies used MEFs and therefore, may not reflect the entire transcript repertoire under translational control in immune cells.

Macrophages are sentinels of the innate immune system that alter their phenotype, ranging from inflammatory to regulatory and anti-inflammatory depending on the environmental cues (Murray & Wynn, 2011). Selective changes in translational efficiency direct macrophage differentiation (Kristensen *et al.*, 2013a) and activation (Chan *et al.*, 2012; Liepelt *et al.*, 2014; Schott *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012a). This includes the response to cytokines and TLR ligands, where regulation of mTORC1 and MNK signaling modulates translational efficiency of immune-related transcripts (Chan *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012a). Moreover, previous studies conducted in MEFs demonstrated that 4E-BP1/2 play a crucial role in translational control of antiviral innate immunity (Colina *et al.*, 2008; Nehdi *et al.*, 2014). Consistently, 4E-BP1/2 are involved in macrophage resistance to infection by a protozoan parasite through type I interferon- and nitric oxide-mediated mechanisms (Jaramillo *et al.*, 2011). These findings indicate that 4E-BP1/2 regulate macrophage pro-inflammatory and microbicidal functions via selective changes in translational efficiencies; however, the identity of such transcripts remains unknown. Notably, the impact of 4E-BP1/2-dependent translational control in macrophage anti-inflammatory responses is yet to be investigated. Here we show that translational efficiency of mRNAs encoding anti-inflammatory mediators, interleukin-10 (IL-10) and cyclooxygenase-2 (COX-2), is regulated through 4E-BP1/2, which thereby modulate the anti-inflammatory phenotype of macrophages.

Materials and Methods

Reagents

Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* serotype 0111:B4) and cycloheximide were purchased from Sigma-Aldrich. NS-398 was provided by Cayman Chemical. Rat monoclonal antibody against mouse IL-10 (#MAB417) and rat IgG1 isotype control (#MAB005) were obtained from R&D Systems. BP-1-102 was purchased from Selleck Chemicals. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 0.05% EDTA-Trypsin, penicillin and streptomycin were provided by Wisent.

Differentiation of bone marrow-derived macrophages

Hind legs from *Eif4ebp1*^{-/-}/*Eif4ebp2*^{-/-} C57BL/6 mice (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011) and their wild-type C57BL/6 littermates, originally purchased from The Jackson Laboratories,

were kindly provided by Dr. Nahum Sonenberg (McGill University, Montreal, QC, Canada). All procedures were in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité institutionnel de protection des animaux of the INRS (CIPA #1611-10). Bone marrow precursor cells were extracted from the femurs and tibiae for differentiation into bone marrow-derived macrophages (BMDM). Briefly, marrow was flushed from femurs and tibiae maintained in HBSS (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 4.2 mM sodium bicarbonate, 20 mM HEPES) at 4°C. Precursor cells were resuspended in BMDM culture medium (DMEM, 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamate, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) supplemented with 15% L929 fibroblast-conditioned culture medium (LCCM). Cells were seeded in 10 cm-diameter tissue culture-treated dishes, and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. The following day, non-adherent cells were collected, resuspended in BMDM culture medium supplemented with 15% LCCM, and plated in 10 cm-diameter non-treated Petri dishes (~5 dishes/mouse). LCCM was added every 2 days (~1.5 ml/dish), and differentiated BMDM were collected at 8 days after marrow extraction. Differentiation of precursor cells into macrophages was routinely assessed by monitoring for CD11b and F4/80 co-expression by flow cytometry using APC anti-mouse/human CD11b antibody #101211 and PE anti-mouse F4/80 antibody # 123109 (Biolegend), as previously described (Leroux *et al.*, 2015).

Polysome-Profiling and RNA extraction

Samples were processed for polysome-profiling and RNA fractionation as previously described (Jaramillo *et al.*, 2011). BMDM were seeded in 15 cm-diameter culture dishes (3×10^7 cells/plate) in DMEM containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and supplemented with 10% FBS and 1% LCCM. A total of 9×10^7 cells per genotype were used to generate each polysome profile. Cells were treated with 100 mg/ml cycloheximide for 5 min and were washed three times with cold PBS containing 100 µg/ml cycloheximide. Cells were centrifuged at 200 x g for 10 min at 4°C and lysed in hypotonic lysis buffer containing 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 100 µg/ml cycloheximide, 2 mM DTT, 0.5% Triton-X-100, 0.5% sodium deoxycholate and 200 U RNasin (Promega). Lysates were cleared by centrifugation (20,000 x g, 2 min at 4°C). A 50 ml sample was collected (10% of the lysate) to isolate cytoplasmic RNA using TRIzol (Invitrogen). Five to 50% (w/v) sucrose density gradients (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM KCl, 5mM MgCl₂) were generated using a Gradient Master 108 (Biocomp). Samples were loaded onto the sucrose gradients and subjected to ultracentrifugation at 221, 830.9 x g (SW 41

rotor, Beckman Coulter) for 2 h at 4°C. Sucrose gradients were fractionated (35 s for each fraction = 750 ml per fraction) by displacement by 60% sucrose/0.01 % bromophenol blue. The optical density at 254 nm was continuously recorded using a BR-188 Density Gradient Fractionation System (Brandel). Fractions were flash-frozen immediately after fractionation and stored at -80°C. RNA from each fraction was isolated using TRIzol and purified using the RNeasy Kit (Qiagen). Fractions with mRNA associated to > 3 ribosomes were pooled (polysome-associated mRNA).

NanoString nCounter Assays and Data Analysis

RNA samples from three independent biological replicas were prepared for NanoString nCounter assays and analyzed as previously described (Larsson *et al.*, 2012). In addition to polysome-associated mRNA samples described above, a parallel sample was collected from the lysates loaded onto the sucrose gradient (total cytoplasmic mRNA) and RNA was isolated using TRIzol and purified using the RNeasy Kit. RNA quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Next, 150 ng RNA was used as input for the NanoString nCounter assays using the nCounter[®] Mouse Immunology Panel (NanoString). Data were generated as previously described (Geiss *et al.*, 2008). For NanoString data analysis, the obtained counts were log₂-transformed. Per sample normalization was performed using geometric means from three housekeeping genes (*Rpl19*, *Eef1g*, and *Gapdh*). Differential translation (FDR < 0.25) was identified using anota (Larsson *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2011), which corrects changes in polysome-associated mRNA for changes in cytoplasmic total mRNA, applies variance-shrinkage (the random variance model [RVM]) and adjusts the *P* values for multiple testing using the Benjamini and Hochberg's false-discovery rate (FDR) method. The translational activity in 4E-BP1/2 DKO cells (i.e. the intercepts from analysis of partial variance [APV]) were obtained for those mRNAs that are translationally up-regulated and compared to WT control cells to obtain relative changes in translational efficiency.

5' UTR Analysis

5'UTRs of transcripts from the top 11 gene hits were retrieved from the mm10 genome build using the UCSC Table Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Minimum free energy (MFE) and secondary structures were obtained from the "foldUtr5" table which contains MFE structures

computed using RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011). Secondary structures were plotted using VARNA (Darty *et al.*, 2009).

Quantitative RT-PCR

Pools of efficiently translated mRNAs (i.e. mRNAs associated to > 3 ribosomes) and total cytoplasmic RNA were isolated using TRIzol (Invitrogen). RNA (1 mg) was reverse transcribed with Superscript III reverse transcriptase and oligo(dT) (both from Invitrogen). Quantitative PCR was performed with PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions using a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosciences). Analysis was carried out by relative quantification using the Comparative CT method ($\Delta\Delta Ct$) (Taylor *et al.*, 2010). Experiments were performed in independent biological replicates (n=3), whereby each sample was analyzed in a technical triplicate. Relative mRNA expression was normalized to *Gapdh* and *Rpl19*. Primers were designed using NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The list of primers is provided in Supplemental Table I.

Western blot analysis

BMDM were seeded in 6-well plates (2×10^6 cells/well). After stimulation, cells were scraped in cold PBS pH 7.4, collected by centrifugation and lysed in cold RIPA buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, supplemented with phosphatase and EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche). Cell debris was removed by centrifugation at $20,000 \times g$ for 15 min at 4°C and total protein content was determined using the BCA Protein Assay kit (Pierce). Whole-cell protein extracts were subjected to SDS-PAGE and the separated proteins were transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h in 5% skim milk TBS-T (0.1 % Tween 20) and incubated with specific primary antibodies O/N at 4°C. Proteins were then detected with IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibodies by chemiluminescence using Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad). Antibodies detecting phospho-4E-BP1 (T37/46) (#2855), phospho-4E-BP1 (T70) (#9455), phospho-4E-BP1 (S65) (#9451), 4E-BP1 (#9452), 4E-BP2 (#2845), COX-2 (#4842), CEBP/b (#3087), eIF4G (#2498), phospho-STAT3 (Y705) (#9145), STAT3 (#9139), and b-actin (#3700) were obtained from Cell Signaling Technology. The antibody detecting sIL-1Ra

(#MAB4801) was purchased from R&D Systems. The anti-NFIL-3 antibody (#685402) was provided by Biolegend. The following secondary HRP-conjugated antibodies were used in this study: anti-rabbit IgG (#A0545) and anti-mouse IgG (#A4416) from Sigma-Aldrich, and anti-rat IgG (#HAF005) from R&D Systems.

m⁷GTP-agarose pull down assays

BMDM were plated in 10 cm-diameter plates (1.5×10^7 cells/plate). Cell treatment was followed by lysis in ice-cold Buffer A (lysis buffer; 50 mM MOPS pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% IGEPAL CA-630, 1% sodium deoxycholate, 7 mM β -mercaptoethanol) supplemented with phosphatase and EDTA-free protease inhibitor cocktails. Samples were incubated 15 min on ice and regularly mixed gently, and the crude lysates were cleared by centrifugation. About 0.5 mg of proteins of each sample were mixed with 50% slurry of 2'/3'-EDA-m⁷GTP immobilized on agarose beads (#AC-142S, Jena Bioscience) and diluted up to 1 ml with Buffer B (wash buffer; 50 mM MOPS pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 7 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM GTP) supplemented with phosphatase and EDTA-free protease inhibitor cocktails. Samples were mixed for 1 h at 4°C with end-over-end mixing and beads were pelleted by centrifugation. The supernatants (i.e. flow-through, FT) were kept, while the beads were washed in Buffer B and finally resuspended in Laemmli loading buffer for further analysis by western blotting.

ELISA

Cells were seeded in 96-well plates (2×10^5 cells/well) and stimulated with 1-10 ng/ml *E. coli* LPS for 6, 12 or 24 h. Cell culture supernatant samples were collected and the concentration of secreted IL-10 and PGE₂ were assessed by ELISA using the mouse IL-10 ELISA MAX™ Deluxe kit (Biolegend) and the Prostaglandin E₂ ELISA Kit (Cayman Chemical), according to the manufacturer's instructions.

Image flow cytometry

BMDM were seeded in 6 cm-diameter non-treated plates (5×10^6 cells/plate) and were stimulated with 10 ng/ml LPS for 4, 6 or 10 h. After cell fixation and staining, samples were acquired on the ImageStreamX MarkII imaging cytometer (Amnis), as described (Hammami *et al.*, 2017). Briefly, BMDM were collected by trypsinization (0.05% EDTA-Trypsin) and fixed in 1.5% PFA. Cells

were permeabilized in ice-cold methanol and were washed twice with staining buffer (1% BSA-PBS). Supernatants were discarded and cells were incubated with an anti-CD16/32 antibody (BioLegend, #101302) for 15 minutes on ice. Cell staining was performed by a 25 min incubation on ice using the following fluorescent reagents and antibodies: 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma), A488-coupled anti-Y705-STAT3 (BD Bioscience, #557814), A488-coupled isotype control (BD Bioscience, #558055), A647-coupled anti-b-actin (Cell Signaling, #8584), A647-coupled isotype control (Cell Signaling, #3452). Next, cells were washed twice with staining buffer and samples were acquired on the ImageStreamX MarkII imaging cytometer (Amnis). Bright field and fluorescent images were collected at 40X magnification. Ten- to thirty-thousand cell singlets were gated from each sample. The analysis was performed using the IDEAS software (Amnis).

Bacterial Infection

BMDM were seeded in 24-well plates (5×10^5 cells/well) and treated with 10 ng/ml LPS with or without 2 mg/ml anti-IL-10 antibody and 50 mM NS-398 for 24h before infection. Conditioned media was present throughout the entire experiment. Bacterial infection was carried out as previously described (Daigle *et al.*, 2001). Briefly, *E. coli* MG 1655 (non-pathogenic strain) was grown overnight at 37 °C and then sub-cultured at a dilution of 1:4 in fresh Luria-Bertani (LB) broth without antibiotics to mid-logarithmic phase ($OD_{600} \sim 0.1$). BMDM were infected with 2.5×10^6 bacteria (5:1 ratio) and centrifuged for 10 min at 500 x g to synchronize phagocytosis. BMDM were cultured in 1% FBS DMEM without antibiotics at 37 °C for 2 h and after three washes in PBS treated with 100 µg/ml gentamicin for 1 h to eliminate extracellular bacteria. The infected cells were either lysed in 1% Triton X-100 to assess bacterial invasion (t=0) or further incubated for a total of 6, 8 or 24 h in presence of 12 µg/ml gentamicin. When indicated, 10 ng/ml LPS with or without 2 mg/ml anti-IL-10 antibody and 50 mM NS-398 were added to cells 24 h before infection and were also present during the subsequent steps of infection. Surviving bacteria were determined as colony-forming-units (CFU) by plating serial dilutions (1/10) of whole cell lysates in LB agar.

Statistical Analysis

nCounter data were analyzed using the anota “R” package to identify mRNAs under translational control between WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (Larsson *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2011). Statistical differences were calculated using two-way ANOVA embedded in GraphPad Prism 7 software package. Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of the mean. Differences were considered to be statistically significant when * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Results

The eIF4E-binding proteins 1 and 2 control translational efficiency of *Interleukin-10* and *Cyclooxygenase-2* mRNAs in macrophages

mTORC1 orchestrates effective immune responses through a number of effectors including the translational repressors 4E-BP1/2 (Colina *et al.*, 2008; Nehdi *et al.*, 2014; Piccirillo *et al.*, 2014). However, the impact of 4E-BP1/2 on selective translational control in macrophages and the effects on anti-inflammatory responses remain largely unexplored. To begin addressing this issue, cytosolic RNA from WT and 4E-BP1/2 DKO bone marrow-derived macrophages (BMDM) at steady-state was subjected to polysome-profiling (Jaramillo *et al.*, 2011). Polysome-profiling generated a pool of efficiently translated mRNA that was quantified in parallel with total cytosolic mRNA (input) using targeted nCounter® assays (mouse immunology panel) (**Fig. 3.1A**). Herein, translational efficiency is defined as the proportion of the mRNA copies transcribed from a gene that are in heavy polysomes (in this case associated with >3 ribosomes) and hence efficiently translated. Changes in polysome-associated mRNA levels can be due to altered translational efficiency or to changes in mRNA levels (e.g. via altered transcription or mRNA stability) (Masvidal *et al.*, 2017b). To identify mRNAs whose translation depends on 4E-BP1/2 in BMDM, we employed the “anota” algorithm, which specifically captures differences in translational efficiency of individual transcripts independent of changes in total mRNA levels, i.e. changes in the amount of mRNA copies associated with heavy polysomes after adjusting for changes in total cytosolic mRNA (Larsson *et al.*, 2011). We thereby identified 11 mRNAs more efficiently translated in 4E-BP1/2 DKO as compared to WT BMDM (**Supplemental Table II**). Among the most regulated transcripts were *Il-10* and *Cox-2/Ptgs2*, which encode proteins involved in macrophage anti-inflammatory responses. The graphical representation of anota analysis illustrates that *Il-10* mRNA was more abundant in the pool of polysome-associated mRNA in 4E-BP1/2 DKO than in WT BMDM despite having similar total cytosolic mRNA levels (2.48 fold-change in translational efficiency) (**Fig. 3.1B**). Similarly, translational efficiency of *Cox-2* mRNA was up-regulated in the absence of 4E-BP1/2 (4.20 fold-change) (**Fig. 3.1C**). In Figs. 1B-C, each biological replicate is represented by an “X” and the lines correspond to regressions used by anota to adjust changes in polysome-associated mRNA levels (y-axis) for changes in total cytosolic mRNA levels (x-axis). A difference in intercepts of the regression lines on the y-axis (i.e. when total cytosolic mRNA is set to 0) indicates changes in translational efficiency (when there is no change in translational efficiency, there is no difference in intercept). In summary, this

analysis demonstrates that *Il-10* and *Cox-2* mRNAs are under the control of the translational repressors 4E-BP1/2 DKO in BMDM at steady state.

Select translational control through the mTORC1-4E-BP1/2-eIF4E axis is associated with distinct features in the 5' UTRs of mRNAs (Gandin *et al.*, 2016; Masvidal *et al.*, 2017b; Morita *et al.*, 2015). To assess whether the identified immune-related transcripts under translational control contain such features, we conducted 5' UTR analysis. Eight of these mRNAs (*Il1a*, *Il1b*, *Il10*, *Il12b*, *Ccl5*, *Ccl12*, *Cd40*, and *Cxcl10*) harbor relatively short 5' UTRs (between 50 and 90 nucleotides (nt)) with minimum free energy (MFE) ranging from -5 to -30 kcal/mol (**Fig. 3.1D** and **Supplemental Table III**). In addition, we identified 4 mRNAs (*Cox-2*, *Ifit2*, *Il1b*, and *Mx1*) that contain longer 5' UTRs (up to ~1300 nt) with MFE as low as -487.3 kcal/mol. Exceptionally, several 5' UTR sequences are annotated for *Il1b* and *Mx1* (3 and 5, respectively), which differ in length and structure. Interestingly, the 5' UTR of *Il-10* is relatively short (67 nt and MEF = -12.3 kcal/mol) whereas that of *Cox-2* is longer and more structured (193 nt and MEF = -48.92 kcal/mol) (**Fig. 3.1E**), indicating that these may be regulated by distinct mechanisms. Thus, selective 4E-BP1/2-dependent translational control of immune-related mRNAs in macrophages could at least partially be linked to the length and structure of their 5' UTRs, as previously reported for transcripts that are highly sensitive to eIF4E levels and / or availability (Gandin *et al.*, 2016; Masvidal *et al.*, 2017b; Morita *et al.*, 2015).

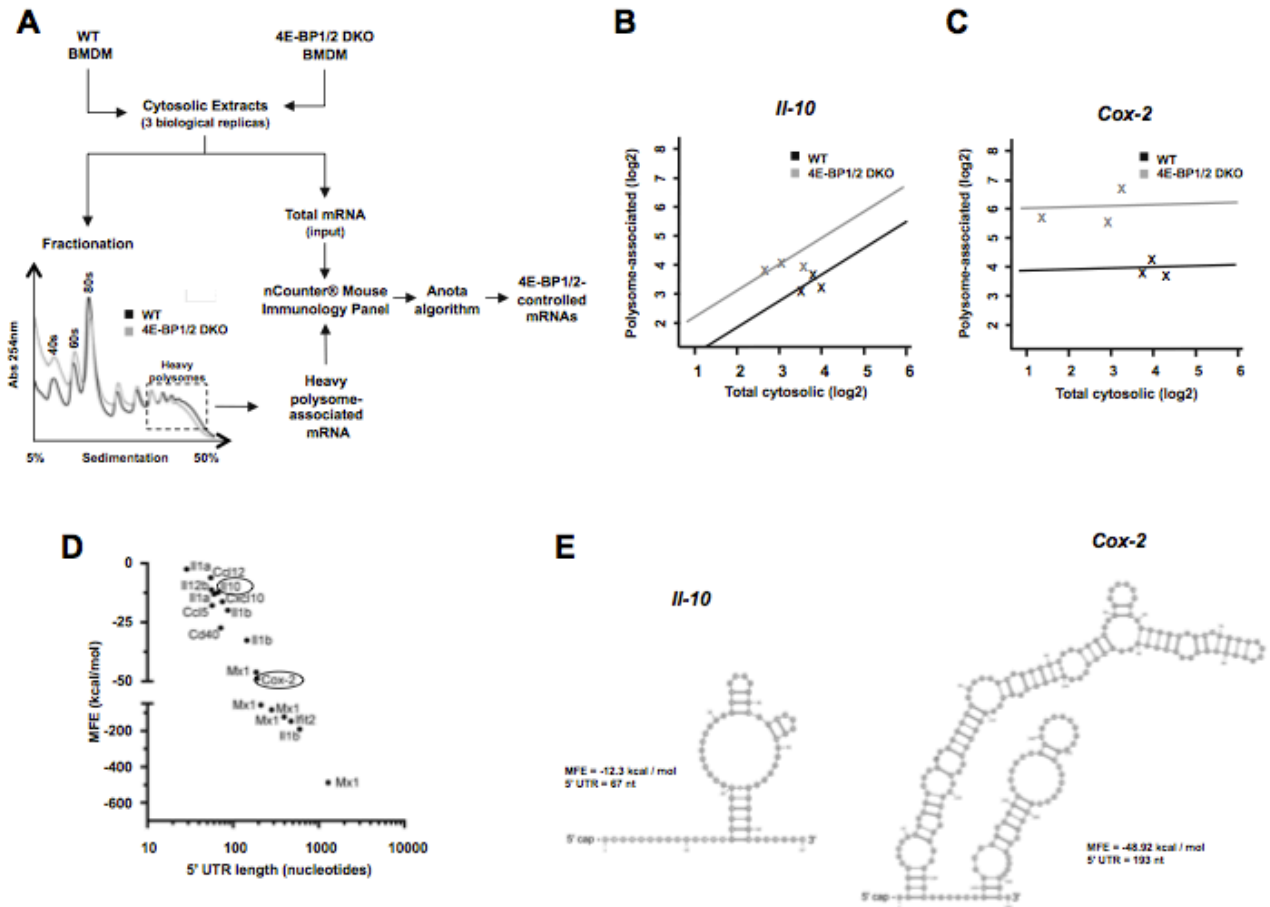


FIGURE 3.1. 4E-BP1/2 limit translational efficiency of *Il-10*, *Cox-2* and other immune-related mRNAs in macrophages.

(A) Cytosolic extracts from WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM were sedimented on a sucrose gradient. Heavy polysome fractions (i.e. with mRNA associated to > 3 ribosomes) were pooled (referred to as polysome-associated mRNA) and quantified in parallel with total mRNA using targeted nCounter assays (towards mRNAs encoding immune related proteins) (n=3). Translational efficiency of *Il-10* (B) and *Cox-2* (C) in 4E-BP1/2 DKO cells as compared to WT cells. Shown is the fold-increase (log₂) in cytosolic mRNAs levels (x-axis) vs. polysome-associated mRNAs levels (y-axis) for each genotype. The lines indicate the regressions used by anota to adjust changes in polysome-associated mRNA levels for changes in cytosolic mRNA levels. (D) MFE and 5' UTR length of top 11 immune-related mRNAs identified by anota as targets of 4E-BP1/2-dependent translational control in macrophages. (E) Secondary structures of mouse *Il-10* and *Cox-2* 5' UTRs as predicted by RNAfold.

LPS promotes *Interleukin-10* mRNA translation by limiting the activity of 4E-BP1 and 4E-BP2

After having identified *Il-10* and *Cox-2* as targets of translational control downstream of 4E-BP1/2, we set out to elucidate the biological impact of such regulation in macrophage anti-inflammatory responses. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS), a TLR4 ligand, regulates a large number of immune cell functions by controlling gene expression at the levels of transcription, mRNA stability, and mRNA translation (Eichelbaum & Krijgsveld, 2014). Activation of mTORC1 signaling is required for IL-10 production in LPS-stimulated macrophages (Weichhart *et al.*, 2011). However, it remains unclear whether this increase is, at least in part, dependent on regulation of *Il-10* translational efficiency via the mTORC1-4E-BP1/2 axis. To address this, WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM were stimulated with 10 ng/ml *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS for 4 h and cytoplasmic RNA was fractionated by polysome-profiling (**Fig. 3.2A**). RT-qPCR analyses for *Il-10* were conducted in total cytosolic and heavy polysome-associated RNA isolated from control (unstimulated) and LPS-treated cells. Consistent with selective modulation of IL-10 via changes in translational efficiency, the amount of heavy polysome-associated mRNA encoding *Il-10* was higher in 4E-BP1/2 DKO than in WT control cells (2.8 fold-increase) (**Fig. 3.2B**) while total cytosolic *Il-10* mRNA, although slightly higher (1.5 fold-change) did not fully explain this difference. Notably, we also observed greater accumulation of *Il-10* mRNA associated to heavy polysomes in 4E-BP1/2 DKO than in WT cells after LPS treatment (7.6 fold-change), which was only partly explained by changes in total cytosolic mRNA levels (3.6 fold-change), and therefore is consistent with activated translation of *Il-10* mRNA in 4E-BP1/2 DKO macrophages as compared to WT counterparts following LPS exposure (**Fig. 3.2B**). To further assess differences in translational efficiency of *Il-10* between WT and 4E-BP1/2 DKO cells, we monitored *Il-10* mRNA distribution in subpolysomal, light polysome and heavy polysome fractions. Note that subpolysomal fractions contain mRNAs that are not efficiently translated (i.e. free mRNAs or associated with 1 ribosome). In light polysome fractions, mRNAs are associated with > 1 and ≤ 3 ribosomes and therefore are not translated as efficiently as those found in heavy polysome fractions (mRNAs associated with > 3 ribosomes). In control WT cells, 60.1% of *Il-10* mRNA was found in subpolysomal fractions and the remaining 39.9% was equally distributed in the light and heavy polysome fractions (19.9% and 20%, respectively) (**Fig. 3.2C**, left top panel). In contrast, only 29.5% of *Il-10* mRNA was present in subpolysomal fractions of 4E-BP1/2 DKO BMDM (30.6% less in DKO than WT), which resulted in greater *Il-10* mRNA amount in light and heavy polysome fractions (37.6% and 32.9%, respectively). Further supporting that LPS promotes *Il-10* translation by inactivating 4E-BP1/2, we observed a

significant shift in the distribution of *Il-10* mRNA from subpolysomal to light polysome fractions of LPS-treated WT cells as compared to control (~25.7% increase in *Il-10* accumulation in light polysomes) (**Fig. 2C**, left vs right top panels, WT). Conversely, no apparent differences were detected between control and stimulated 4E-BP1/2 DKO BMDM (**Fig. 3.2C**, left vs right top panels, DKO). Distribution of *Gapdh* across polysome profiles indicated that, in contrast to *Il-10*, this mRNA is efficiently translated in both WT and 4E-BP1/2-deficient cells (**Fig. 3.2C**, bottom panels). These observations are in line with the notion that 4E-BP1/2 control translational efficiency of select transcripts. In keeping with greater *Il-10* mRNA translational efficiency, we detected a significant up-regulation of IL-10 protein secretion by 4E-BP1/2 DKO BMDM stimulated with LPS as compared to WT cells (3078 vs 1762 pg/ml) (**Fig. 3.2D**). Consistent with the involvement of the mTORC1-4E-BP1/2 axis in the regulation of IL-10 production, active site mTOR inhibitor (asTORi) PP242 reduced IL-10 induction by LPS in WT BMDM (35% reduction) but had no effect in 4E-BP1/2 DKO counterparts (**Supplemental Fig. 1A**). In support of the role of 4E-BP1/2 in modulating translation in response to LPS, a substantial increase in 4E-BP1/2 phosphorylation at T37/46, T70 and S65 (**Fig. 3.2E**), and a dramatic reduction in the interaction of 4E-BP1/2 with eIF4E (**Fig. 3.2F**) were detected in LPS-stimulated as compared to untreated BMDM. Accordingly, the amount of eIF4G bound to eIF4E augmented upon LPS exposure. Thus, LPS leads to 4E-BP1/2 inactivation and thereby promotes eIF4F complex formation in macrophages. Note that similar total cytosolic and heavy polysome-associated *Tlr4* mRNA levels were found in WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (**Supplemental Fig. 1B**), ruling out the possibility that enhanced responses to LPS in 4E-BP1/2 deficient cells were caused by higher *Tlr4* transcription and/or translation. Overall, these data provide evidence that, in addition to activating *Il-10* transcription, LPS promotes *Il-10* mRNA translation in macrophages by dampening the activity of the inhibitory proteins 4E-BP1/2.

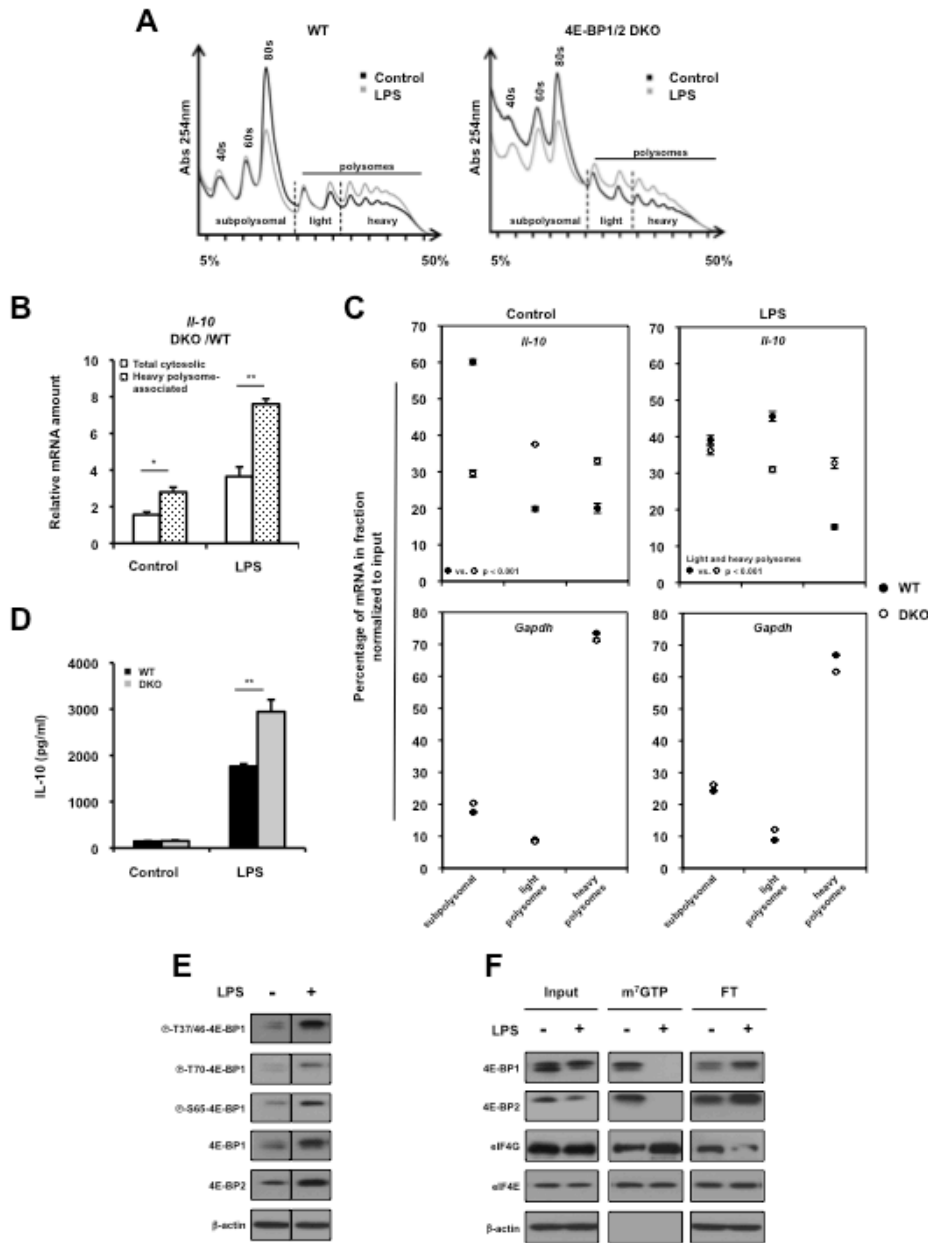


FIGURE 3.2. LPS-induced *IL-10* mRNA translation is under the control of 4E-BP1/2.

(A) WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM were left untreated (control) or stimulated with 10 ng/ml LPS for 4 h. Cytosolic extracts were loaded onto 5–50% sucrose gradients and sedimented by ultracentrifugation. Polysome tracings were generated by recording the UV absorbance at 254 nm. Subpolysomal, light, and heavy polysome fractions were pooled for further mRNA isolation and quantification (n = 3). (B) RT-qPCR of total cytosolic and heavy polysome-associated *IL-10* mRNA in control and LPS-stimulated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM. Results are shown as mean values \pm 6 SD of 4E-BP1/2 DKO/WT (fold increase in DKO over WT normalized to *Gapdh*) (n = 3). (C) Amount of *IL-10* (top panels) and *Gapdh* (bottom panels) mRNA in subpolysomal, light polysome, and heavy polysome fractions isolated from cells described in (A) were determined by RT-qPCR. Experiments were carried out in independent duplicates, each consisting of a triplicate. Data are expressed as percentage of a given mRNA in each fraction. (D) IL-10 protein secreted by WT and 4E-BP1/2 DKO cells untreated (control) or stimulated with LPS for 12 h (mean values \pm 6 SD, n = 3). (E) Total proteins were extracted and separated by SDS-PAGE. Phosphorylation status and expression levels of 4E-BP1/2 were monitored by Western blotting using phospho-specific and total Abs, respectively. β -Actin was used as loading control. Note that images were obtained after the same time of exposure of a single film in contact with one membrane. Scans were cropped to remove unrelated samples that were loaded on the same gel. (F) Cell lysates were processed for m⁷GTP-agarose pull-down assays to assess changes in the interaction between cap-bound eIF4E and 4E-BP1, 4E-BP2, or eIF4G (m⁷GTP panels). The phosphorylation status of 4E-BP1/2 was monitored in total extracts (input panels). Unbound 4E-BP1, 4E-BP2, and eIF4G levels were detected in flow-through (FT) samples. (E and F) Data are representative of at least two independent biological replicates. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

4E-BP1 and 4E-BP2 control the activity of the transcription factor STAT3 via translational repression of IL-10

IL-10 induces expression of anti-inflammatory genes via the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Hutchins *et al.*, 2012b; Saraiva & O'Garra, 2010). Therefore, in the absence of 4E-BP1/2, enhanced translational efficiency of *Il-10* and elevated IL-10 secretion may promote STAT3 activity. To test this hypothesis, WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM were stimulated with LPS for various time periods and the phosphorylation status of STAT3 was assessed by western blotting. As previously reported (Carl *et al.*, 2004), LPS treatment induced STAT3 phosphorylation at Y705 (Y705-STAT3) in WT BMDM. Notably, this response was markedly amplified in the absence of 4E-BP1/2 (**Fig. 3.3A**, top panel), reaching maximal differences between 4 and 6 h post-stimulation (~3 fold-change DKO/WT) (**Fig. 3.3A**, bottom panel). In parallel, culture supernatants were collected from the same cells to quantify the amount of IL-10 by ELISA. As predicted, greater secretion of IL-10 in 4E-BP1/2 DKO cells followed a similar kinetics to that of Y705-STAT3 phosphorylation (**Supplemental Fig. 1C**). Accordingly, when the activity of IL-10 was blocked using a neutralizing antibody (**Supplemental Fig. 1D**), Y705-STAT3 phosphorylation was abrogated in both WT and BP1/2 DKO cells (**Fig. 3.3B**). This set of experiments indicates that higher endogenous production of IL-10 is responsible for the increase in Y705-STAT3 phosphorylation in LPS-stimulated 4E-BP1/2 DKO as compared to WT BMDM. Further supporting this notion, WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM expressed the same levels of total cytosolic and heavy polysome-associated *Il-10r1* and *Il-10r2* mRNA (**Supplemental Fig. 1E**), confirming that up-regulated IL-10 signaling in 4E-BP1/2 DKO over WT cells is not caused by differential transcription and/or translation of the IL-10 receptor. Phosphorylation of STAT3 at Y705 is a requirement for its dimerization and translocation to the nucleus (Carl *et al.*, 2004). In agreement with our western blot data, time course experiments analyzed by image flow cytometry revealed that STAT3 nuclear translocation is enhanced in 4E-BP1/2 DKO BMDM. Differential nuclear levels of STAT3 were observed as early as 4 h following LPS stimulation and were sustained up to 10 h (**Figs. 3.3C-D**). Nuclear STAT3 was found in 75.7% of Y705-STAT3⁺ 4E-BP1/2 DKO BMDM at 4 h post-treatment (**Fig. 3.3D**, right panel). By contrast, nuclear translocation of STAT3 was detected in only 45% of Y705-STAT3⁺ WT cells. Notably, nuclear levels of STAT3 remained higher in 4E-BP1/2 DKO BMDM for a longer period of time, as evidenced by the presence of nuclear STAT3 in 29% Y705-STAT3⁺ 4E-BP1/2 DKO versus 15.5% WT cells at 10 h post-stimulation. Altogether, these data provide evidence that elevated STAT3 activity in 4E-BP1/2 DKO cells is triggered by translational derepression of *Il-10*, which enhances the secretion and the autocrine effect of IL-10.

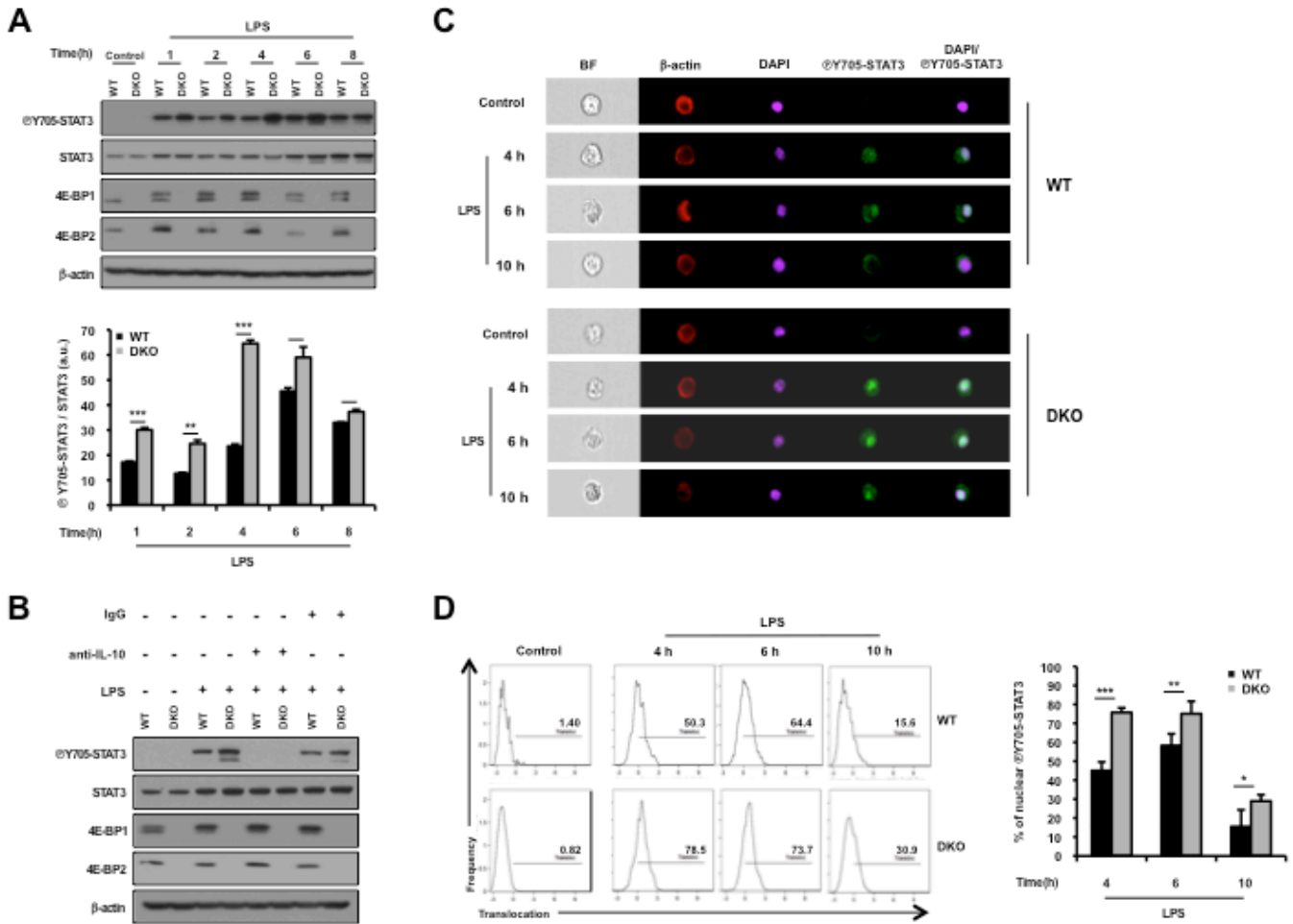


FIGURE 3.3. 4E-BP1/2 regulate STAT3 activity by limiting the autocrine effect of endogenous IL-10 in LPS-stimulated macrophages.

(A) WT and 4E-BP1/2 DKO cells were treated with LPS for the indicated time. Phosphorylation status and STAT3 levels were monitored by Western blotting using phospho-specific and total Abs against STAT3, respectively. 4E-BP1/2 Abs were employed as controls for cell genotype. β -Actin served as loading control (top panel). Quantification of Y705-STAT3 phosphorylation (normalized to total STAT3) in LPS-stimulated cells using ImageJ (mean \pm 6 SD, $n = 3$) (bottom panel). (B) Cells were stimulated with LPS with or without 2 mg/ml anti-IL-10 or anti-IgG1 isotype control for 4 h. STAT3 phosphorylation at Y705 was assessed by Western blotting. (C) Representative images captured by image flow cytometry (original magnification 340) showing nuclear translocation of STAT3 in WT and 4E-BP1/2 DKO cells untreated (control) or stimulated with LPS at the indicated time. Control samples were collected at 10 h. From left to right, Bright-field (BF) image, β -actin (red, cytoplasm), DAPI (purple, nucleus), phospho-Y705-STAT3 (green), and DAPI/phospho-Y705-STAT3 merge (white, indicates nuclear colocalization). (D) Quantification of STAT3 nuclear translocation in phospho-Y705 STAT3⁺ cells. Representative histogram showing the percentage of phospho-Y705-STAT3 present in the nucleus after LPS exposure for the indicated time (left panel). Shown are mean values \pm 6 SD of three independent biological replicates (right panel). (A–C) Data are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4E-BP1 and 4E-BP2 regulate the expression of IL-10-STAT3-dependent anti-inflammatory genes *Nfil3* and *sll1ra* in macrophages

Activation of the transcription factor STAT3 is required for anti-inflammatory responses induced by IL-10 (Hutchins *et al.*, 2013). CHIP-seq for STAT3 identified a large repertoire of anti-inflammatory factors that are controlled by STAT3 in IL-10-stimulated macrophages (Hutchins *et al.*, 2012a). Our data showing elevated STAT3 nuclear translocation in 4E-BP1/2 DKO BMDM prompted us to investigate whether the expression of IL-10-STAT3-responsive genes was altered in the absence of 4E-BP1/2. We focused on two genes that are transcriptionally controlled by LPS via IL-10-STAT3 signaling, *Nfil3* and *sll1ra*. Nuclear factor interleukin-3 regulated (NFIL-3) is a key component of a negative feedback loop that suppresses pro-inflammatory responses in myeloid cells by inhibiting *Il12b* transcription (Kobayashi *et al.*, 2011). Secreted interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1Ra) is a naturally occurring inhibitor of the pro-inflammatory action of IL-1 since it binds to the IL-1 receptor with high affinity but lacks IL-1-like activity (Hannum *et al.*, 1990). In keeping with previous reports (Carl *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2011), LPS up-regulated *Nfil3* and *sll1ra* mRNA expression in WT BMDM. This effect was substantially enhanced in 4E-BP1/2 DKO over WT cells, as evidenced by a 3.2 and a 1.8 fold-change in *Nfil3* and *sll1ra* mRNA levels, respectively (**Figs. 3.4A-B**). Accordingly, western blot analyses revealed that NFIL-3 and sIL-1Ra protein levels are higher in 4E-BP1/2 deficient cells treated with LPS than WT counterparts (~4 and ~2.5 fold-change DKO/WT, respectively) (**Fig. 3.4C**). BP-1-102, a small-molecule inhibitor of STAT3 activation (Zhang *et al.*, 2012), repressed Y705-STAT3 phosphorylation in LPS-stimulated BMDM in a dose-dependent manner (**Supplemental Fig. 1F**). Consistent with that *Nfil3* transcription is regulated by STAT3, BP-1-102 reduced *Nfil3* mRNA expression in WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (51% and 65%, respectively). Similarly, a decrease in *sll1ra* mRNA levels was detected in BP-1-102-treated cells (34% in WT and 39% in DKO) (**Fig. 3.4A**). Specific blockade of IL-10 activity with a neutralizing antibody reduced the expression of *Nfil3* and *sll1ra* to the same extent in WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (~40% decrease in *Nfil3* and ~30% in *sll1ra*) (**Fig. 3.4B**). Note that induction of *Nfil3* and *sll1ra* was significantly down-regulated but not completely abrogated by blocking either STAT3 or IL-10 activity in WT and 4E-BP1/2 DKO cells (**Figs. 3.4A-B**). Interestingly, augmented expression of *Nfil3* and *sll1ra* in 4E-BP1/2 DKO BMDM was markedly reduced by BP-1-102 or anti-IL-10 antibody but remained higher than in WT cells (**Figs. 3.4A-B**). Collectively, these results indicate that transcriptional activation of the anti-inflammatory genes encoding NFIL-3 and sIL-1Ra is reduced by the translational repressors 4E-BP1/2 mainly through the control of IL-10-STAT3-dependent signaling.

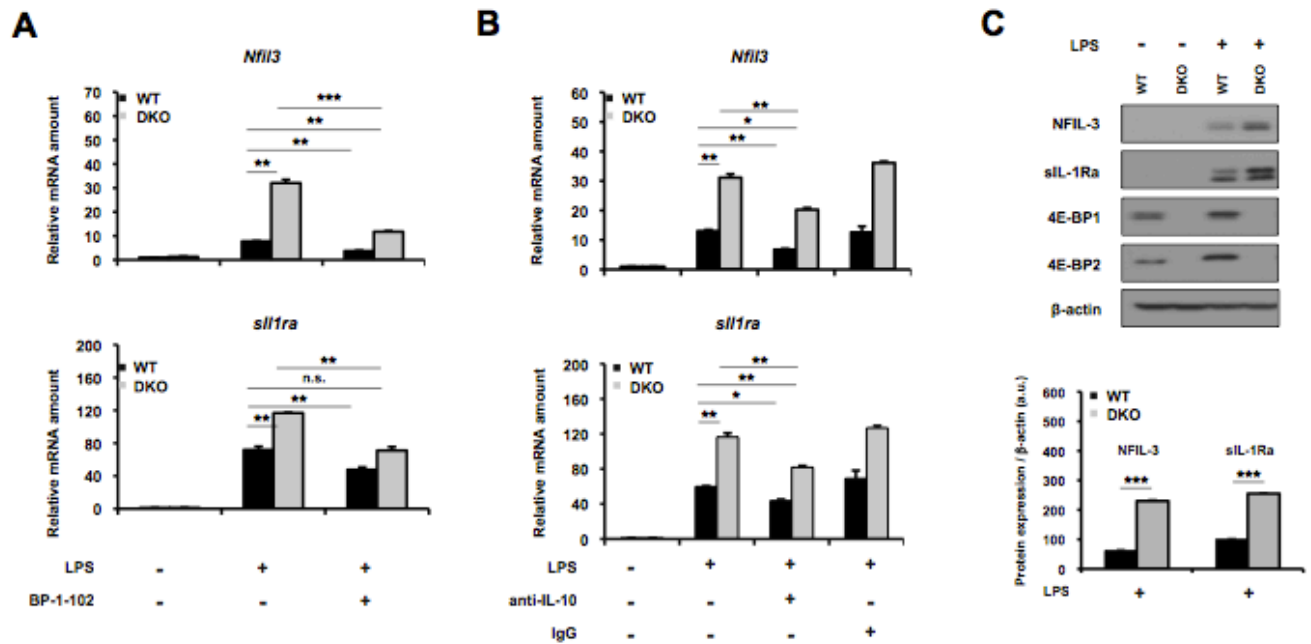


FIGURE 3.4. IL-10–STAT3-mediated anti-inflammatory responses are amplified in 4E-BP1/2 DKO macrophages.

WT and 4E-BP1/2 DKO cells were treated for 4 h with 10 ng/ml LPS with or without 2 mM BP-1-102 (**A**) or with LPS with or without 2 mg/ml anti-IL-10 or anti-IgG1 isotype control (**B**), and relative amounts of *Nfil3* and *sil1ra* mRNAs were quantified using RT-qPCR (normalized to *Rpl19*). (**C**) Western blots of NFIL-3 and sIL-1Ra were carried out in total protein extracts from control and LPS-treated cells (top panel). Quantification of Western blot analyses on NFIL-3 and sIL-1Ra (normalized to β -actin) by ImageJ (bottom panel). Results are presented as mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

4E-BP1 and 4E-BP2 negatively regulate Cox-2 mRNA translation and Prostaglandin E₂ synthesis

COX-2 is a rate-limiting enzyme in the production of prostaglandin E₂ (PGE₂), a lipid mediator involved in numerous physiological and pathological processes including inflammation (Na *et al.*, 2015). We found that translation efficiency of *Cox-2* mRNA is amplified in 4E-BP1/2 DKO as compared to WT BMDM at steady state (**Fig. 3.1C**). Therefore, we set out to investigate the impact of *Cox-2* translational control by 4E-BP1/2 in macrophage anti-inflammatory responses. To address this, we treated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM with LPS, isolated heavy polysome-associated mRNA and total cytosolic mRNA, and quantified *Cox-2* mRNA levels by RT-qPCR. In keeping with anota analysis of translational efficiency of *Cox-2* mRNA (**Fig. 3.1C**), there was a substantial increase in the amount of efficiently translated *Cox-2* mRNA in 4E-BP1/2 DKO cells as compared to WT at steady state (7.4 fold-change) without any detectable change in total cytosolic mRNA (1.03 fold-change) (**Fig. 3.5A**). The relative amount of *Cox-2* mRNA associated to heavy polysomes was also augmented after LPS stimulation in 4E-BP1/2 DKO as compared to WT BMDM (3.10 fold-change), without changes in total cytosolic mRNA levels (1.15 fold-change) (**Fig. 3.5A**). Confirming and extending these data, mRNA fractionation and quantification across polysome profiles showed a 30.3% reduction in *Cox-2* mRNA isolated from subpolysomal fractions of 4E-BP1/2 DKO BMDM DKO as compared to WT cells, which resulted in higher accumulation of *Cox-2* mRNA in light and heavy polysomal fractions (37.7% and 32% in DKO vs. 20 and 19.5% in WT) (**Fig. 3.5B**, top panel). Notably, LPS treatment led to a remarkable shift in the distribution of *Cox-2* mRNA from subpolysomal to light polysome fractions in WT BMDM, as indicated by an 18.8% reduction in subpolysomal *Cox-2* mRNA concomitant with a 24.4% increase in light polysome fractions (**Fig. 3.5B**, left vs right top panels, WT). By contrast, no significant differences were detected in the distribution of *Cox-2* mRNA across polysome profiles of LPS-treated vs. control 4E-BP1/2 DKO BMDM (**Fig. 3.5B**, left vs right top panels, DKO). These results provide evidence that LPS stimulates *Cox-2* mRNA translation through the inactivation of the repressors 4E-BP1/2. Accordingly, a more rapid kinetics and a greater induction of COX-2 protein expression was detected in 4E-BP1/2 DKO than in WT BMDM after LPS stimulation (~13 fold-change at 4 h and ~6 fold-change up to 8 h post-treatment) (**Fig. 3.5C**). Notably, PP242 blocked LPS-inducible COX-2 expression in WT BMDM while exerting only a mild effect in 4E-BP1/2 DKO counterparts (**Supplemental Fig. 1G**), a clear indicative that mTORC1-mediated 4E-BP1/2 inactivation contributes to the regulation of COX-2 production. In keeping with higher COX-2 levels, PGE₂ synthesis in response to LPS was amplified in absence of 4E-BP1/2, as evidenced by a 1.74 fold-change in the accumulation of

PGE₂ in cell culture supernatants of 4E-BP1/2 DKO BMDM as compared to WT (**Fig. 3.5D**). Collectively, these results support the notion that translational activity of *Cox-2* mRNA and subsequent PGE₂ induction are controlled by the translational repressors 4E-BP1/2.

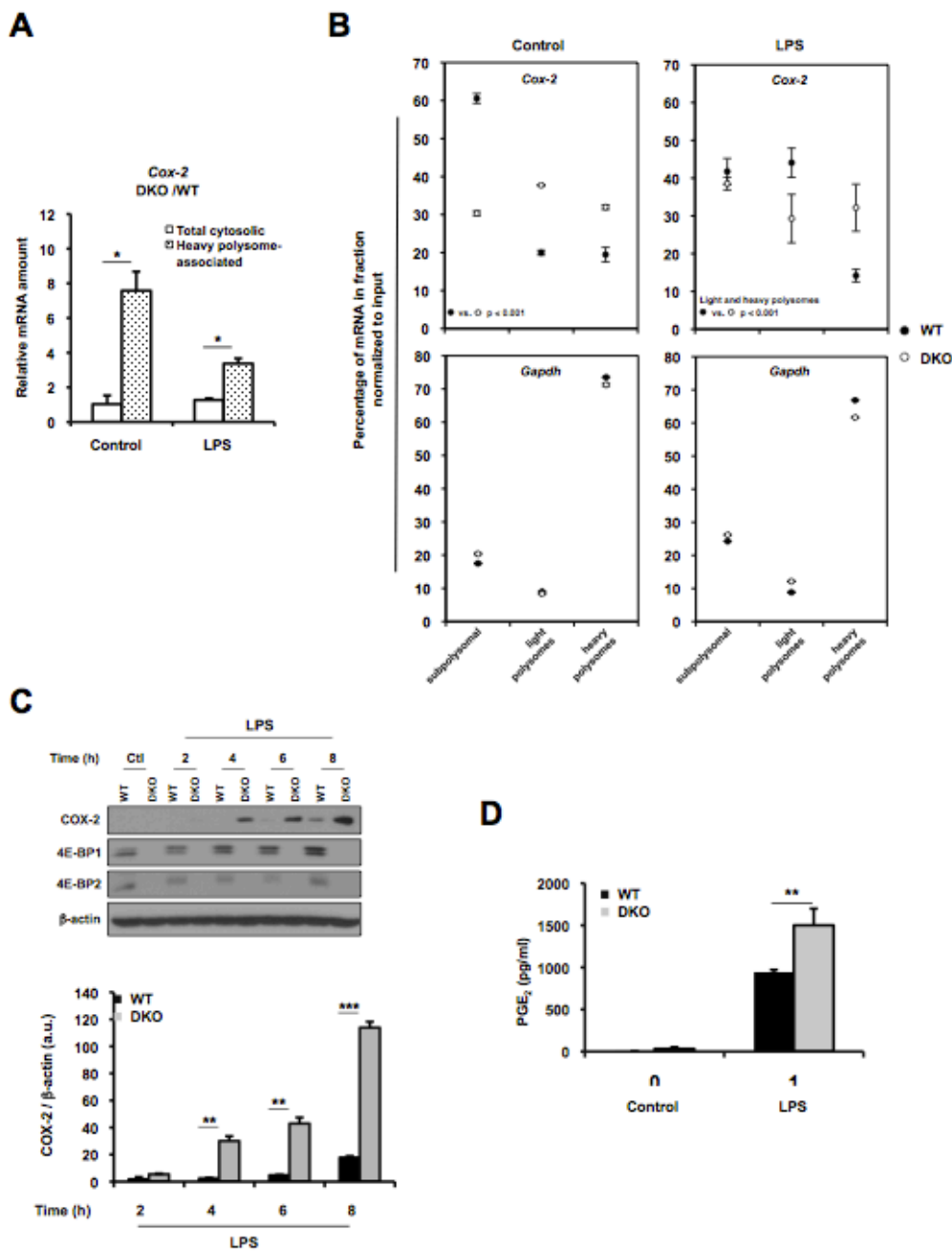


FIGURE 3.5. 4E-BP1/2 limit Cox-2 translational efficiency and PGE₂ synthesis.

(A) RT-qPCR of total cytosolic and heavy polysome-associated *Cox-2* mRNA in control and LPS-stimulated 4E-BP1/2 DKO and WT cells (fold increase in 4E-BP1/2 DKO over WT normalized to *Gapdh*). (B) Amount of *Cox-2* (top panels) and *Gapdh* (bottom panels) mRNA in subpolysomal, light polysome, and heavy polysome fractions isolated from control and LPS-stimulated 4E-BP1/2 DKO and WT cells quantified by RT-qPCR. Experiments were carried out in independent duplicates, each consisting of a triplicate. Data are expressed as percentage of a given mRNA in each fraction. (C) WT and 4E-BP1/2 DKO cells were treated with LPS for the indicated time, and COX-2 expression was assessed by Western blotting (top panel). Quantification of Western blot analyses on COX-2 (normalized to β -actin) by ImageJ (bottom panel). (D) PGE₂ levels were quantified in the supernatants of WT and 4E-BP1/2 DKO cells untreated (control) or stimulated with LPS for 12 h. (A, C, and D) Results are presented as mean \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4E-BP1 and 4E-BP2 limit PGE₂-C/EBP-b-mediated macrophage anti-inflammatory gene expression

Prostaglandins are autocrine and paracrine lipid mediators that maintain local homeostasis. Endogenous PGE₂ production potentiates macrophage anti-inflammatory responses via activation of CCAAT/enhancer-binding protein b (C/EBP-b) signaling (Na *et al.*, 2015). Our data indicated that induction of PGE₂ synthesis in LPS-stimulated cells is augmented in the absence of 4E-BP1/2. Thus, we sought to determine whether enhanced PGE₂ secretion amplified its autocrine effect and potentiated C/EBP-b-activity in 4E-BP1/2 DKO BMDM. RT-qPCR experiments showed that *C/ebpb* mRNA expression was substantially up-regulated in 4E-BP1/2 DKO BMDM after LPS stimulation (1.56 fold-change over WT) (**Fig. 3.6A**). Blockade of COX-2 activity with the selective NS-398 inhibitor (Futaki *et al.*, 1994) down-regulated but did not abolish the expression of *C/ebpb* mRNA in WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (36% and 66%, respectively) (**Fig. 3.6B**). Thus, transcriptional activation of *C/ebpb* appears to require COX-2-PGE₂-dependent and independent signals in macrophages. Remarkably, NS-389 reduced *C/ebpb* mRNA expression in 4E-BP1/2 DKO cells to WT levels (**Fig. 3.6B**). In keeping with the kinetics of *C/ebpb* accumulation, western blot analyses revealed that C/EBP-b protein levels augmented more rapidly and to a greater extent in LPS-treated 4E-BP1/2 DKO than WT BMDM (~2.5 fold-change DKO/WT at 4 - 6 h) (**Fig. 3.6C**). As expected, C/EBP-b induction by LPS was reduced when cells were treated with NS-398 (**Supplemental Fig. 1H**). These data support the notion that enhanced PGE₂ secretion and autocrine action potentiates *C/ebpb* transcription and protein expression in 4E-BP1/2 DKO BMDM.

C/EBP-b is required for transcriptional activation of anti-inflammatory genes in macrophages (Na *et al.*, 2015; Ruffell *et al.*, 2009). We predicted that amplified PGE₂/C/EBP-b signaling would promote this cellular response in 4E-BP1/2 DKO BMDM. We focused on *Arg1* and *Serp1B2* because these genes are transcriptionally activated via C/EBP-b in LPS-stimulated macrophages and have central roles in local homeostasis (Albina *et al.*, 2005; Udofa *et al.*, 2013). Arginase-1 functions as an inhibitor of chronic inflammation in Th2-polarized immune responses (Pesce *et al.*, 2009) and SerpinB2 suppresses Th1 responses during inflammatory processes (Schroder *et al.*, 2010). At first, we stimulated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM with LPS over a 24-h period and monitored the expression of *Arg1* and *Serp1B2* by RT-qPCR. A dramatic increase in *Arg1* mRNA levels was detected in 4E-BP1/2 DKO over WT cells at 12 h (4.0 fold-change) and 24 h (10.5 fold-change) post-treatment (**Fig. 3.6D**). Accumulation of

SerpinB2 mRNA was also markedly amplified in absence of 4E-BP1/2. Significant differences were observed as early as 6 h after LPS stimulation (1.9 fold-change DKO/WT), were maximal at 8 h (2.48 fold-change) and remained detectable up to 24 h (**Fig. 3.6E**). Consistent with the requirement of COX-2 activity for *Arg1* transcription, NS-398 prevented accumulation of *Arg1* mRNA in WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (~91 % decrease) (**Fig. 3.6F**). Similarly, *SerpinB2* mRNA levels were drastically down-regulated in NS-398-treated WT and DKO cells (~76 % decrease) (**Fig. 3.6G**). Notably, greater expression of *Arg1* and *SerpinB2* mRNA in 4E-BP1/2 DKO BMDM was reduced to WT levels by NS-398 treatment (**Figs. 3.6F-G**). Collectively, this set of experiments provides evidence that in the absence of 4E-BP1/2, translational derepression of *Cox-2* mRNA potentiates synthesis and autocrine action of endogenous PGE₂, which in turn promotes C/EBP-b-mediated transcriptional activation of anti-inflammatory genes.

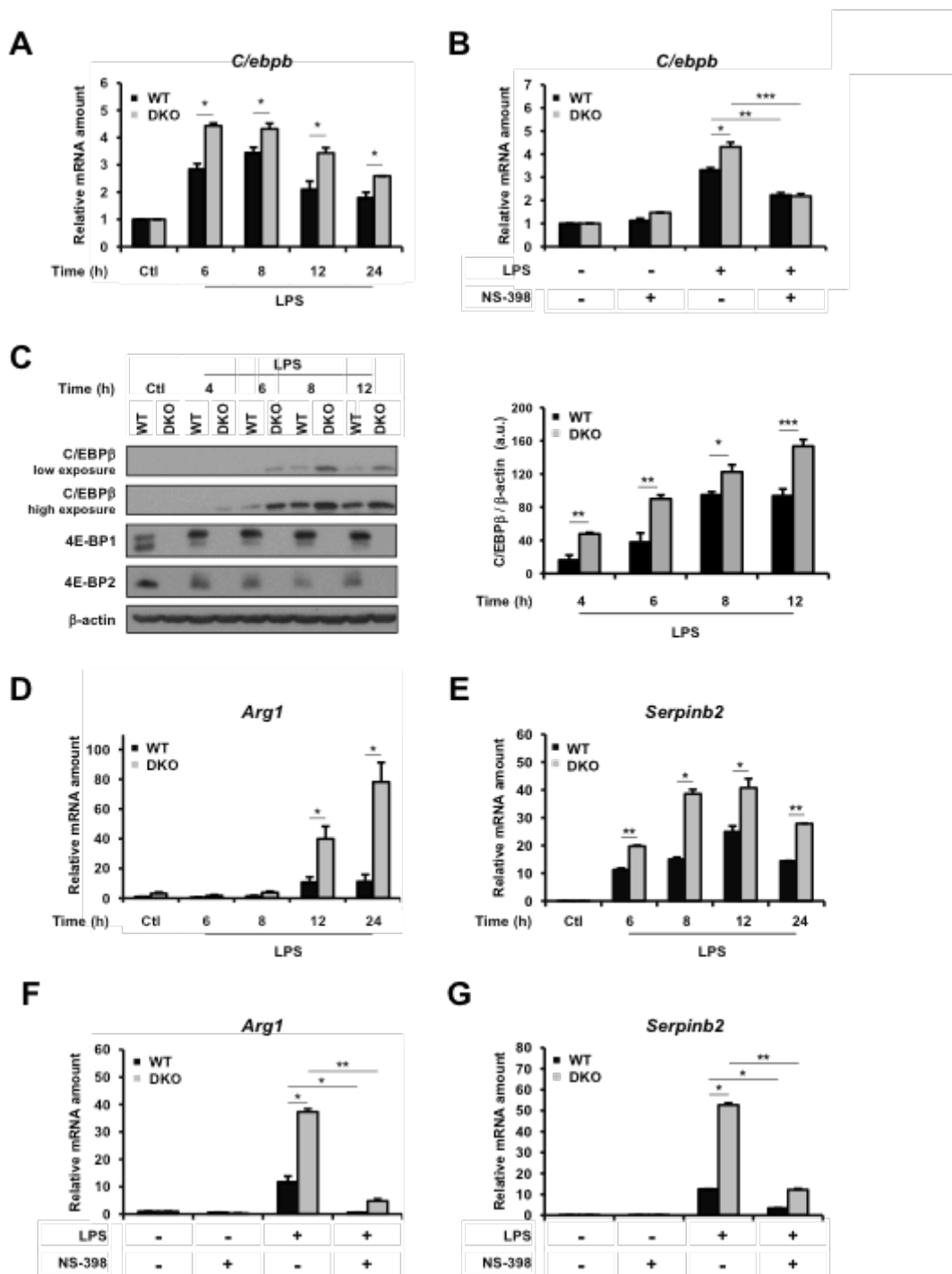


FIGURE 3.6. PGE₂-C/EBPβ-mediated anti-inflammatory responses are augmented in 4E-BP1/2 DKO macrophages

Relative amounts of *C/ebpb* mRNA normalized to *Gapdh* were examined by RT-qPCR in WT and 4E-BP1/2 DKO cells stimulated with LPS for the indicated time (A) or treated with LPS with or without 50 mM NS-398 for 8 h (B). (C) Western blots of C/EBPβ in control and LPS-stimulated cells (left panel). Quantification of Western blot analyses on C/EBPβ (normalized to β-actin) using ImageJ (right panel). Changes in *Arg1* and *Serpinb2* mRNA levels relative to *Gapdh* mRNA were determined by RT-qPCR in WT and 4E-BP1/2 DKO cells stimulated with LPS for the indicated time [(D) and (E), respectively] or treated with LPS with or without 50 mM NS-398 for 8–12 h [(F) and (G), respectively]. Results are presented as mean ± SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

4E-BP1 and 4E-BP2 regulate macrophage bactericidal capacity by repressing Interleukin-10 and Cyclooxygenase-2 anti-inflammatory effects

Macrophage anti-inflammatory responses are essential for the resolution of inflammation and local tissue repair after elimination of invading pathogens; however, when dysregulated, host susceptibility to infection can emerge (Murray & Wynn, 2011). IL-10-STAT3 and PGE₂-C/EBP β signaling augment the expression of anti-inflammatory genes (Albina *et al.*, 2005; Hutchins *et al.*, 2012b; Ruffell *et al.*, 2009). In addition, IL-10 and PGE₂ exert a suppressive effect on pro-inflammatory and microbicidal mediator production (Agard *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2002; Strassmann *et al.*, 1994). Consistent with elevated levels of IL-10 and PGE₂ in 4E-BP1/2 DKO BMDM, transcriptional activation of several anti-inflammatory genes was enhanced in these cells. Conversely, LPS-inducible accumulation of pro-inflammatory transcripts *Tnf*, *Il-6* and *Nos2* declined more rapidly and to a greater extent in 4E-BP1/2 DKO than in WT BMDM (**Figs. 3.7A-C**). Collectively, these data suggested that in the absence of 4E-BP1/2, the bactericidal capacity of LPS-stimulated macrophages could be diminished. To test this hypothesis, WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM were treated or not with 10 ng/ml LPS for 24 h and subsequently infected with a non-pathogenic strain of *E. coli* (MG 1655). Unstimulated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM were able to control the infection. In stark contrast, bacteria survival increased in LPS-treated 4E-BP1/2 DKO over WT cells at 8 h post-infection (2.1 fold-change) and remained augmented up to 24 h (3.7 fold-change) (**Fig. 3.8A**). Bacterial numbers were equivalent in WT and 4E-BP1/2 DKO cells at 6 h post-infection, confirming that differential bacterial survival observed at later time points was not due to changes in phagocytic activity in response to TLR4 stimulation. Notably, simultaneous blockade of IL-10 and PGE₂ activity with a neutralizing anti-IL-10 antibody and a specific inhibitor of COX-2 restored bacteria killing by ~82% in 4E-BP1/2 DKO BMDM, reaching similar levels to WT counterparts (**Fig. 3.8B**). By contrast, the same treatment had no significant effect in bactericidal activity of WT BMDM. These data support the notion that excess IL-10- and PGE₂-mediated anti-inflammatory responses hamper the bactericidal potential of LPS-stimulated 4E-BP1/2 DKO BMDM. In conclusion, our study uncovered a crucial role for 4E-BP1/2 in macrophage homeostasis by limiting the anti-inflammatory action of IL-10-STAT3 and PGE₂-C/EBP β signaling (**Fig. 3.9**).

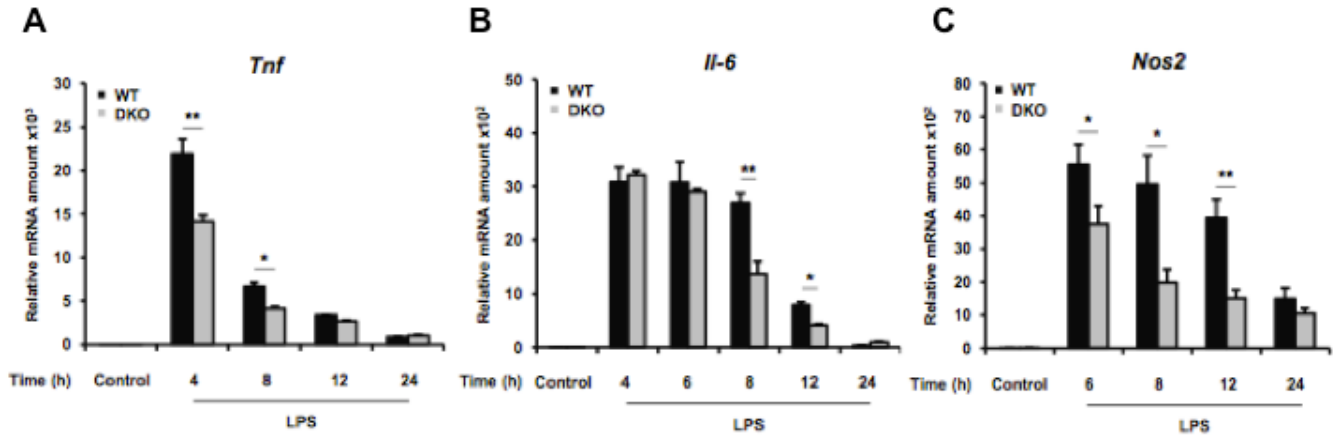


FIGURE 3.7. LPS-inducible proinflammatory gene expression is reduced in 4E-BP1/2 DKO macrophages.

Relative amounts of *Tnf* (A), *Il-6* (B), and *Nos2* (C) mRNA normalized to *Gapdh* were quantified in control and LPS-treated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM by RT-qPCR. Results are presented as mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01.

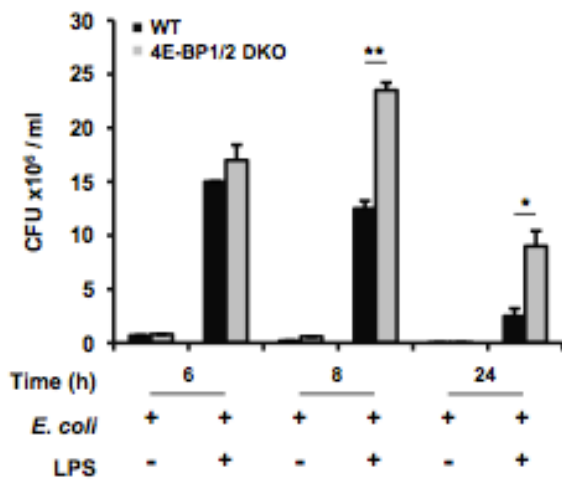
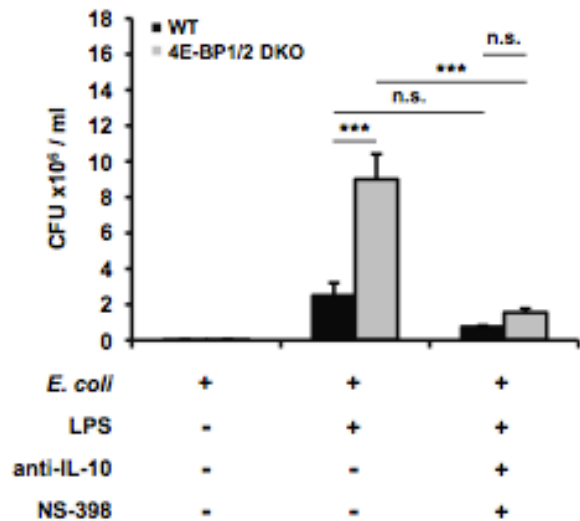
A**B**

FIGURE 3.8. 4E-BP1/2 regulate macrophage bactericidal capacity through the control of IL-10 and PGE₂ signaling

(A) WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM untreated or pretreated with 10 ng/ml LPS for 24 h were subsequently infected with *E. coli* MG 1655 (10:1 ratio) for 6, 8, or 24 h. Surviving bacteria were quantified as CFU per milliliter. (B) Cells un- treated or stimulated with LPS with or without 2 mg/ml anti-IL-10 Ab and 50 mM NS-398 were infected for 24 h. Results are presented as mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

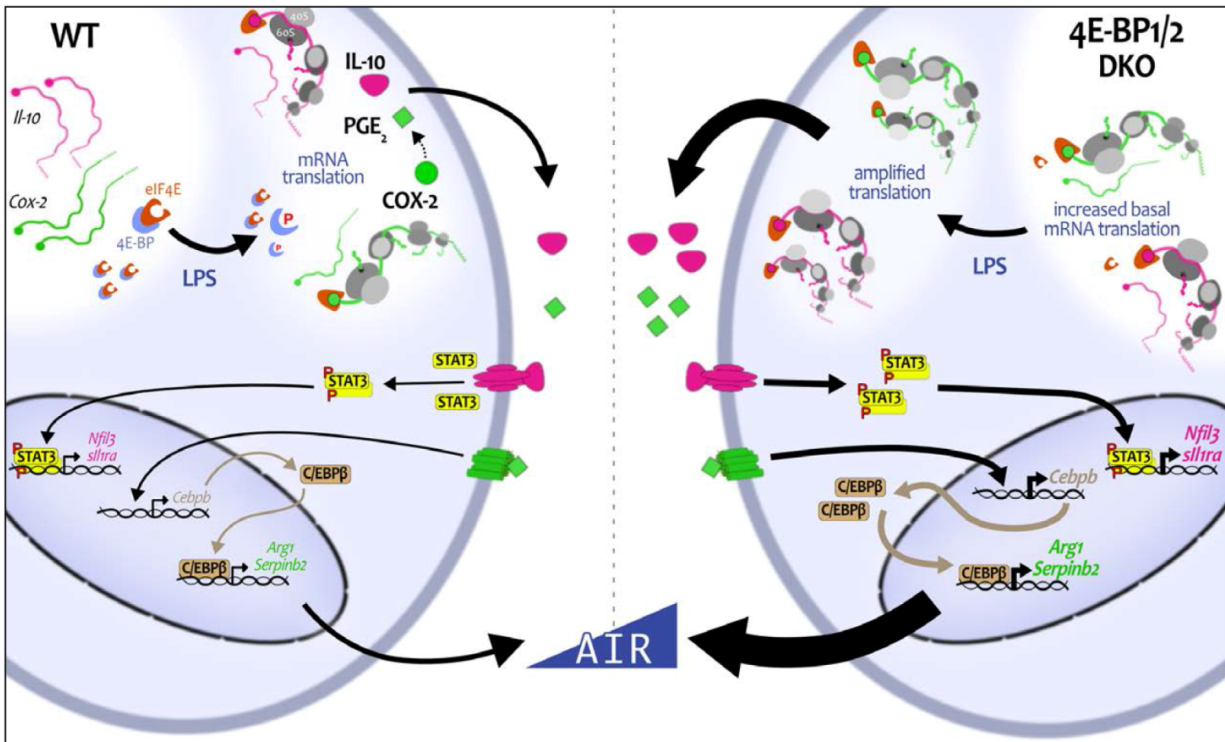


FIGURE 3.9. Proposed mechanism of 4E-BP1/2-mediated regulation of anti-inflammatory responses in macrophages.

In WT macrophages, LPS stimulation induces *Il-10* and *Cox-2* mRNA translation, IL-10 production, and COX-2-dependent PGE₂ synthesis. IL-10 signaling activates STAT3, which promotes *Nfil3* and *sll1ra* transcription. PGE₂ signaling activates *C/ebpb* transcription and C/EBPβ-dependent *Arg1* and *Serpinb2* gene expression. In 4E-BP1/2 DKO macrophages, *Il-10* and *Cox-2* mRNA translational efficiency is augmented at basal level and is further enhanced upon LPS treatment. Amplification of IL-10–STAT3 and PGE₂–C/EBPβ signaling results in exacerbated anti-inflammatory gene expression.

Discussion

The mTORC1 downstream effectors 4E-BP1/2 play a crucial role in the regulation of pro-inflammatory mediators during viral and parasitic infections (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011; Nehdi *et al.*, 2014). Surprisingly, there are considerable gaps regarding the impact of 4E-BP1/2 in the control of anti-inflammatory responses. We identified the mTORC1-4E-BP1/2-eIF4E axis as a central regulator of macrophage homeostasis. In the absence of 4E-BP1/2, translational derepression of *Il-10* and *Cox-2* mRNAs triggered a transcriptional program that amplified anti-inflammatory gene expression and promoted bacteria survival in macrophages upon TLR4 stimulation. These data provide evidence that 4E-BP1/2-dependent translational control of select mRNAs contributes to modify gene expression networks that orchestrate macrophage responses.

Among 564 immune-related transcripts that were screened in this study, only 11 were identified as targets of translational control via 4E-BP1/2 in macrophages. These data are in line with numerous reports, including comparative analyses of the translomes of WT and 4E-BP1/2 DKO mice and cells (Colina *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009b), showing that 4E-BPs do not act as general translational repressors but rather target specific subsets of mRNAs (Alain *et al.*, 2012a; Dowling *et al.*, 2010; Gkogkas *et al.*, 2013; Larsson *et al.*, 2012; Miloslavski *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2017b; Yi *et al.*, 2017). Despite the fact that eIF4E is required for cap-dependent translation of all nuclear-encoded mRNAs, some of them are particularly sensitive to eIF4E levels and / or availability, and therefore are referred to as “eIF4E-sensitive” (Gandin *et al.*, 2016; Masvidal *et al.*, 2017b; Morita *et al.*, 2015). Accordingly, their translational efficiency is repressed by genetic deletion of eIF4E (Gandin *et al.*, 2016) or increased cellular 4E-BP to eIF4E ratios (Alain *et al.*, 2012a). Two major subsets of transcripts have been identified as being targets of select translational control via eIF4E-dependent mechanisms. The first one comprises mRNAs known as “eIF4A-sensitive” (Gandin *et al.*, 2016; Masvidal *et al.*, 2017b; Morita *et al.*, 2015), which harbor long and highly structured 5' UTRs and therefore depend on the RNA helicase activity of eIF4A to be efficiently translated (Gandin *et al.*, 2016; Hinnebusch *et al.*, 2016; Koromilas *et al.*, 1992; Svitkin *et al.*, 2001). eIF4E sensitivity of these mRNAs is thought to stem from eIF4E-dependent recruitment of eIF4A to the eIF4F complex and stimulation of eIF4A activity (Feoktistova *et al.*, 2013; Masvidal *et al.*, 2017b). Consistent with a central role for 4E-BP1/2 as regulators of eIF4A-sensitive mRNAs, pharmacological inhibition of mTORC1 signaling represses translational efficiency of such transcripts in WT cells but not in 4E-BP1/2 DKO

counterparts (Dowling *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2012). Accumulating evidence indicates that eIF4A-sensitive mRNAs encode proteins related to specific cellular processes, namely cell proliferation and survival (Dowling *et al.*, 2010; Gandin *et al.*, 2016; Larsson *et al.*, 2012) but also immune responses (Colina *et al.*, 2008; Gandin *et al.*, 2016). Indeed, *Irf-7*, which encodes a central regulator of antiviral immunity (Honda *et al.*, 2005), was identified as an eIF4A-sensitive mRNA (Gandin *et al.*, 2016). Accordingly, *Irf-7* mRNA harbors a long and highly structured 5' UTR and its translational efficiency is tightly controlled through 4E-BP1/2 (Colina *et al.*, 2008). Note that *Irf-7* was not identified in our screening, which might be explained by differences in cell types employed (MEFs vs, BMDM) and treatment (serum stimulated vs. steady state). Indeed, selective changes in mRNA translation via mTORC1-mediated inactivation of 4E-BP1/2 appear to be dependent on the nature of the stimulus or type of stress to which the cell is exposed (Masvidal *et al.*, 2017b; Miloslavski *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2015). In support of the notion that 4E-BP1/2 limit translation efficiency of immune-related transcripts containing long and structured 5'UTRs, our bioinformatic analysis indicated that *Cox-2*, *Ifit2*, *I11b*, and *Mx-1* might fall into this category. Further investigation is required to determine whether selective translational control of these mRNAs via 4E-BP1/2 is dictated by their sensitivity to eIF4A activity.

A second subset of “eIF4E-sensitive” mRNAs is characterized by very short 5' UTRs (i.e. 30 nt) that some cases contain a Translation Initiator of Short 5' UTR (TISU) element (Gandin *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2017b; Sinvani *et al.*, 2015). As such, their translational efficiency is less sensitive to eIF4A (Gandin *et al.*, 2016) and they are referred to as “eIF4A-insensitive” mRNAs (Gandin *et al.*, 2016; Masvidal *et al.*, 2017b; Morita *et al.*, 2015). These transcripts encode proteins involved in mitochondrial-related functions (Sinvani *et al.*, 2015) and their translational efficiency is limited by 4E-BP1/2 (Morita *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2017b). We identified several immune-related mRNAs (*I11a*, *I11b*, *I110*, *I112b*, *Ccl5*, *Ccl12*, *Cd40* and *Cxcl10*) that harbor relatively short 5' UTRs; however, none of them contains a TISU element and, with the exception of *I11a*, their length exceeds 30 nucleotides. Thus, they do not seem to meet the criteria to be considered as short-5' UTR-containing “eIF4E-sensitive” transcripts. It is conceivable that these and other immune-related transcripts are subject to an alternative mechanism of 4E-BP1/2-dependent translational control, which might involve yet to be discovered sequence and/or structural features in their 5' UTRs. Alternatively, these mRNAs might be expressed in macrophages with 5'UTRs differing from those reported in data bases. Further investigation is needed to resolve these possibilities.

An additional explanation that could account for the small amount of selective translational control of immune-related transcripts through 4E-BP1/2 is that our comparative analysis was performed in macrophages at steady-state. Since we employed an immunology panel, it seems reasonable that changes in translational activity for many of these transcripts cannot be detected without cell activation. Further support for this hypothesis was obtained from our data showing that TLR4 stimulation was required to detect IL-10 and COX-2 at the protein level, despite the fact that *Il-10* and *Cox-2* mRNAs were translated more efficiently in 4E-BP1/2 DKO than WT BMDM at steady-state. These observations are in line with a study showing that even though *Il-10* is transcribed in macrophages at basal level, IL-10 secretion can only be detected in stimulated cells. The authors presented experimental evidence indicating that macrophages are poised to secrete IL-10 and will do so if they receive appropriate signals (Powell *et al.*, 2000). Thus, our data along with this previous report suggest that in the absence of 4E-BP1/2, select mRNAs might be “primed” to be more efficiently translated in response to triggers or cues, a phenomenon recently described in NK cells (Mao *et al.*, 2016).

Consistent with the central role of IL-10 and COX-2 in anti-inflammatory responses (Hutchins *et al.*, 2012b; Na *et al.*, 2015; Ruffell *et al.*, 2009; Saraiva & O'Garra, 2010), their expression is tightly regulated through transcriptional and post-transcriptional mechanisms, including RNA stability and translational control via RNA-binding proteins, such as T cell intracellular antigen 1 (TIA-1) and tristetraprolin (TTP) (reviewed in (Anderson, 2010; Mazumder *et al.*, 2010)). The adenosine A2B receptor activates translation of *Il-10* mRNA in macrophages by relieving the translational repressive effect of RNA-binding protein elements in its 3' UTR (Nemeth *et al.*, 2005). In regards to COX-2, different mechanisms of translational control have been reported. The translational silencer and RNA-binding protein TIA-1 represses *Cox-2* mRNA translation (Dixon *et al.*, 2003). Moreover, COX-2 protein synthesis was shown to be dependent on mTORC1 signaling in neutrophils (Fernandez *et al.*, 2007); however, the underlying mechanism remained unclear. Confirming and extending previous reports, we found that the inhibitors of cap-dependent translation, 4E-BP1/2, limit *Il-10* and *Cox-2* mRNA translation efficiency in macrophages. Because the activity of 4E-BP1/2 is altered by a number of pathogens (reviewed in (Mohr & Sonenberg, 2012)), it is plausible that dysregulated translational control of *Il-10* and *Cox-2* may contribute to the pathogenesis of infections by skewing anti-inflammatory responses in macrophages.

Our results indicate that translational control of mRNAs encoding select immunomodulatory factors, such as IL-10 and COX-2, is required for fine tuning of macrophage responses to the bacterial toxin and TLR4 ligand LPS. In keeping with this reasoning, several reports showed that LPS-inducible expression of activators and suppressors of inflammation is, at least part, controlled at the level of mRNA translation in macrophages. For instance, TLR4 stimulation with LPS activates mRNA translation of several pro-inflammatory mediators including the transcription factor IRF-8 (Xu *et al.*, 2012a) and the transforming growth factor-activated kinase (TAK1) (Liepelt *et al.*, 2014). In stark contrast, a previous study showed that LPS promotes translation of macrophage mRNAs encoding negative feedback regulators of the inflammatory response, such as inhibitors of NF- κ B (e.g. IER3, NFKBID) and RNA-binding proteins that prevent the expression of cytokines at the post-transcriptional level (e.g. TTP) (Schott *et al.*, 2014). These reports, along with our data, suggest that microbial components, such as LPS, trigger antagonistic translational control programs during infection (i.e pro- and anti-inflammatory), which might contribute to pathogen clearance while helping to maintain macrophage homeostasis.

We found that 4E-BP1/2-dependent mTORC1 signaling is necessary to control *Il-10* and *Cox-2* mRNA translation and subsequent IL-10 and COX-2 production. These data are in agreement with previous studies that have linked translational control via eIF4E availability or activity to changes in translation of mRNAs encoding regulators of inflammation in macrophages. Indeed, IFN- γ enhances TLR2-stimulated M1 macrophage activation by suppressing mRNA translation of the transcriptional repressor HES-1 via MNK1/2 and mTORC1 inhibition (Su *et al.*, 2015). Similarly, IL-10 was shown to disrupt MNK signaling and thereby repress mRNA translation of the pro-inflammatory cytokine TNF (Chan *et al.*, 2012). Conversely, LPS was found to activate the MNK pathway and induce protein synthesis of IRF-8. Notably, MNK-dependent regulation of IRF-8 promoted pro-inflammatory gene expression and M1 macrophage polarization (Xu *et al.*, 2012a). In view of these studies and our current findings, selective translational control through eIF4E-dependent mechanisms appears to regulate transcriptional programs that coordinate the onset and the resolution of inflammatory responses in macrophages.

Macrophages deficient in 4E-BP1/2 displayed a defect in their bactericidal capacity. We postulate that this phenotype is associated with translational derepression of *Il-10* and *Cox-2*

and the amplified autocrine action of endogenous IL-10 and PGE₂ produced in response to LPS. Further supporting our model, the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of IL-10 and PGE₂ are well documented and have been linked to their ability to inversely regulate anti- and pro-inflammatory gene expression (Carl *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2012; Hutchins *et al.*, 2012b; Na *et al.*, 2015). Importantly, IL-10 and PGE₂ are negative regulators of LPS-mediated inflammatory responses (Lang *et al.*, 2002; Strassmann *et al.*, 1994). However, we cannot rule out the possibility that in addition to IL-10 and COX-2, 4E-BP1/2 control other immunomodulatory factors that impact anti-inflammatory responses and bacterial survival in macrophages. In contrast to our observations, 4E-BP1/2 DKO MEFs were resistant to viral infections (Colina *et al.*, 2008) and 4E-BP1/2 DKO peritoneal macrophages were less susceptible to a protozoan parasite (Jaramillo *et al.*, 2011). This discrepancy might be related to distinct translational programs triggered by specific stimulus or stressors in different cell types. Further characterization of the molecular mechanisms of 4E-BP1/2-dependent translational control during infections will shed light on this matter.

Collectively, this work provides evidence that the mTORC1-4E-BP1/2 axis orchestrates translational and thereby transcriptional programs that limit anti-inflammatory responses in macrophages. Notably, our data suggest that dysregulated activity of 4E-BP1/2 during pathological conditions, such as infections and cancer, might contribute to reprogram the translational and transcriptional landscape of macrophages and thereby favor disease progression. Targeted sequencing and transcriptome-wide analyses of the translome of pathology-associated macrophages will generate a more complete repertoire of the mRNAs that are translationally controlled through 4E-BP1/2-dependent mechanisms, and will provide insight on the regulation of gene expression networks in health and disease.

Acknowledgements

We are grateful to N. Sonenberg for providing the bone marrow of *Eif4ebp1*^{-/-}/*Eif4ebp2*^{-/-} mice; A. Sylvestre and A. Lafrance for invaluable technical assistance; J. Raisch and S. Houle for useful advice on bacterial infections, J. Tremblay for assistance with FACS experiments and data analysis.

The Centre for Host-Parasite Interactions is supported by a Subvention de Regroupement Stratégique from the Fonds de Recherche du Québec en Nature et Technologies (FRQ-NT). M.J. is a recipient of a Bourse de chercheur-boursier Junior 1 from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQ-S) and a Subvention d'établissement de jeune chercheur from the FRQ-S. V.C. is supported by a MSc scholarship from the Fondation Universitaire Armand Frappier. O.L. is supported by grants from the Swedish Research Council and the Wallenberg Academy Fellows program.

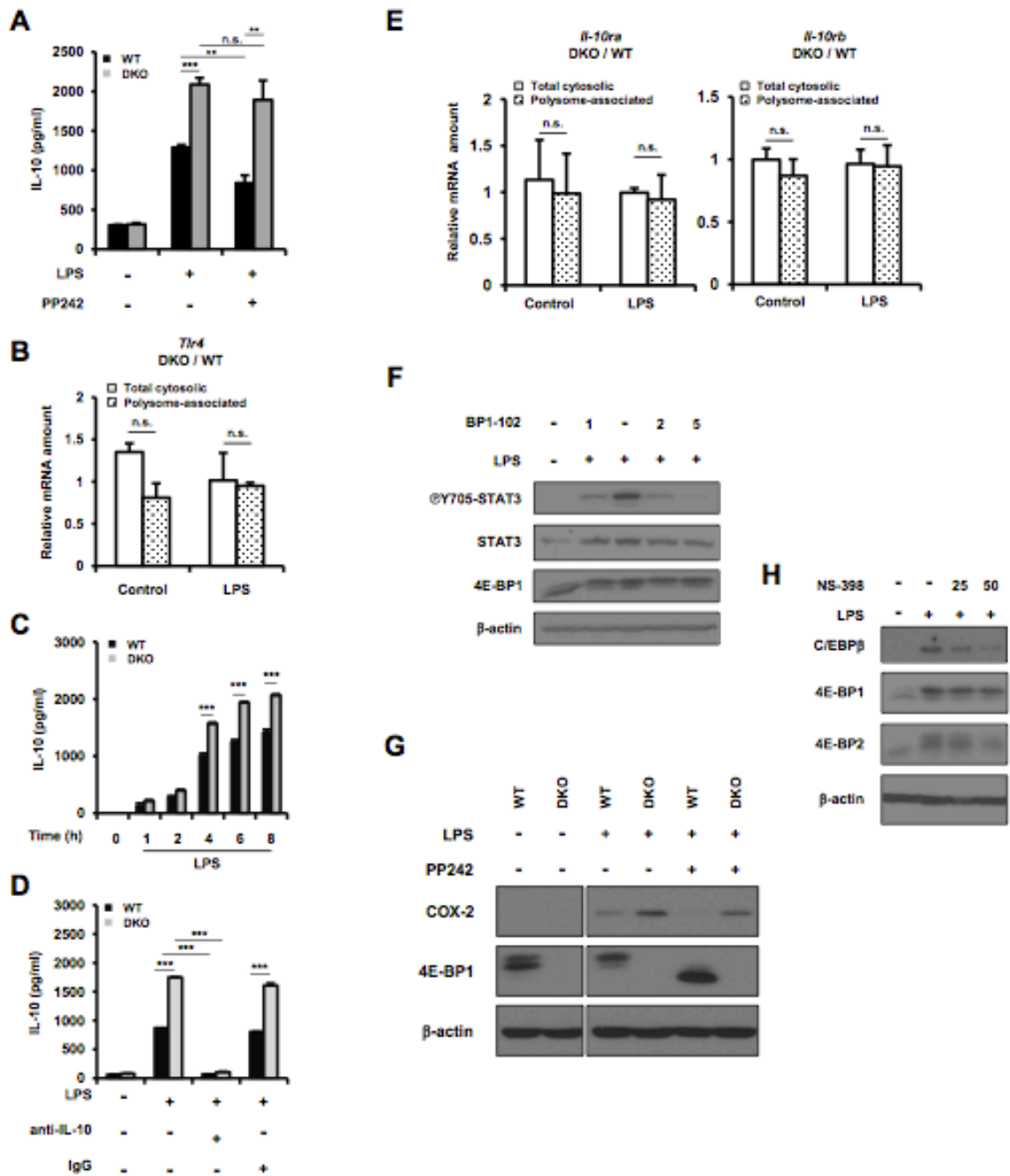
Supplemental Table 3.1. List of primers used for RT-qPCR

Gene	Primer Sequence (5' - 3')
mouse <i>Arg1</i>	Forward 5' -GGTCTGTGGGGAAAGCCAAT-3' Reverse 5' -TGGTTGTCAGGGGAGTGTTG-3'
mouse <i>Cebpb</i>	Forward 5' -CGTTTCGGGACTTGATGCAATC-3' Reverse 5' -CAACAACCCCGCAGGAACAT-3'
mouse <i>Cox-2</i>	Forward 5' -TTGGAGGCGAAGTGGGTTTT-3' Reverse 5' -TGGCTGTTTTGGTAGGCTGT-3'
mouse <i>Gapdh</i>	Forward 5' -TTCTTGTGCAGTGCCAGCCTC-3' Reverse 5' -CAAATGGCAGCCCTGGTGAC-3'
mouse <i>Il-6</i>	Forward 5' -CAACGATGATGCACTTGCAGA-3' Reverse 5' -GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3'
mouse <i>Il-10</i>	Forward 5' -AGTGGAGCAGGTGAAGAGTG-3' Reverse 5' -TCATCATGTATGCTTCTATGCAGT-3'
mouse <i>Il-10ra</i>	Forward 5' -CGTTTGCTCCCATTCCTCGT-3' Reverse 5' -GAAGGGCTTGGCAGTTCGTA-3'
mouse <i>Il-10rb</i>	Forward 5' -TTCTGGTGCCAGCTCTAGG-3' Reverse 5' -AGTCAGGTTTCGTTTTGGGGAA-3'
mouse <i>Nfil3</i>	Forward 5' -AGCTCTTTTGTGGACGAGCA-3' Reverse 5' -CCTCTGACACATCGGAGAGC-3'
mouse <i>Nos2</i>	Forward 5' -GGACCCAGAGACAAGCCTAC-3' Reverse 5' -CAGAGTGAGCTGGTAGGTTCC-3'
mouse <i>Rpl19</i>	Forward 5' -GCTGCGGGAAAAAGAAGGTC-3' Reverse 5' -AGCTTCCTGATCTGCTGACG-3'
mouse <i>Serpinb2</i>	Forward 5' -GTTAGAAAGTGCAAACAAGCTG-3' Reverse 5' -GGATTTACCTTTGGTTTGAG-3'
mouse <i>sil1ra</i>	Forward 5' -AAATCTGCTGGGGACCCTAC-3' Reverse 5' -TCCCAGATTCTGAAGGCTTG
mouse <i>Tlr4</i>	Forward 5' -TGGGAGGACAATCCTCTGGG Reverse 5' -CAGGTCCAAGTTGCCGTTTC

mouse *Tnf*

Forward 5' -ACTCCAGGCGGTGCCTATGA

Reverse 5' -AGTGTGAGGGTCTGGGCCAT



Supplemental Figure 3.1. The mTORC1-4E-BP1/2 axis contributes to regulate IL-10 and COX-2 production in LPS-stimulated macrophages.

(A, C-D) IL-10 was quantified by ELISA in WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM treated as follows: (A) LPS ± 2.5 mM PP242 for 6 h; (C) LPS for 1 - 8 h; (D) LPS ± 2 mg/ml anti-IL-10 or isotype control for 6 h. (B, E) RT-qPCR of total cytosolic and heavy polysome-associated mRNA in WT and 4E-BP1/2 DKO cells (normalized to *Gapdh*). (B) *Tlr4* mRNA; (E) *Il10ra* and *Il10rb* mRNA. (F-H) Western blot analyses. (F) Phosphorylation status of STAT3 at Y705 in WT BMDM treated with LPS ± BP-1-102 (mM) for 4 h. (G) Total COX-2 protein levels in WT and DKO cells treated as indicated in A. (H) C/EBPβ protein expression in WT BMDM treated with LPS ± NS-398 (mM) for 4 h. (A-E) Experiments were carried out in independent duplicates, each consisting of a triplicate. Data are expressed as mean ± SD. (F-H) Data are representative of two independent biological replicates.

CHAPITRE IV.

DEUXIÈME PUBLICATION

Résumé de la deuxième publication

Manuscrit soumis à *European Journal of Immunology*

Date de soumission : 8 août 2018

Manuscrit ID : eji.201847857

Titre : La répression traductionnelle de CCL5 et CXCL10 par 4E-BP1 et 4E-BP 2 restreint la capacité des macrophages à induire la migration des cellules T activées

La signalisation à travers « mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) » est un nœud régulateur majeur de la production de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages. Cependant, il n'est pas encore clair si une telle régulation repose sur un contrôle sélectif de la traduction par deux des principaux effecteurs mTORC1, les « eIF4E-binding proteins 1 et 2 (4E-BP1/2) ». En comparant l'efficacité traductionnelle des transcrits immunitaires de macrophages de type sauvage (WT) et 4E-BP1/2 (DKO), nous avons constaté que la traduction des ARNm codant pour les chimiokines pro-inflammatoires CCL5 et CXCL10 est contrôlée par 4E-BP1/2. Les macrophages déficients en 4E-BP1/2 ont produit des taux plus élevés de CCL5 et de CXCL10 lors de la stimulation par le LPS, ce qui a accru leur activité chimiotactique envers les cellules T CCR5⁺ et CXCR3⁺. En accord avec ces résultats, le traitement des cellules WT avec des inhibiteurs de mTORC1 a favorisé l'activation de 4E-BP1/2 et réduit la sécrétion de CCL5 et CXCL10. En revanche, le statut de phosphorylation d'eIF4E n'a pas affecté la synthèse de ces chimiokines, car les macrophages dérivés de souris hébergeant une forme non phosphorylable de la protéine ont produit des taux similaires de CCL5 et CXCL10 comparé aux WT. Ces données apportent la preuve que l'axe mTORC1-4E-BP1/2 contribue à réguler l'activité chimiotactique des macrophages en limitant l'efficacité de la traduction des ARNm *Ccl5* et *Cxcl10*, et suggère que les répresseurs 4E-BP1/2 agissent comme des protecteurs immunologiques dans les macrophages.

Contribution des auteurs :

Mirtha William : Conception, réalisation des manipulations (sauf Figure 1B, 1E, 1F, 5A, 5B, S1) et analyse

Louis-Philippe Leroux : Conception, réalisation des manipulations (Figure 1B, 1E, 1F, 4C, 4D, 5A, 5B, et S1), analyse et écriture du manuscrit

Visnu Chaparro : Bioinformatique, normalisation polysomes (Figure 1C, 1D, 3A) et analyse

Tyson E. Graber : Analyse bioinformatique (Figure 2C)

Tommy Alain : contributions aux nouvelles technologies et analyse

Maritza Jaramillo : Conception, analyse, et écriture du manuscrit

Translational repression of *Ccl5* and *Cxcl10* by 4E-BP1 and 4E-BP2 restrains the ability of macrophages to induce migration of activated T cells

Mirtha William^{*,2}, Louis-Philippe Leroux^{*,2}, Visnu Chaparro^{*}, Tyson E. Graber[†], Tommy Alain[†]
and Maritza Jaramillo^{*,1}

^{*}INRS - Institut Armand-Frappier and Centre for Host-Parasite Interactions, Laval, QC, Canada;

[†]Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

¹To whom correspondence and requests for materials should be addressed: Maritza Jaramillo, INRS - Institut Armand-Frappier and Centre for Host-Parasite Interactions, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7; Phone number (1)-450-687-5010, Ext 8872; Fax number (1) 450-686-5389; E-mail: maritza.jaramillo@iaf.inrs.ca

²These authors equally contributed to this work

Short Title: Translational control of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs in macrophages

Keywords: macrophages, chemokines, mRNA translation, eIF4E-binding proteins, mTOR

Abbreviations: BMDM, bone marrow-derived macrophage; DKO, double knockout; 4E-BP, eIF4E binding protein; eIF4F, eukaryotic translation initiation factor 4F; FDR, false discovery rate; IP-10, IFN-gamma-induced protein 10; KI, knock-in; LCCM, L929 fibroblast-conditioned culture medium; MEF, mouse embryonic fibroblast; MFE, minimum free energy; MNK, MAP kinase interacting serine/threonine kinase; mTOR, mechanistic target of rapamycin; mTORC1, mTOR complex 1; RT-qPCR, real-time quantitative PCR; UTR, untranslated region; WT, wild-type.

Abstract

Signaling through the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is a major regulatory node of pro-inflammatory mediator production by macrophages. However, it is still unclear whether such regulation relies on selective translational control by two of the main mTORC1 effectors, the eIF4E-binding proteins 1 and 2 (4E-BP1/2). By comparing translational efficiencies of immune-related transcripts of wild-type (WT) and 4E-BP1/2 double-knockout (DKO) macrophages, we found that translation of mRNAs encoding the pro-inflammatory chemokines CCL5 and CXCL10 is controlled by 4E-BP1/2. Macrophages deficient in 4E-BP1/2 produced higher levels of CCL5 and CXCL10 upon LPS stimulation, which enhanced chemoattraction of CCR5⁺ CXCR3⁺ T cells. Consistent with this, treatment of WT cells with mTORC1 inhibitors promoted the activation of 4E-BP1/2 and reduced CCL5 and CXCL10 secretion. In contrast, the phosphorylation status of eIF4E did not affect the synthesis of these chemokines since macrophages derived from mice harboring a non-phosphorylatable form of the protein produced similar levels of CCL5 and CXCL10 to WT counterparts. These data provide evidence that the mTORC1-4E-BP1/2 axis contributes to regulate the production of chemoattractants by macrophages by limiting translation efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs, and suggest that 4E-BP1/2 act as immunological safeguards by fine-tuning inflammatory responses in macrophages.

Introduction

Chemokines constitute a group of cytokines that in combination with their cognate receptors regulate leukocyte trafficking and activation (Zlotnik & Yoshie, 2012). Two well-characterized inflammatory chemokines are CCL5 and CXCL10, which owing to their multifunctional features exert both protective and detrimental roles in diseased states (Altara *et al.*, 2016; Antonelli *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2016b; Lee *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2011a; Mantovani *et al.*, 2004; N. *et al.*, 2015; Qidwai & Khan, 2016). CCL5/RANTES is mainly produced by CD8⁺ T cells, macrophages, platelets, fibroblasts, epithelial cells, and some types of tumor cells (Appay & Rowland-Jones, 2001). (Khalid *et al.*, 2015). CCL5 has also been reported to bind to the atypical chemokine receptor 2 (ACKR2) expressed on the surface of dendritic cells, B cells, and other leukocytes (Khalid *et al.*, 2015). CXCL10/IFN γ -induced protein 10 kDa (IP-10) is primarily secreted by monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, fibroblasts, and endothelial cells (Liu *et al.*, 2011b). CXCL10 specifically binds to CXCR3, which is predominantly expressed on activated T and B cells, natural killer cells, dendritic cells and macrophages (Liu *et al.*, 2011a). Of note, these different chemokine receptors are promiscuous as they bind to several chemokines other than CCL5 and CXCL10 (Khalid *et al.*, 2015). Initially, CCL5 and CXCL10 were thought to act mainly by promoting leukocyte infiltration to the site of inflammation (Appay & Rowland-Jones, 2001; Dufour *et al.*, 2002); however, there is compelling evidence that these chemokines are major regulators of a variety of cellular processes, including glucose metabolism, proliferation, cell growth, and apoptosis (Gao *et al.*, 2016; Khalid *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2011b).

The expression of CCL5 and CXCL10 is governed by a vast network of regulatory processes ranging from transcriptional activation to post-translational modifications (Bandow *et al.*, 2012; Carpenter *et al.*, 2013; Mortier *et al.*, 2008; Nikolcheva *et al.*, 2002). In particular, the mechanisms controlling mRNA stability appear to be crucial in determining the timing and the levels of CCL5 and CXCL10 protein synthesis (Johanna & Georg, 2010; Marcais *et al.*, 2006; Vockerodt *et al.*, 2005). Accumulating evidence indicates that post-transcriptional regulation of CCL5 and CXCL10 also takes place at the level of mRNA translation (Basu *et al.*, 2014b; Kariminik *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2008; Kroczyńska *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014; N. *et al.*, 2015; Perry *et al.*, 2008; Poddar *et al.*, 2015; Seidel *et al.*, 2016; Swanson *et al.*,

2002). In eukaryotes, translational control (i.e. regulation of mRNA translation efficiency) occurs mainly at the initiation step (Jackson *et al.*, 2010b). This process is largely dependent on the recruitment of the ribosome to the mRNA via the eukaryotic translation initiation factor 4F (eIF4F), a heterotrimeric complex formed by the m⁷G-cap-binding subunit, eIF4E; the scaffold protein, eIF4G; and the RNA helicase, eIF4A (Siddiqui & Sonenberg, 2015). The mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1) promotes the assembly of the eIF4F complex by controlling the activity of the translational repressors eIF4E-binding proteins (4E-BPs) (Beretta *et al.*, 1996; Gingras *et al.*, 2001a; Tsukumo *et al.*, 2016a). Under conditions of mTORC1 inhibition, hypophosphorylated 4E-BP1/2 and inducible 4E-BP3 bind with high affinity to eIF4E and thereby prevent the formation of a functional eIF4F complex (Beretta *et al.*, 1996; Tsukumo *et al.*, 2016a). Conversely, activation mTORC1 reverses the inhibitory effect of 4E-BPs on translation by inducing their phosphorylation and subsequent dissociation from eIF4E (Gingras *et al.*, 2001a). In addition to mTORC1-dependent inactivation of 4E-BPs, the activity of eIF4E is increased through direct phosphorylation at S209 by the MAP kinase interacting serine/threonine kinases 1 and 2 (MNK1/2) (Waskiewicz *et al.*, 1997). Consistent with the pivotal role of mTORC1 and MNK1/2 in translational control of immune responses (reviewed in (Piccirillo *et al.*, 2014)), emerging evidence points to their involvement in the regulation of CCL5 and CXCL10 protein synthesis (Kaur *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2008; Kroczyńska *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014; Lui *et al.*, 2008; Seidel *et al.*, 2016). Indeed, the use of rapamycin, an allosteric inhibitor of mTOR, blocks CCL5 secretion under pro-inflammatory conditions *in vitro* and *in vivo* (Lin *et al.*, 2014; Lui *et al.*, 2008). Moreover, silencing of MNK1 reduces CCL5 and CXCL10 protein expression in response to TNF in smooth muscle cells (Seidel *et al.*, 2016). Similarly, studies using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) deficient in upstream regulators (Akt1/2) or downstream effectors (4E-BP1 or S6K1/2) of mTORC1 established a crucial role for this pathway in the induction of CXCL10 by IFN- γ (Kaur *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2008; Kroczyńska *et al.*, 2009). However, none of these reports provided conclusive data demonstrating that *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs are direct targets of translational control via mTORC1 or MNK signaling. Of note, most of these works were carried out in nonimmune cells and therefore, they might not reflect the full scope of the molecular mechanisms that govern CCL5 and CXCL10 protein synthesis during immune responses.

Macrophages are versatile cells of the innate immune system that function as orchestrators of the onset and the resolution of inflammatory responses during infection, tissue injury, and physiological stress (Murray & Wynn, 2011; Shi & Pamer, 2011). Elevated CCL5 and CXCL10

production is a hallmark of inflammatory macrophages (Mantovani *et al.*, 2004), and has been linked to either protective effects or negative outcomes in a wide range of pathological conditions, including infections (Liu *et al.*, 2011a; Qidwai & Khan, 2016), cancer (Ding *et al.*, 2016b; Mantovani *et al.*, 2004), and immune-mediated disorders (Altara *et al.*, 2016; Antonelli *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017; N. *et al.*, 2015). It is well documented that selective changes in mRNA translation via mTORC1 and MNK signaling contribute to shape pro-and anti-inflammatory responses in macrophages (Chan *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012b). Notably, the translational repressors 4E-BP1/2 control macrophage type I IFN-dependent antiparasitic activity and LPS-inducible anti-inflammatory mediator production (Jaramillo *et al.*, 2011; William *et al.*, 2018b). Herein, we report that 4E-BP1/2 limit translation efficiency of mRNAs encoding the potent pro-inflammatory chemokines CCL5 and CXCL10 in macrophages and thereby hinder their ability to induce the migration of activated T cell populations.

Results

The mTORC1-4E-BP1/2 axis regulates LPS-induced translation initiation and CCL5 and CXCL10 production in macrophages

Signaling through mTORC1 regulates the production of numerous immune-related products in myeloid cells (Weichhart *et al.*, 2008; Weichhart *et al.*, 2011), including the chemokine CCL5 (Lin *et al.*, 2014). However, it remains to be established whether such regulation is, at least in part, dependent on mTORC1-4E-BP1/2-mediated translational control. To begin addressing this issue, we monitored the phosphorylation status of 4E-BP1 and 4E-BP2 in BMDM treated or not with canonical mTOR inhibitors prior to stimulation with *E. coli* LPS, a strong mTOR activator (Weichhart *et al.*, 2008) and a potent inducer of CCL5 and CXCL10 production in macrophages (Bandow *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). Exposure to LPS markedly increased the phosphorylation of 4E-BP1 at all four residues (T37/46, T70, and S65) as observed using phospho-specific antibodies, and by the predominance of the hyperphosphorylated gamma (γ) form over the beta (β , partially phosphorylated) and the alpha (α ; hypophosphorylated) forms (**Fig. 4.1A**). LPS also augmented the phosphorylation of 4E-BP2, as evidenced by an upward shift in the migration pattern of the protein. LPS-inducible 4E-BP1/2 phosphorylation was partially resistant to rapamycin but highly sensitive to active-site mTORC1/2 inhibitors (asTORi) PP242 and Torin-1. Accordingly, asTORi treatment led to a substantial increase in the interaction between 4E-BP1/2 and m⁷GTP-bound eIF4E in LPS-stimulated BMDM (**Fig. 4.1B**). As expected, eIF4G binding to eIF4E was abolished in the presence of PP242 or Torin-1. Although much less potent than asTORi, rapamycin also augmented 4E-BP1:eIF4E interaction, and slightly reduced the amount of eIF4G bound to eIF4E. Consistent with our western blot and cap-pull down experiments, polysome tracings revealed that translation initiation in LPS-stimulated BMDM was slightly down-regulated in the presence of rapamycin, and was disrupted by PP242 (**Figs. 4.1C-D**). Thus, LPS-inducible mTORC1 activity, eIF4F complex formation, and mRNA translation are hindered by mTOR inhibitors in macrophages.

To gain insight into the requirement of the mTORC1-4E-BP1/2 axis for CCL5 and CXCL10 production, we measured cytokine secretion by ELISA in the culture supernatant of cells treated with different mTOR inhibitors at the concentrations that blocked mTORC1 activity and translation initiation in BMDM. Neither CCL5 nor CXCL10 were detected in cultures that were not stimulated with LPS regardless of the presence of the inhibitors (**Figs. 4.1E-F**). Pre-treatment with rapamycin caused a moderate reduction of LPS-induced CCL5 production

compared to levels measured in DMSO-treated cultures but had a greater inhibitory effect on CXCL10 (**Figs. 4.1E-F**). Exposure to asTORi led to a significant down-regulation of chemokine secretion. Of note, differential repression of CCL5 and CXCL10 production by rapamycin and asTORi reflected the greater potency of the latter to activate 4E-BP1/2 (**Figs. 4.1A-B**), as previously reported (Dowling *et al.*, 2010). Importantly, reduced chemokine levels could not be attributed to potential toxic effects of the inhibitors, as indicated by cell viability assays (**Supplemental Fig. 1**). Taken together, these data suggest that mTORC1 activity is required for LPS-mediated CCL5 and CXCL10 protein synthesis in macrophages.

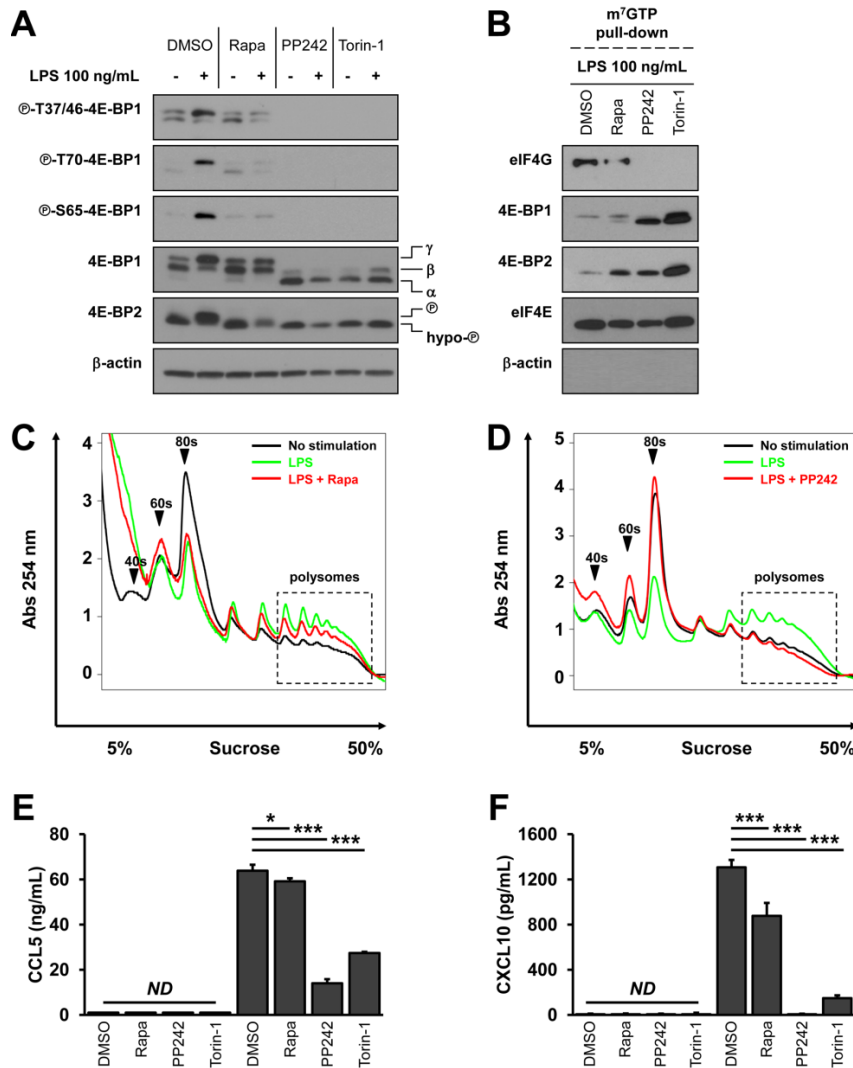


FIGURE 4.1: The mTORC1-4E-BP1/2 axis regulates cellular translation initiation and CCL5 and CXCL10 secretion by LPS-stimulated macrophages.

BMDM cultures were pre-treated with 20 nM rapamycin, 2.5 μ M PP242, 200 nM Torin-1, or an equivalent volume of vehicle (DMSO) for 1 h. **(A-B)** Cells were stimulated or not with 100 ng/mL LPS for 4 h. **(A)** Phosphorylation status and expression levels of 4E-BP1/2 were monitored by western blotting. Total amounts of β -actin were used as a loading control. The hyperphosphorylated gamma (γ), partially phosphorylated beta (β), and hypophosphorylated alpha (α) forms of 4E-BP1 are indicated as well as the higher migrating phosphorylated (\oplus) and hypophosphorylated (hypo- \oplus) forms of 4E-BP2 are indicated accordingly. **(B)** Total protein extracts were prepared for m⁷GTP pull down assays, and levels of indicated proteins in pulled-down material were determined by western blotting. **(C-D)** Polysome tracings of BMDM stimulated with LPS with or without rapamycin **(C)** or PP242 **(D)** for 4 h. **(E-F)** Culture supernatants were collected after 24 h of no treatment or LPS stimulation with or without mTOR inhibitors, and CCL5 **(E)** and CXCL10 **(F)** levels were measured by sandwich ELISA. **(A-D)** Data are representative of at least two independent experiments. **(E-F)** Results are presented as mean [SD] (n = 3 independent experiments). Each independent experiment consisting of pools of BMDM isolated from different mice (pools of 2 to 3 mice per genotype). Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, and "ND" indicates that cytokines were not detected in these samples.

4E-BP1/2 dampen translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs

The mTORC1-4E-BP1/2 axis contributes to coordinate efficient immune responses (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011; Nehdi *et al.*, 2014; Piccirillo *et al.*, 2014), yet selective 4E-BP1/2-dependent translational control of macrophage functions remains incompletely defined. Polysome profiling of WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM quantified by nCounter® assays (mouse immunology panel) (**Fig. 4.2A**) allowed us to identify several immune-related mRNAs whose translational efficiency is under the control of 4E-BP1/2 (William *et al.*, 2018a). Of note, the top two transcripts identified in our screening were those encoding CCL5 and CXCL10. Target identification was achieved using the anota algorithm, which specifically captures differences in translational efficiency of individual transcripts independent of changes in total mRNA levels (Larsson *et al.*, 2011). Indeed, the graphical representation of anota analysis showed that *Ccl5* (left panel) and *Cxcl10* (right panel) mRNAs were more abundant in polysome-associated mRNA pools in 4E-BP1/2 DKO than in WT BMDM (fold-change = 21.40 and 13.83, respectively) (**Fig. 4.2B**). These differences were not attributable to changes in transcription since total cytosolic mRNA levels were similar between genotypes. In Fig. 2B, each biological replicate (i.e. independent experiment) is denoted by an "X" while the lines correspond to regressions used by anota to adjust changes in polysome-associated mRNA levels (y-axis) for changes in total cytosolic mRNA levels (x-axis). A difference in intercepts of the regression lines on the y-axis (i.e. when total cytosolic mRNA is set to 0) indicates changes in translational efficiency (when there is no change in translational efficiency, there is no difference in intercept). Thus, translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs is regulated by 4E-BP1/2 in macrophages. The length and structure of 5' UTR has been linked to selective translational control through the mTORC1-4E-BP1/2-eIF4E axis (Masvidal *et al.*, 2017b). Bioinformatic analysis of transcripts regulated via 4E-BP1/2 in macrophages indicated that *Ccl5* and *Cxcl10* fall into the category of those that harbor relatively short 5' UTRs (57 and 75 nt, respectively) with a minimum free energy (MFE) of -17.8 and -16.2 kcal/mol, respectively (**Supplemental Fig. 2**). Interestingly, *Ccl5* and *Cxcl10* share these features with *Il1a*, *Il1b*, *Il10*, *Il12b*, *Ccl12*, and *Cd40* (William *et al.*, 2018a). These similarities suggest a common mechanism of 4E-BP1/2-dependent selective translational control of immune-related mRNAs in macrophages.

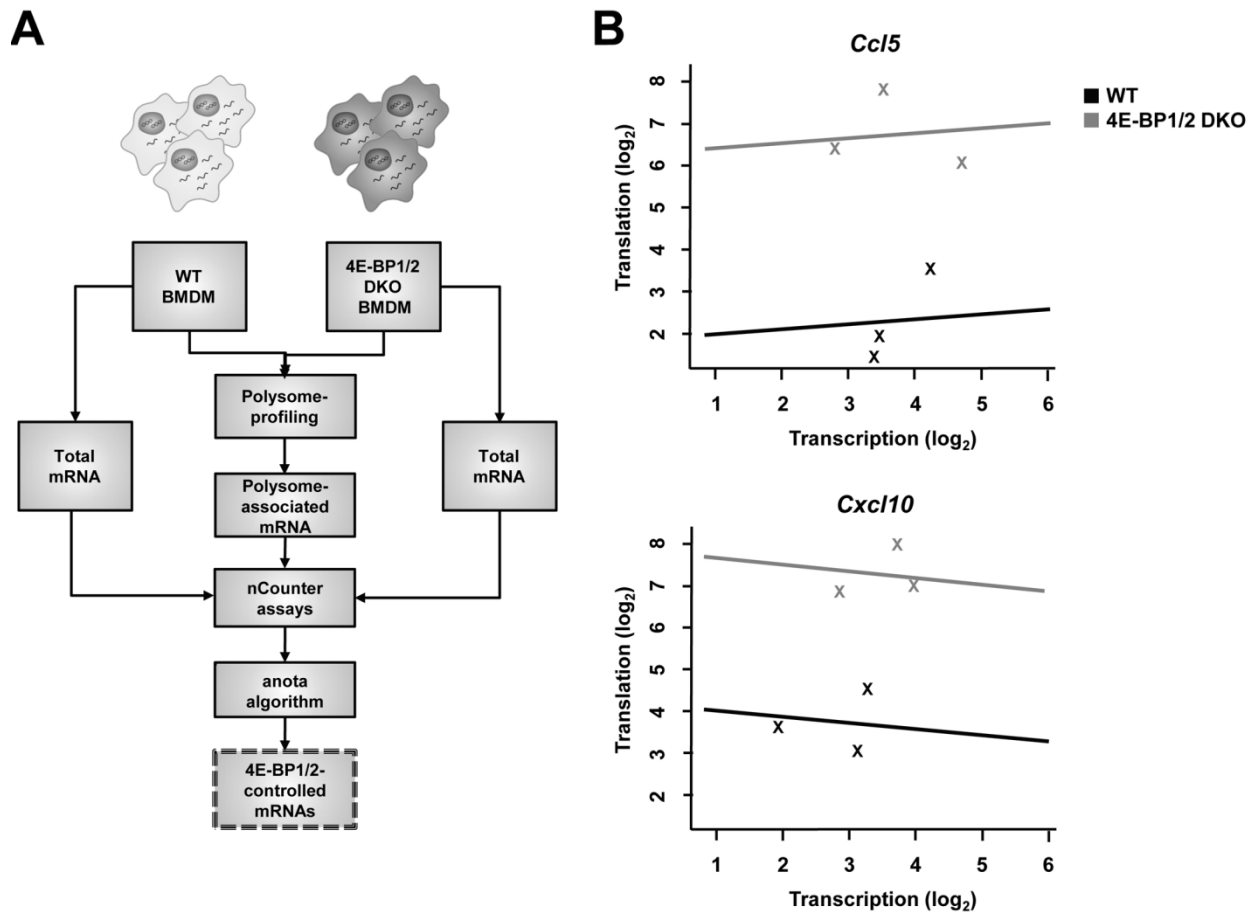


FIGURE 4.2: Translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs is repressed by 4E-BP1/2 in macrophages

(A) Schematic diagram outlines the strategy employed to identify translationally-controlled mRNAs by 4E-BP1/2 in BMDM. Cytosolic extracts from WT and 4E-BP1/2 DKO primary macrophages were sedimented on a sucrose gradient. Heavy polysome fractions (i.e. with mRNA associated to ≥ 3 ribosomes) were pooled (referred to as polysome-associated mRNA) and quantified in parallel with total mRNA (input) using targeted nCounter assay (nCounter[®] Mouse Immunology Panel, Nanostring) ($n = 3$ independent experiments). Each independent experiment consisting of pools of BMDM isolated from different mice (pools of 5 mice per genotype). Data were analyzed by anota, and mRNAs differentially regulated were identified. **(B)** Translational efficiency of *Ccl5* (top panel) and *Cxcl10* (bottom panel) in 4E-BP1/2 DKO cells as compared to WT cells. Shown is the fold-increase (\log_2) in total cytosolic mRNAs levels ("Transcription", x-axis) vs. heavy polysome-associated mRNAs levels ("Translation", y-axis) for each genotype. Each independent experiment is denoted by an "X" ($n = 3$). Lines indicate regressions used by anota to adjust changes in polysome-associated mRNA levels for changes in cytosolic mRNA levels.

LPS favors *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA translation by limiting the activity of 4E-BP1/2

To validate the data obtained from the nCounter® analysis and to further delineate changes in translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA, we fractionated RNA from WT and 4E-BP1/2 DKO macrophages both at steady-state and following LPS stimulation by polysome-profiling (**Fig. 4.3A**). Subpolysomal (untranslated or poorly translated), and light (>1 and ≤ 3 ribosomes; efficiently translated) and heavy polysome (≥ 3 ribosomes; highly efficiently translated) fractions were pooled and RT-qPCR analyses were performed to measure mRNA distribution of *Ccl5* and *Cxcl10*. In steady-state WT cells, the highest amount of *Ccl5* mRNA was found in subpolysomal fractions (~60.0%) while the remainder was detected at near equal amounts in light and heavy polysomes (~19.6% and ~20.5%, respectively). In stark contrast, distribution of *Ccl5* was skewed towards light and heavy polysomes in 4E-BP1/2 DKO macrophages (~27.6%, ~37.6%, and ~34.8%) (**Fig 4.3B**, top left panel). Exposure to LPS caused a substantial shift in the distribution of *Ccl5* mRNA from subpolysomal to light polysome fractions in WT cells (~36.7% and ~46.7%, respectively). Conversely, no major changes were observed in LPS-treated cells as compared to unstimulated 4E-BP1/2 DKO BMDM (**Fig 4.3B**, top right panel). A similar trend was observed for *Cxcl10* mRNA distribution across polysome profiles. Subpolysomal fractions contained the greatest amounts of *Cxcl10* mRNA in resting WT cells, while it was evenly distributed in 4E-BP1/2 DKO macrophages (**Fig 4.3B**, middle left panel). Upon LPS treatment, light polysome fractions were enriched for *Cxcl10* mRNA in WT BMDM, yet no such changes were detected in 4E-BP1/2 DKO cells (**Fig 4.3B**, middle right panel). In contrast to *Ccl5* and *Cxcl10*, *Gapdh* mRNA was mostly present in heavy polysome fractions regardless of genotype and activation status of the cells (**Fig 4.3B**, bottom panels). Importantly, no significant differences were observed in total levels of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA between genotypes (**Fig. 4.3C**). These data, along with our previous observations regarding *Il-10* and *Cox-2/Ptgs2* (William *et al.*, 2018a), support the notion that LPS enhances translation efficiency of specific immune transcripts, including *Ccl5* and *Cxcl10*, by limiting the activity of 4E-BP1/2.

In line with increased translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNAs in the absence of 4E-BP1/2 (i.e. higher levels of heavy polysome-associated mRNA), a significant up-regulation in CCL5 and CXCL10 secretion was observed in LPS-stimulated 4E-BP1/2 DKO BMDM as compared to WT counterparts (**Figs. 4.4A-B**). In addition to the modulation of 4E-BP1/2 activity, eIF4E-dependent translational control of select immune-related mRNAs occurs via the MNK-eIF4E axis (Furic *et al.*, 2010; Nikolcheva *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012b). Of note,

inhibition of MNK signaling has been linked to a reduction in CCL5 and CXCL10 production (Seidel *et al.*, 2016). Surprisingly, BMDM derived from mice mutated at the residue where eIF4E is phosphorylated (i.e. eIF4E S209A knock-in (KI)) (Furic *et al.*, 2010) secreted similar levels of CCL5 and CXCL10 to their WT counterparts in response to LPS stimulation (**Figs. 4.4C-D**). This set of experiments provides evidence that LPS promotes *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA translation in macrophages via mTORC1-4E-BP1/2-dependent and MNK-eIF4E-independent mechanisms.

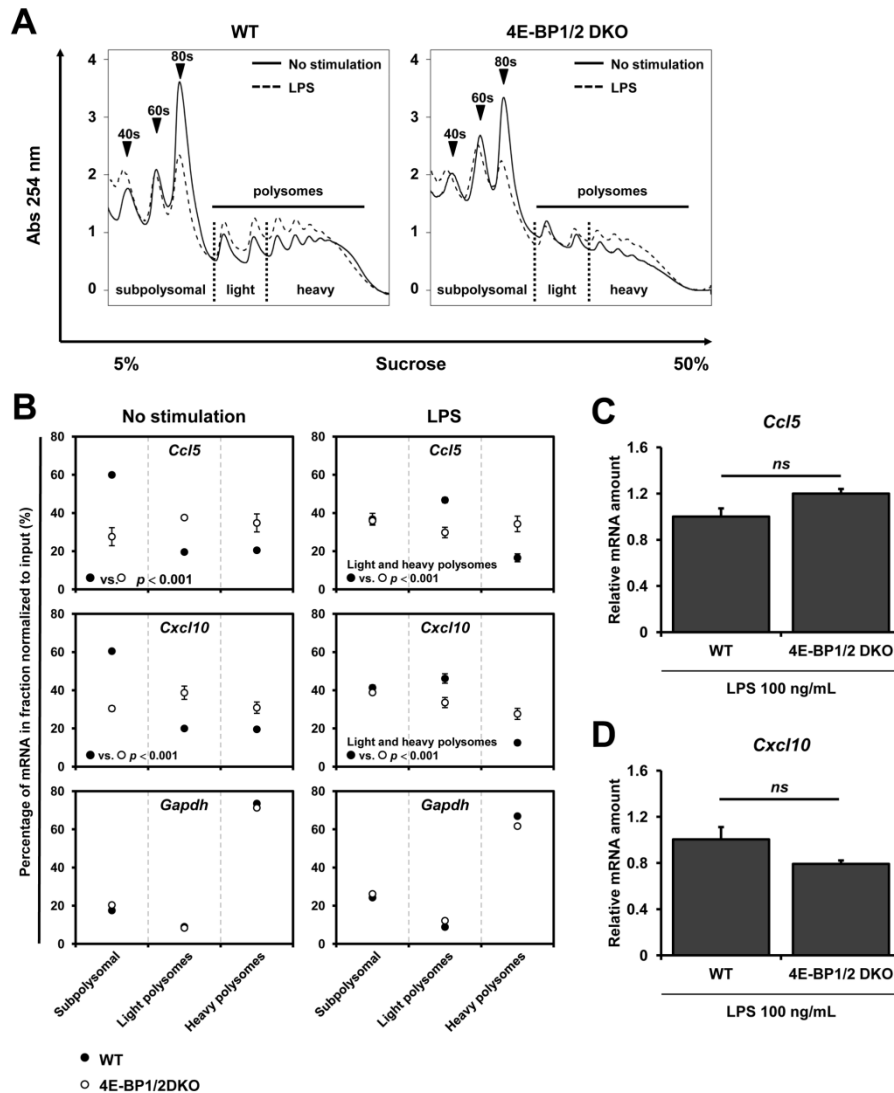


FIGURE 4.3: LPS-induced *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA translation is regulated by 4E-BP1/2 in macrophages.

(A) WT (left panel) and 4E-BP1/2 DKO (right panel) BMDM cultures were stimulated with 100 ng/mL LPS (dashed line) or left untreated (solid line) for 4h. Cell lysates were sedimented onto 5 to 50% sucrose gradients. Gradients were fractionated and absorbance at 254 nm was recorded continuously. Arrows indicate the 40S and 60S ribosomal subunits, and 80S (monosomes). Regions corresponding to subpolysomal, and light (>1 and \leq 3 ribosomes) and heavy polysome (\geq 3 ribosomes) fractions are indicated under the tracings. Polysome tracings are representative of three independent experiments. (B) Amount of *Ccl5* (top panels), *Cxcl10* (middle panels), and *Gapdh* (bottom panels) mRNA in subpolysomal, and light and heavy polysome fraction pools were determined by RT-qPCR. Analysis was performed in WT and 4E-BP1/2 DKO macrophages at steady-state (no stimulation, left column) and after 4 h of LPS stimulation (right column). Results are expressed as percentage of a given mRNA in each fraction. (C-D) Relative mRNA amounts of total *Ccl5* (C) and *Cxcl10* (D) mRNAs in LPS-treated WT and 4E-BP1/2 DKO macrophages were measured by RT-qPCR. Relative expression was normalized to *Gapdh* and relative quantification was calculated using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$). (B-D) Data are represented as mean [SD] (n = 3 independent experiments). Each independent experiment consisting of pools of BMDM isolated from different mice (pools of 5 mice per genotype). Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test; ns = not significant.

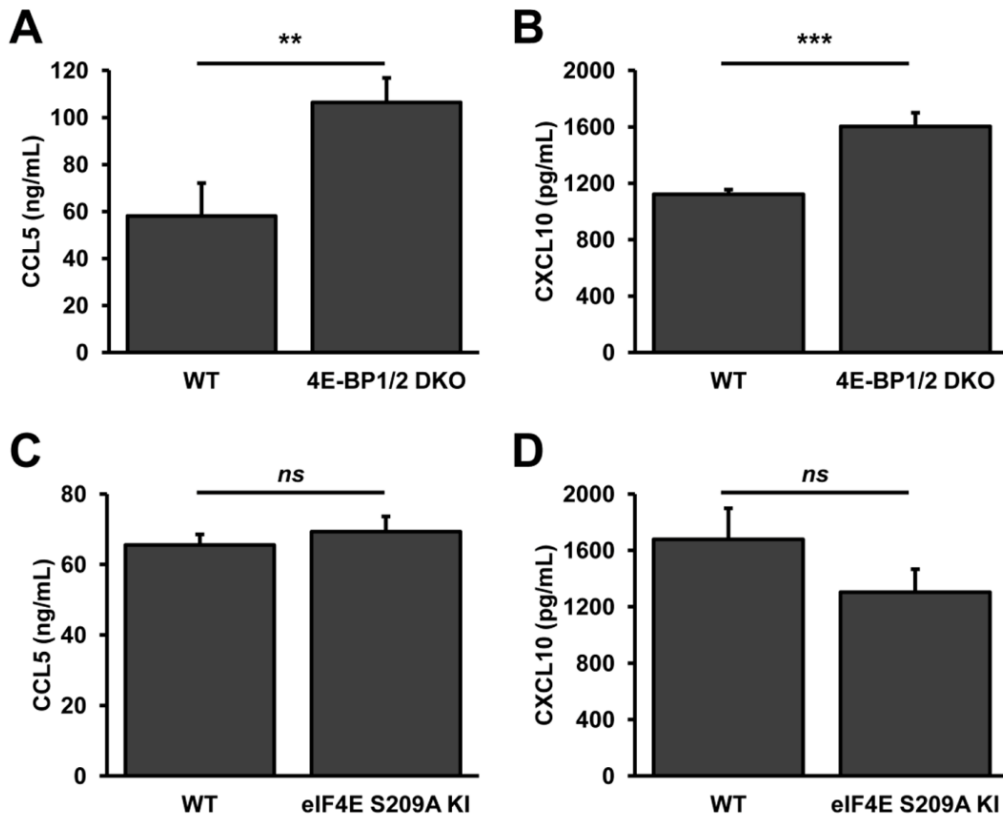


FIGURE 4.4: LPS induces CCL5 and CXCL10 protein synthesis via 4E-BP1/2-dependent and MNK-eIF4E-independent mechanisms in macrophages.

WT and 4E-BP1/2 DKO (A-B) or eIF4E S209A KI (C-D) BMDM were stimulated with 100 ng/mL LPS or left unstimulated for 24 h. (A, C) CCL5 and (B, D) CXCL10 levels were measured by sandwich ELISA. Data are represented as mean [SD] (n = 3 independent experiments). Each independent experiment consisting of pools of BMDM isolated from different mice (pools of 2 to 3 mice per genotype). Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *ns* = not significant.

4E-BP1/2 control the production of CCL5- and CXCL10 by macrophages and limit their ability to attract T cells.

CCL5 and CXCL10 are potent chemoattractants and activators of CCR5⁺ and CXCR3⁺ T lymphocytes, respectively (Appay & Rowland-Jones, 2001; Liu *et al.*, 2011a). Therefore, we hypothesized that elevated CCL5 and CXCL10 secretion by 4E-BP1/2 DKO BMDM would enhance their ability to favor the migration of activated T cells. Initially, we isolated murine splenocytes and activated with Con A *in vitro* to induce the expression of CXCR3 and CCR5. Flow cytometric analysis determined that ~72.9% of splenocytes were CD3⁺ T lymphocytes, and that ~21.4% of the latter were CXCR3⁺ and ~41.2% were CXCR3⁺CCR5⁺ double-positive (**Fig. 4.5A**). Activated splenocytes were then used as target cells in chemotaxis assays performed in the presence of conditioned medium (CM) from steady-state and LPS-treated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (**Fig. 4.5B**). Greater numbers of activated T cells migrated towards CM from LPS-treated 4E-BP1/2 DKO cells as compared to CM from WT macrophages ($P < 0.01$) (**Fig. 4.5C**). Moreover, incubation of CM with neutralizing antibodies against CCL5 and CXCL10 prior to chemotaxis assays impaired migration of T cells exposed to CM from LPS-stimulated WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM ($P < 0.01$). Conversely, no negative effect on T cell chemotaxis was detected following incubation of CM with isotype-matched control antibodies (**Fig. 4.5C**). Collectively our data indicate that 4E-BP1/2 contribute to regulate the migration of CCL5- and CXCL10-responsive cells by limiting translational efficiency of *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA and subsequent protein synthesis and secretion by macrophages.

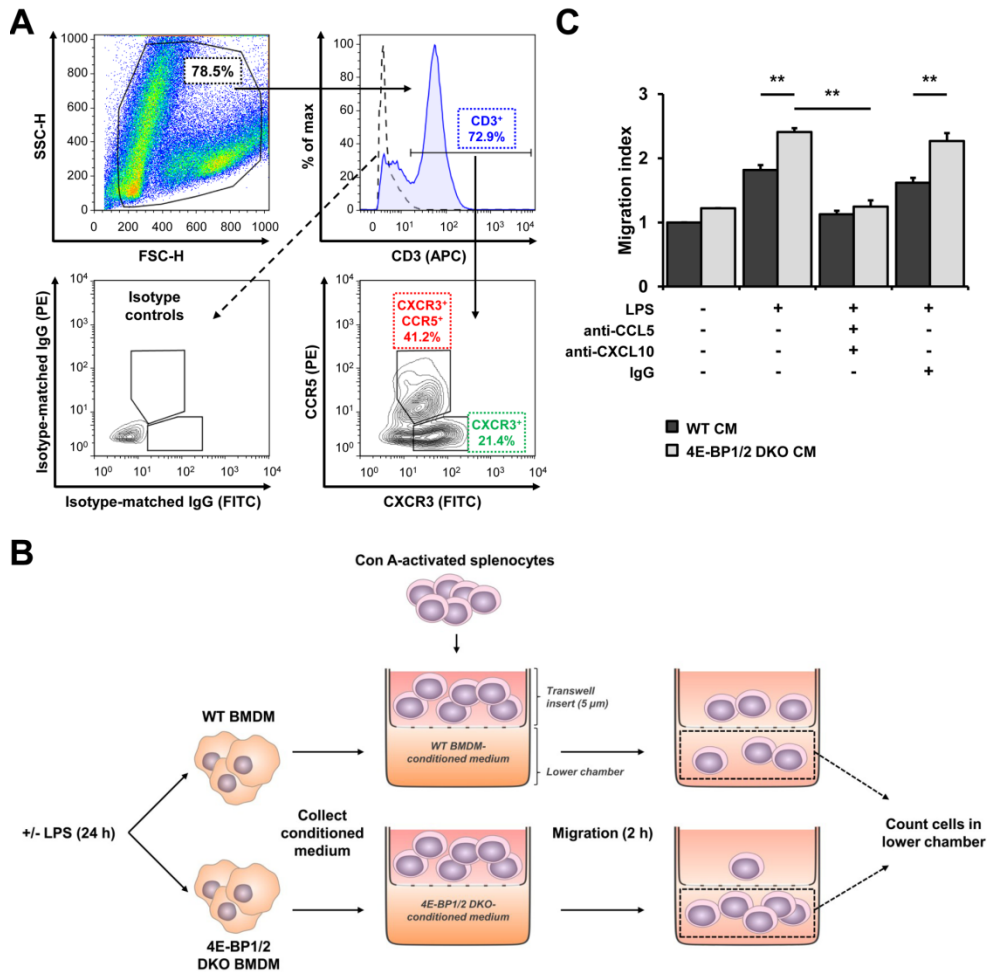


FIGURE 4.5: 4E-BP1/2 restrain the ability of macrophages to attract activated T cells through translational repression of CCL5 and CXCL10

(A) Flow cytometry gating strategy employed to assess CCR5 and CXCR3 expression in Con A-activated splenocytes. Debris, cell clumps, and large particulates were first removed by gating on cells, according to forward- and side-scatter profiles (FSC and SSC, respectively). Gating on CD3 ϵ -positive cells was conducted to identify the T cell population. CXCR3 and CCR5 expression was then assessed in the CD3⁺ T cell population. Isotype-matched antibodies were used to monitor non-specific binding and to draw gates (dashed line in top-right panel, and contour plot in lower-left panel). Shown here are representative data from three independent experiments. **(B)** Schematic diagram of the procedure employed to measure migration of activated T cells exposed to conditioned medium from WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM. Cells were stimulated with 100 ng/mL LPS or left untreated for 24 h. Conditioned-medium (CM) was collected and added to the lower chambers of transwell plates. Con A-activated splenocytes, target cells for the chemokines of interest, were added to 5 μ m pore size transwell inserts and allowed to migrate for 2 h at 37°C, 5% CO₂. Cells that had migrated towards the lower chamber were counted. **(C)** Migration index refers to the number of migrated splenocytes in each condition normalized to that observed with CM from unstimulated WT BMDM. Neutralizing antibodies against CCL5 (1 μ g/mL) and CXCL10 (5 μ g/mL) or isotype-matched control antibodies (IgG) were added to CM, as indicated, and incubated 1 h at 37°C before the start of the assay. Data are represented as mean [SD] (n = 3 independent experiments). Each independent experiment consisting of pools of BMDM isolated from different mice (pools of 2 to 3 mice per genotype). Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. ** p < 0.01.

Discussion

Translational repression has emerged as a central regulatory mechanism of inflammatory responses (Mazumder *et al.*, 2010; Schott *et al.*, 2014). In this regard, a number of studies indicate that in addition to RNA-binding proteins and microRNAs (miRNAs) (Anderson, 2010; Johanna & Georg, 2010), eIF4E inhibitory proteins 4E-BP1/2 coordinate the onset and resolution of inflammation via translational silencing (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2007; Nehdi *et al.*, 2014; William *et al.*, 2018c). Extending these previous findings, we demonstrate that 4E-BP1/2 act as negative regulators of the pro-inflammatory chemokines CCL5 and CXCL10. Indeed, genetic deletion of 4E-BP1/2 in primary mouse macrophages led to translational derepression of *Ccl5* and *Cxcl10* transcripts. As such, higher levels of heavy polysome-associated *Ccl5* and *Cxcl10* (i.e. highly efficient translated) mRNAs in 4E-BP1/2 DKO cells correlated with enhanced CCL5 and CXCL10 protein synthesis. Consequently, CCR5⁺/CXCR3⁺ T cell chemotaxis was enhanced towards CM from 4E-BP1/2 DKO macrophages following TLR4 stimulation. Thus, our data support the notion that selective 4E-BP1/2-dependent translational control of macrophage functions contributes to orchestrate T cell migration to inflammatory sites.

The pleiotropic chemokines CCL5 and CXCL10 regulate cell migration, proliferation, metabolism, and survival in response to stress (e.g. infection, injury, energy status, etc.) (Gao *et al.*, 2016; Khalid *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2011b). As such, their expression must be quickly adjusted through a combination of mechanisms to ensure efficient cell activation while preventing deleterious responses (Bandow *et al.*, 2012; Carpenter *et al.*, 2013; Mortier *et al.*, 2008; Nikolcheva *et al.*, 2002). It is well documented that post-transcriptional control via changes in mRNA stability has a major impact in CCL5 and CXCL10 production (Johanna & Georg, 2010; Marcais *et al.*, 2006; Vockerodt *et al.*, 2005). Although less investigated, several reports have shown that CCL5 and CXCL10 expression is also regulated at the level of mRNA translation (Basu *et al.*, 2014b; Kariminik *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2008; Kroczyńska *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014; N. *et al.*, 2015; Perry *et al.*, 2008; Poddar *et al.*, 2015; Seidel *et al.*, 2016; Swanson *et al.*, 2002). Indeed, various mechanisms of translational control have been described for CCL5, including miRNAs, readenylation, and potentially the IFN γ -activated inhibitor of translation (GAIT) complex (Basu *et al.*, 2014b; Perry *et al.*, 2008; Poddar *et al.*, 2015; Swanson *et al.*, 2002). In regards to CXCL10, previous works in MEFs deficient in 4E-BP1 or S6K1/2 pointed to a mechanism of mTORC1-dependent translational control triggered by IFN γ (Kaur *et*

al., 2007; Kroczyńska *et al.*, 2009). Indeed, differential CXCL10 protein expression between WT and 4E-BP1 KO or S6K1/2 DKO MEFs was not paralleled by altered *Cxcl10* mRNA transcription; however, experimental data on *Cxcl10* translation efficiency was lacking (i.e. distribution of *Cxcl10* mRNA across polysome profiles). Moreover, mRNA and protein levels of CXCL10 were assessed only after 48 h of IFN- γ treatment; thus, it is conceivable that early transcriptional changes and/or indirect mechanisms of translational control were at least in part responsible for the phenotype observed in 4E-BP1 and S6K1/2 deficient cells. Of note, the contribution of S6K1/2 and 4E-BP1 to such regulation was not resolved. In the current study, polysome-profiling quantified by two different methods (i.e. nCounter assays and RT-qPCR) confirmed that translation efficiency of *Cxcl10* mRNA is under the control of 4E-BP1/2 and demonstrated that this is also the case for *Ccl5*. Intriguingly, *Ccl5* and *Cxcl10* were not identified as mRNAs translated in a 4E-BP1/2-sensitive fashion in a comparative analysis of the translome of WT and 4E-BP1/2 DKO MEFs (i.e. transcriptome-wide analysis pools of efficiently translated mRNA) (Colina *et al.*, 2008). Upon first consideration, these observations would seem inconsistent with our findings and those published in IFN- γ -stimulated 4E-BP1 KO MEFs (Kaur *et al.*, 2007). However, these discrepancies could be attributed to specific translational programs triggered by different stimuli or stressors in immune versus nonimmune cells, as described by others and by us (Jaramillo *et al.*, 2011; Masvidal *et al.*, 2017b; Miloslavski *et al.*, 2014; William *et al.*, 2018c).

In addition to mTORC1-mediated 4E-BP1/2 inactivation, eIF4E-dependent translational control of immune-related transcripts relies on the MNK-eIF4E axis (Chan *et al.*, 2012; Furic *et al.*, 2010; Herdy *et al.*, 2012a; Nikolcheva *et al.*, 2002; Piccirillo *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012b). In regards to CCL5 and CXCL10, several lines of evidence indicate that MNK1/2 regulate their expression through different mechanisms (Furic *et al.*, 2010; Nikolcheva *et al.*, 2002; Robichaud *et al.*, 2018b; Seidel *et al.*, 2016). Activation of MNK1/2 was shown to be required for late transcription of *Ccl5* mRNA via translational control of the transcription factor RFLAT-1 in IL-2-treated T cells (Nikolcheva *et al.*, 2002). Similarly, inhibition of MNK1/2 abrogated *Cxcl10* transcription and CXCL10 secretion in TNF stimulated smooth muscle cells (Seidel *et al.*, 2016). Interestingly, the authors also showed that CCL5 and CXCL10 protein expression was reduced in MNK1 knock-down cells as compared to WT controls (Seidel *et al.*, 2016). Surprisingly, no experimental evidence on differential transcription and/or mRNA translation was provided. Of note, polysome-profiling of WT and eIF4E S209A KI MEFs quantified by microarray did not identify *Ccl5* and *Cxcl10* as targets of translational control via the MNK-eIF4E axis (Furic *et al.*, 2010). Moreover, a later study from the same group did not

report any differences in CCL5 and CXCL10 serum levels in tumor-bearing WT and eIF4E S209A KI mice (Robichaud *et al.*, 2018c). In line with these data, we observed that LPS-stimulated WT and eIF4E S209A KI BMDM secrete similar levels of CCL5 and CXCL10. Thus, we conclude that the phosphorylation status of eIF4E does not affect the synthesis of these chemokines in our experimental setting. However, we cannot exclude the possibility that MNK1/2 regulate the expression of CCL5 and CXCL10 in an eIF4E-independent manner. Indeed, phosphorylation of the RNA-binding protein hnRNP A1 by MNK1/2 was shown to relieve *Tnf* mRNA from translational repression in activated T cells (Buxade *et al.*, 2005). Thus, it is conceivable that other mRNAs coding pro-inflammatory factors are regulated through a similar mechanism. Further characterization of MNK-dependent translational control in immune cells will shed light on this matter.

In view of our findings, we postulate that the translational repressors 4E-BP1/2 might link innate and adaptive immune responses by acting as immunological "safeguards" to curtail excessive CCL5 and CXCL10 secretion by macrophages and to avoid subsequent exacerbated T cell-mediated responses. Indeed, both chemokines are key mediators of protective immune responses during viral, bacterial, and parasitic infections (Qidwai & Khan, 2016). Paradoxically, CCL5 and CXCL10 can also lead to organ destruction and favor pathogen survival, depending on factors such as host immune status, genetic polymorphisms, and microbial products (Liu *et al.*, 2011a; Qidwai & Khan, 2016). In addition, CCL5 and CXCL10 are implicated in the pathogenesis of a wide range of inflammatory, autoimmune, and degenerative diseases (e.g. arthritis, type I diabetes, Alzheimer's, and cardiovascular diseases) (Altara *et al.*, 2016; Antonelli *et al.*, 2014; Appay & Rowland-Jones, 2001), and their production is elevated in various cancers (e.g. breast, colorectal, ovarian, and gastric cancer) (Ding *et al.*, 2016b; Gao *et al.*, 2016; Khalid *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Wightman *et al.*, 2015; Zumwalt *et al.*, 2015). Intriguingly, both anti-tumoral and oncogenic properties have been attributed to CCL5 and CXCL10 (Liu *et al.*, 2015; Palacios-Arreola *et al.*, 2014; Wightman *et al.*, 2015; Zumwalt *et al.*, 2015). Even though the effects of CCL5-CCR5 and CXCL10-CXCR3 signaling in tumors are likely to be multifactorial, recent studies indicate that their ability to drive proliferation and metastatic potential of cancer cells is, at least in part, mediated by the induction of matrix metalloproteinases (MMPs), namely MMP-2 and MMP-9 (Ding *et al.*, 2016b; Zhou *et al.*, 2016b). In the tumor microenvironment, various types of cells, including tumor-associated macrophages (TAMs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) produce high levels of CCL5 (Ding *et al.*, 2016b; Subramaniam *et al.*, 2013). Hence, the regulatory node mTORC1-4E-BP1/2 might emerge as an attractive therapeutic target

to fine-tune the expression of CCL5 and CXCL10. This consideration could be of particular interest in cancers with altered eIF4E/4E-BP ratios and/or elevated phosphorylation of 4E-BPs due to a hyperactivated mTORC1 pathway (Alain *et al.*, 2012a; Bhat *et al.*, 2015). Importantly, similar therapeutic applications might be relevant during infectious diseases in which the mTORC1-4E-BP1/2 axis is dysregulated (Mohr & Sonenberg, 2012). Collectively, our findings highlight the key role of eIF4E-dependent translational control of immunological mediators produced by macrophages, and suggest that aberrant activity of mTORC1-4E-BP1/2 during diseased states could result in unchecked immune responses. Ultimately, a better understanding of how chemokine expression is regulated at the level of mRNA translation might contribute to identify mechanisms potentially targetable by macrophage-centered therapeutics.

Materials and Methods

Reagents

Culture media and supplements were purchased from Wisent; LPS *Escherichia coli* serotype 0111:B4), concanavilin (Con) A, cycloheximide, and resazurin sodium salt were acquired from Sigma-Aldrich; RNasin was provided by Promega; rapamycin (sirolimus) was obtained from LC Laboratories; Torin-1 was purchased from Cayman; PP242 was acquired from Chemdea; PowerUp™ SYBR® Green Master Mix was obtained from Applied Biosystems; complete EDTA-free protease inhibitor and PhosSTOP phosphatase inhibitor tablets were purchased from Roche.

Bone marrow-derived macrophage (BMDM) differentiation

Hind legs from *Eif4ebp1*^{-/-}/*Eif4ebp2*^{-/-} and eIF4E^{S209A/S209A} C57BL/6 mice (Colina *et al.*, 2008; Furic *et al.*, 2010) and their wild-type (WT) littermates, originally purchased from The Jackson Laboratories, were kindly provided by Dr. Nahum Sonenberg (McGill University, Montreal, QC, Canada). All procedures were in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the *Comité institutionnel de protection des animaux* of the INRS (CIPA #1611-10). Murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained by differentiating precursor cells, as previously described (William *et al.*, 2018a). Briefly, cells were resuspended in BMDM culture medium (DMEM, 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamate, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) supplemented with 15% L929 fibroblast-conditioned culture medium (LCCM). Cells were seeded in tissue culture-treated dishes, and the following day, non-adherent cells were collected, resuspended in BMDM culture medium supplemented with 15% LCCM, and plated in non-treated Petri dishes. LCCM was added every 2 days (~1.5 mL/dish), and differentiated BMDM were collected 8 days after marrow extraction. Differentiation of precursor cells into macrophages was routinely assessed by monitoring CD11b and F4/80 co-expression by flow cytometry (**Supplemental Fig. 3A**). Viability of WT and 4E-BP1/2 DKO cells was compared using the resazurin colorimetric assay (**Supplemental Fig. 3B**), as described below.

BMDM treatment and viability assays

Cells were plated one day prior to treatment in BMDM culture medium and allowed to adhere O/N at 37°C, 5% CO₂. When applicable, cells were pre-treated with 20 nM rapamycin, 2.5 μM PP242, 200 nM Torin-1, or an equivalent volume of vehicle (DMSO) for 1 h. Cells were either left unstimulated or stimulated with 100 ng/mL LPS for 4 to 24 h, as indicated. For viability experiments, cells were treated with the various inhibitors in the presence of LPS for 24 h. Medium was removed and replaced with fresh BMDM culture medium supplemented with 0.025% resazurin. Cultures were incubated for 6 h at 37°C, 5% CO₂, then optical density was measured using a Multiskan GO (Thermo-Fisher) at 600 and 570 nm. Absorbance at 600 nm was subtracted from readings at 570 nm, values from wells without any cells were used as blanks, and DMSO-treated cells were used to normalize values.

Western blot analysis

Cells were lysed in ice-cold RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), supplemented with phosphatase and EDTA-free protease inhibitor cocktails (Roche). Total protein samples were processed for SDS-PAGE and western blotting, as previously described (William *et al.*, 2018a). Total and phospho-specific primary antibodies were purchased from BD Biosciences, anti-eIF4E (#610270), and Cell Signaling Technology: anti-phospho-4E-BP1 (T37/46) (#2855), anti-phospho-4E-BP1 (T70) (#9455), anti-phospho-4E-BP1 (S65) (#9451), anti-4E-BP1 (#9644), anti-4E-BP2 (#2845), anti-eIF4G (#2498), and anti-β-actin (#3700). Secondary goat anti-rabbit and goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibodies were obtained from Sigma-Aldrich.

m⁷GTP-agarose pull down assays

Following treatment, cultures were lysed in ice-cold Buffer A (lysis buffer; 50 mM MOPS pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% IGEPAL CA-630, 1% sodium deoxycholate, 7 mM β-mercaptoethanol) supplemented with phosphatase and EDTA-free protease inhibitor cocktails. Samples were processed for m⁷GTP-agarose pull down assays, as described (William *et al.*, 2018a). Briefly, ~0.5 mg of proteins of each sample were mixed with 50% slurry of 2'/3'-EDA-m⁷GTP immobilized on agarose beads (#AC-142S, Jena Bioscience) and diluted up to 1 ml with Buffer B (wash buffer; 50 mM MOPS pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM GTP) supplemented with phosphatase and EDTA-free protease inhibitor cocktails. Samples were mixed for 1 h at 4°C with end-over-end mixing, and beads were pelleted by centrifugation, washed twice with Buffer B, then resuspended in Laemmli loading buffer for further analysis by western blotting.

ELISA

Cells were seeded in 96-well plates (2×10^5 cells/well). Following treatment, culture supernatants were collected, and the concentration of secreted CCL5 and CXCL10 was measured by sandwich ELISA using the mouse CCL5 (#DY478-05) and CXCL10 (#DY466-05) DuoSet ELISA kits (R&D Systems), according to the manufacturer's specifications.

5' UTR analysis

5'UTRs of murine *Ccl5* and *Cxcl10* were retrieved from the mm10 genome build using the UCSC Table Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Minimum free energy (MFE) and secondary structures were obtained from the "foldUtr5" table which contains MFE structures computed using RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011). Secondary structures were plotted using VARNA (Darty *et al.*, 2009).

Polysome-tracing analysis and RNA fractionation

Samples were processed for polysome-tracing and RNA fractionation as previously described (William *et al.*, 2018a). Briefly, following treatment, cells were washed three times with ice-cold PBS supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX. After centrifugation, cells were lysed in hypotonic lysis buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM KCl, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX, 2 mM DTT, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 200 U RNasin). Cleared lysates were layered onto 5 to 50% (w/v) sucrose density gradients (20 mM HEPES (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX, and 200 U RNasin) and subjected to ultracentrifugation at $221,830.9 \times g$ (SW 41 rotor, Beckman Coulter) for 2 h at 4°C . Gradients were fractionated and collected, and the absorbance at 254 nm was recorded continuously using a Brandel BR-188 density gradient fractionation system.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total and fractionated cytosolic RNA was isolated using QIAzol (Qiagen) and purified using the RNeasy kit (Qiagen), according to the manufacturer's recommendations. Approximately 1 μg of RNA was reverse transcribed using Superscript III reverse transcriptase and oligo(dT) (Invitrogen). Quantitative PCR was performed with PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) using a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosciences). Relative quantification was calculated using the comparative Ct method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) (Taylor *et al.*,

2010) and relative expression was normalized to *Gapdh*. Experiments were performed in independent biological replicates (n = 3); each sample was analyzed in a technical triplicate. Primers were designed using NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The list of primers is provided in Supplemental Table I.

Splenocyte isolation and activation, and flow cytometry

Splenocytes were isolated from naïve C57BL/6 mice. Spleens were ground and passed through a 100 µm-nylon cell strainer to obtain a single-cell suspension. Red blood cells were lysed in ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) for 7 min at RT. Splenocytes were washed with HBSS (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 4.2 mM sodium bicarbonate, 20 mM HEPES), resuspended in culture medium (RPMI, 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamate, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 55 µM β-ME) supplemented with 2 µg/mL Con A, and plated in 24-well plates (2 × 10⁶ cells/well). Activated splenocytes were harvested 48-72 h later and used for transwell migration assays. Expression of CCR5 and CXCR3 in con A-activated splenocytes was assessed by flow cytometry. Briefly, cells were washed and resuspended in FACS buffer (PBS pH 7.4, 0.1% BSA). Fc receptors were blocked with a rat anti-mouse CD16/32 (clone 93; #101301) for 15 min on ice, then stained with the following fluorophore-conjugated antibodies for 30 min on ice: APC-anti-mouse-CD3ε (clone 17A2; #100235), FITC-anti-mouse-CXCR3 (clone CXCR3-173; #126535), and PE-anti-mouse-CCR5 (clone HM-CCR5; #107005). Isotype-matched control antibodies were included to assess non-specific binding as follows: APC-rat IgG2b (clone RTK4530; #4006211), FITC- and PE-Armenian hamster IgG (clone HTK888; #400905 and #400907). All antibodies were purchased from BioLegend. After staining, cells were washed and fixed with 1% PFA in PBS for 10 min on ice. Fixative solution was quenched by rinsing splenocytes with 0.1 M glycine in PBS. BD CompBeads (#552845; BD Biosciences) stained with each fluorochrome in the panel of markers were used as compensation controls. Samples were acquired using a BD FACSCalibur (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star). Note that we have adhered to the *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies* (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201646632/pdf>) for data analysis and graphic representation.

Chemotaxis assay

WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM cultures were stimulated with 100 ng/mL LPS or left unstimulated for 24 h. Conditioned-medium (CM) was collected and added to the lower chambers of transwell plates (Corning). Anti-CCL5 (1 µg/mL; #AF478) and anti-CXCL10 (5 µg/mL; #134013) neutralizing antibodies or isotype-matched control antibodies (R&D Systems) were added to the CM, as indicated, and incubated 1 h at 37°C before the start of the assay. Con A-activated splenocytes were added to 5 µm pore size transwell inserts (5×10^5 cells/insert) and were allowed to migrate for 2 h at 37°C, 5% CO₂. Cells in the lower chamber were enumerated using a hemocytometer.

Statistical Analysis

nCounter data were analyzed using the anota “R” package to identify mRNAs under translational control between WT and 4E-BP1/2 DKO BMDM (Larsson *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2011). Where applicable, statistical differences were calculated using one-way ANOVA embedded in GraphPad Prism 7 software package. Results are presented as the mean ± standard deviation (SD) of the mean. Differences were considered to be statistically significant when * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Acknowledgements

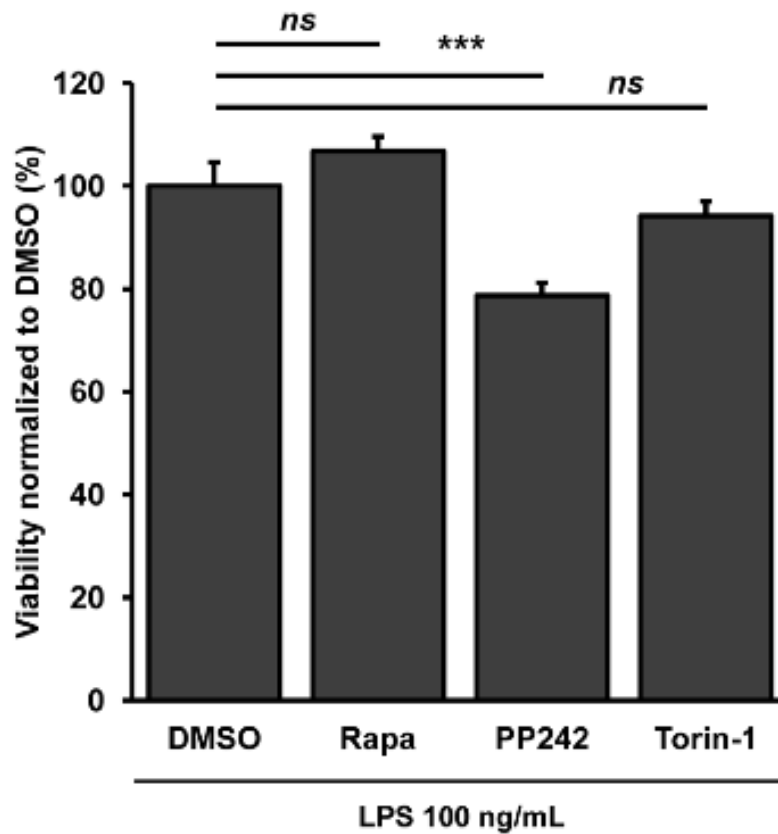
We are grateful to Dr. Nahum Sonenberg for providing the bone marrow of *Eif4ebp1*^{-/-}/*Eif4ebp2*^{-/-} and eIF4E^{S209A/S209A} mice, and Annie Sylvestre and Annik Lafrance for invaluable technical assistance. We thank Dr. Ola Larsson and Julie Lorent for data analysis. This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant (422671-2012) to M.J. M.J. is a recipient of a Bourse de chercheur-boursier Junior 1 from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) and a Subvention d'établissement de jeune chercheur from the FRQS. V.C. is supported by a PhD scholarship from the Fondation Universitaire Armand Frappier. The Funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no competing interests.

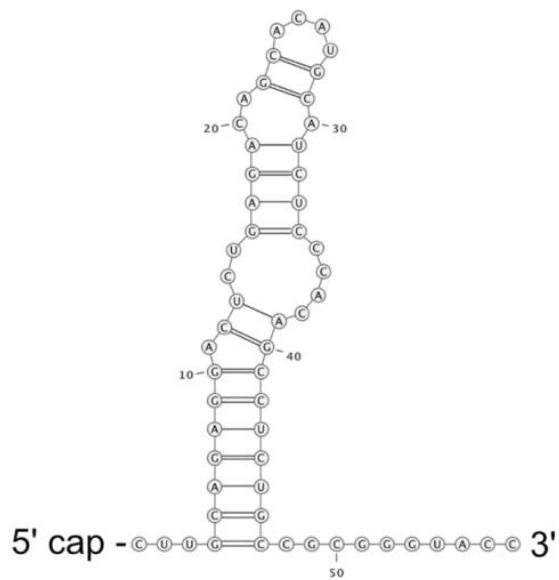
Supplemental Table 4.1. List of primers used for RT-qPCR

Gene	Primer Sequence (5' - 3')
mouse <i>Ccl5</i>	Forward 5' -TCACCATATGGCTCGGACACC-3' Reverse 5' -CACACTTGGCGGTTTCCTTCG-3'
mouse <i>Cxcl10</i>	Forward 5' -CTGCCGTCATTTTCTGCCTC-3' Reverse 5' -ATGATCTCAACACGTGGGCA-3'
mouse <i>Gapdh</i>	Forward 5' -TTCTTGTGCAGTGCCAGCCTC-3' Reverse 5' -CAAATGGCAGCCCTGGTGAC-3'
mouse <i>Rpl19</i>	Forward 5' -GCTGCGGGAAAAAGAAGGTC-3' Reverse 5' -AGCTTCCTGATCTGCTGACG-3'



Supplemental Figure 4.1: Viability assessment of LPS-stimulated BMDM exposed to mTOR inhibitors.

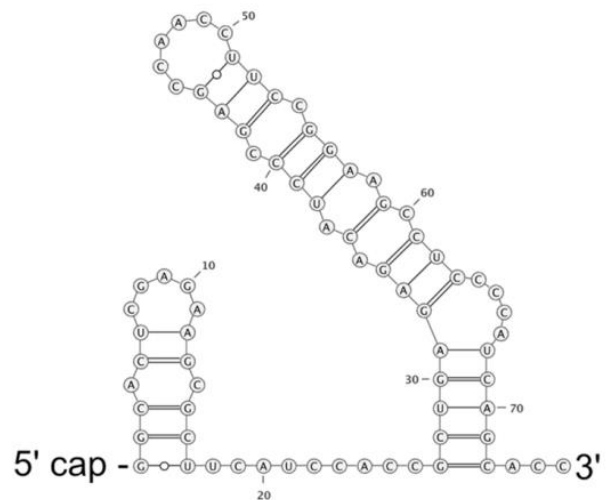
Macrophages were pre-treated with 20 nM rapamycin, 2.5 μ M PP242, 200 nM Torin-1, or an equivalent volume of vehicle (DMSO) for 1 h. Cells were then stimulated with 100 ng/mL LPS for 24 h. Medium was removed and replaced with fresh BMDM culture medium supplemented with 0.025% resazurin. Cultures were incubated for 6 h, then optical density was measured at 600 and 570 nm. Absorbance at 600 nm was subtracted from readings at 570 nm, values from wells without any cells were used as blanks, and DMSO-treated cells were used to normalize values. Data are represented as mean [SD], and differences were considered to be statistically significant when *** $P < 0.01$; ns = not significant.



Ccl5

MFE = -17.8 kcal/mol

5' UTR = 57 nt



Cxcl10

MFE = -16.2 kcal/mol

5' UTR = 75 nt

Supplementary Figure 4.2. Secondary structures of murine *Ccl5* (left panel) and *Cxcl10* (right panel) 5' UTRs as predicted by RNAfold. Minimum free energy (MFE) and 5' UTR length corresponding to each mRNA are indicated under the respective structures. 5'UTRs of murine *Ccl5* and *Cxcl10* were retrieved from the mm10 genome build using the UCSC Table Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Minimum free energy (MFE) and secondary structures were obtained from the "foldUtr5" table which contains MFE structures computed using RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011). Secondary structures were plotted using VARNA (Darty *et al.*, 2009).

CHAPITRE V.

DISCUSSION

1. L'IMPACT DE 4E-BP1/2 DANS LE CONTRÔLE TRADUCTIONNEL DES MACROPHAGES

L'objectif de notre étude était de comprendre le rôle des répresseurs traductionnels 4E-BP1/2 dans le contrôle de la traduction des transcrits liés à la réponse immunitaire et leur impact sur les fonctions des macrophages. Une étude du translatome réalisée à partir de MEFs déficientes pour les répresseurs *Eif4ebp1* et *Eif4ebp2* a décrit le rôle de 4E-BP1/2 dans le contrôle traductionnelle de la réponse immunitaire innée lors des infections virales en identifiant une activité traductionnelle accrue du facteur de transcription IRF7 ayant pour conséquence une augmentation de la production d'interféron de type I, qui a entraîné une résistance aux infections virales dans les MEFs (Colina *et al.*, 2008). Bien que, ces importantes découvertes aient eu d'énormes retombées sur un rôle inconnu de 4E-BP1/2 dans le contrôle traductionnel de l'immunité innée antivirale, ces observations ont été effectuées à partir de cellules non immunitaires. Plus tard, la même équipe a révélé la résistance de macrophages péritonéaux et primaires déficients en 4E-BP1/2 à l'infection par le parasite, *Leishmania major*, due au contrôle traductionnel des mécanismes impliqués dans la production de l'interféron de type I et de l'oxyde nitrique (Jaramillo *et al.*, 2011). L'étude de Nehdi *et al.* a confirmé que la perte de 4E-BP1 ou 4E-BP2 est suffisante pour stimuler l'immunité innée antivirale (Nehdi *et al.*, 2014). Ces résultats précédents indiquent que le contrôle traductionnel via 4E-BP1/2 affecte principalement la réponse immunitaire pro-inflammatoire et antimicrobienne. Lors d'une infection, les cellules immunitaires déclenchent une forte production de cytokines pro-inflammatoires qui vont conduire à l'élimination des pathogènes (Garcia-Sastre & Biron, 2006; Katze *et al.*, 2002; Meylan *et al.*, 2006). Cependant, cette réponse immunitaire non contrôlée peut être néfaste pour l'organisme et doit être hautement régulée pour conduire à un équilibre de la réponse inflammatoire. Jusqu'à présent, le rôle des 4E-BP1/2 dans la réponse anti-inflammatoire induite par les macrophages n'a pas encore été exploré. Basée sur l'ensemble de ces données, nous avons émis l'hypothèse, que les répresseurs 4E-BP1/2 seraient des régulateurs d'ARNm spécifiques impliqués dans la réponse immunitaire et qui pourraient moduler les fonctions des macrophages. Pour mener notre investigation, nous avons isolé des macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse de souris C57BL/6. Les macrophages sont des cellules immunitaires qui jouent un rôle important dans la première ligne de défense de la réponse immunitaire innée par leur capacité à s'activer et libérer des cytokines conduisant à l'élimination des pathogènes (Hirayama *et al.*, 2017; Murray & Wynn, 2011). En plus, de protéger

l'organisme contre des agents pathogènes, les macrophages sont également impliqués dans la réponse immunitaire adaptative faisant le relais entre la réponse immunitaire innée et adaptative (Gasteiger *et al.*, 2017). Notre choix d'utiliser des macrophages primaires comme modèle d'étude a permis de découvrir dans un contexte de cellules immunitaires naïves le profil des transcrits liés à l'immunité dont le contrôle traductionnel est dépendant des répresseurs 4E-BP1/2. De plus, les facteurs traductionnels sont très sensibles aux variations métaboliques cellulaires liées au stress, au vieillissement cellulaire (lors de passage multiples) qui vont altérer l'activité traductionnelle des cellules et qui dans ces conditions pourrait avoir un impact important sur le profil des transcrits (Gonskikh & Polacek, 2017; Liu & Qian, 2014). Nous avons utilisé la technique d'analyse des profils de polysomes pour fractionner et séparer les ARNm hautement traduits, puis identifié les ARNm dont l'expression était régulée à la hausse par des essais nCounter. Cette nouvelle technologie est largement utilisée dans l'identification de cibles thérapeutiques (Beard *et al.*, 2013). A travers un panel d'immunologie de 564 gènes incluant à la fois des cibles immunologiques et inflammatoires, nous avons détecté 11 transcrits traductionnellement régulés par les répresseurs 4E-BP1/2 (*Il-1a*, *Il-1b*, *Il-10*, *Il-12b*, *Ccl5*, *Ccl12*, *Cd40*, *Cxcl10*, *Cox-2*, *Ifit2* et *Mx1*). Ce nombre de transcrits bien que peu abondants, confirme les données rapportées par des études du translatome dans les macrophages (Schott *et al.*, 2014) et dans les cellules et souris déficientes en 4E-BP1/2 (Colina *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009c). Ces auteurs ont décrit un mécanisme de traduction répressif et sélectif par 4E-BP1/2. Nos résultats concordent avec ces données et prouvent que 4E-BP1/2 ne sont pas des régulateurs généraux de la traduction mais qu'ils contrôlent de façon spécifique la traduction de certains ARNm et dans des conditions bien précises (Alain *et al.*, 2012b; Dowling *et al.*, 2010). Il est important de souligner ici que nous avons utilisé des macrophages primaires naïfs sans aucun stimulus, les transcrits régulés reflètent donc une expression basale dans les macrophages. La plupart des études précédentes ont décrit les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2 comme étant seulement des régulateurs de la réponse immunitaire pro-inflammatoire (Colina *et al.*, 2008; Herdy *et al.*, 2012b; Jaramillo *et al.*, 2011; Nehdi *et al.*, 2014). Nos résultats renforcent ces données sur le rôle de régulateur négatif de la réponse pro-inflammatoire des 4E-BP1/2 et en plus complètent ces découvertes en révélant le rôle des 4E-BP1/2 dans la régulation de la réponse anti-inflammatoire. Ces données s'intègrent parfaitement à l'ensemble des connaissances littéraires impliquant les protéines 4E-BP1/2 dans l'efficacité traductionnelle d'ARNm spécifiques dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Le mécanisme de régulation des systèmes biologiques est une question fondamentale en science. Le rôle central de mTOR dans ces processus a été attribué largement à ses effecteurs 4E-BP1 et 4E-

BP2. mTOR régule l'activité des 4E-BPs impliqués dans l'assemblage du complexe eIF4F, notamment la phosphorylation et l'inactivation des protéines 4E-BPs (Hay & Sonenberg, 2004; Masvidal *et al.*, 2017a). Selon leur structure, les protéines 4E-BP1/2 possèdent des motifs de liaison (TOS et RAIP) à mTORC1 via la protéine adaptatrice Raptor (Musa *et al.*, 2016; Showkat *et al.*, 2014) et en plus une liaison spécifique à eIF4E les permettant d'interagir et de contrôler l'activité de celle-ci à travers la formation du complexe protéique eIF4F parmi lesquels la protéine eIF4G est un compétiteur des 4E-BP1/2 puisqu'elle convoite le même site de liaison que les 4E-BP1/2 sur eIF4E (Gruner *et al.*, 2016). Cependant, 4E-BP1/2 présentent une plus grande affinité pour eIF4E, ce potentiel supplémentaire non négligeable les avantage par rapport à eIF4G (Scheper *et al.*, 2002). Ce challenge dans lequel se placent les protéines 4E-BP1/2 ne peut que contribuer et renforcer leur spécificité d'action dans la régulation traductionnelle de la synthèse des protéines. Ceci appuie les données montrant que 4E-BP1/2 ne peuvent pas être des régulateurs de la traduction générale (Larsson *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2017a) mais manifestent clairement une spécificité d'action. Il a été décrit que cette spécificité des 4E-BP1/2 serait médiée par la complexité structurale des extrémités 5' UTR des ARNm qui impose et rythme la cadence de leur traduction (Gandin *et al.*, 2016). Dans cette situation, l'axe mTORC1-4E-BP1/2 se trouve être un chef d'orchestre qui dirige une synthèse protéique ciblée et efficace dépendante d'eIF4E. Cette régulation privilégie la traduction coiffe-dépendante et de ce fait, des ARNm sensibles à eIF4E. Cependant, des recherches récentes ont montré que certains ARNm sont plus sensibles au niveau d'eIF4E ainsi qu'à sa disponibilité (Gandin *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2015; Roux & Topisirovic, 2012). Ces découvertes révèlent une régulation dynamique et sophistiquée de la traduction.

Dans cette complexité de l'initiation de la traduction se mélangent des complexes variables démontrant un système de régulation stricte. Deux types d'ARNm ont été décrits : les ARNm TOPs constitués d'une extrémité 5' TOP oligopyrimidine et les ARNm non-TOPs (Philippe *et al.*, 2018). Pendant un temps, la régulation des ARNm TOPs a été attribuée aux 4E-BP1/2 (Thoreen *et al.*, 2012) mais très rapidement ces données se sont révélées inexactes. Les ARNm non-TOPs incluent une grande proportion de transcrits dont la traduction est dépendante des changements dans l'activité des 4E-BP1/2 et/ou des niveaux d'eIF4E (De Benedetti & Graff, 2004; Graff *et al.*, 2008). En effet, les changements dans les niveaux des 4E-BP1/2 et/ou dans leur phosphorylation altèrent considérablement la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm (*Irf7*, *Gas2*, *Ccnd3*, *Odc1* et *Vegfa*) mais sans effet majeur sur la synthèse protéique globale (Colina *et al.*, 2008; Dowling *et al.*, 2010). L'activité traductionnelle de ces ARNm était affectée par les

variations dans le niveau et la disponibilité d'eIF4E mais aussi par la structure de l'extrémité 5' (Masvidal *et al.*, 2017a; Morita *et al.*, 2015). L'ensemble de ces facteurs affectant les acteurs de l'initiation de la traduction témoigne de la spécificité de cette voie. Ces caractéristiques définissent deux groupes d'ARNm, un groupe dont l'extrémité 5' UTR est longue et hautement structurée, un autre groupe d'ARNm avec une extrémité 5' UTR plus courte (Gandin *et al.*, 2016). Ces ARNm sont sensibles à eIF4E et codent pour des protéines avec des fonctions différentes (Gandin *et al.*, 2016). Les ARNm possédant un long 5' UTR nécessitent une activité hélicase d'eIF4A bien plus importante pour défaire les structures 5' de l'ARNm, cette particularité leur confère une certaine dépendance d'eIF4A et sont dits sensibles à eIF4A (Masvidal *et al.*, 2017a; Morita *et al.*, 2015). Ces découvertes sont très importantes pour définir le rôle des 4E-BP1/2 dans le contrôle traductionnel des ARNm. En tant qu'effecteurs de mTOR, les 4E-BP1/2 répriment la traduction en restant liées à eIF4E ; pourtant leur répression s'exerce sur un sous-ensemble d'ARNm ce qui suggère qu'elles agissent dans des conditions bien précises et sur des fonctions biologiques en particulier. L'étude de Colina *et al.* décrit que 4E-BP1/2 contrôle la traduction du facteur de transcription IRF7 dont la structure 5' UTR est longue et hautement structurée (Colina *et al.*, 2008; Herdy *et al.*, 2012b; Jaramillo *et al.*, 2011; Nehdi *et al.*, 2014). Cette régulation a pour conséquence l'accumulation d'IFN-I provoquant une résistance des MEFs à certaines infections virales. Ces données révèlent le rôle des 4E-BP1/2 dans la réponse immunitaire innée. En ligne avec ces résultats, notre analyse bioinformatique des séquences 5' UTR des transcrits identifiés a montré deux groupes distincts présentant des structures 5'UTR différentes (Figure 1D, article 1). Dans notre modèle, 4E-BP1/2 régulent les transcrits (*Cox-2*, *Ifit2*, *Il-1b* et *Mx-1*) qui contiennent un long 5' UTR. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer si l'activité traductionnelle de ces transcrits est altérée par des changements dans le niveau d'eIF4E. Etant donné, qu'eIF4E contrôle la synthèse des protéines coiffe-dépendante, elle contribue à la traduction sélective d'ARNm impliqués dans la croissance cellulaire, l'angiogénèse, la survie et le cancer (De Benedetti & Graff, 2004; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Nous démontrons dans cette étude, une nouvelle contribution d'eIF4E dans la réponse immunitaire. Cette dernière devrait être approfondie par une surexpression ou une inhibition du niveau d'eIF4E pour valider si les cibles que nous avons identifiées sont sensibles à eIF4E. L'utilisation de macrophages primaires isolés de souris déficientes pour *Eif4e* (Truitt *et al.*, 2015) ou des souris chez lesquelles la surexpression de gènes *Myc* augmente l'expression d'eIF4E, nous permettraient d'identifier par RT-qPCR si nos cibles sont sensibles aux variations d'eIF4E et également dépendants de l'activité d'eIF4A dans les macrophages primaires (Sonenberg, 2008; Svitkin *et al.*, 2001). L'efficacité de déroulement

des structures 5' UTR par eIF4A est strictement dépendant du complexe eIF4F (Garcia-Garcia *et al.*, 2015). De nombreux ARNm non-TOP sont sensibles à mTORC1 (Gandin *et al.*, 2016). Parmi ces ARNm non-TOP, un autre sous-ensemble de transcrits « sensibles à eIF4E » possède un court 5' UTR inférieur à 30 nucléotides et identifiés comme étant régulés traductionnellement à travers la voie mTORC1-4E-BP1/2-eIF4E (Gandin *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2015). La plupart de ces ARNm code pour des protéines impliquées dans les fonctions mitochondriales, ils sont dits « insensibles à eIF4A » et inclut des composants de la chaîne respiratoire (*ATP50*, *ATP5D*, *UQC2* et *NUDF6*) (Gandin *et al.*, 2016). Ces transcrits sont constitués d'un élément TISU et leur traduction est fortement affectée par les altérations d'eIF4E mais pas d'eIF4A (Elfakess *et al.*, 2011; Gandin *et al.*, 2016). Par contre, les mécanismes qui guident la traduction des ARNm contenant un élément TISU ne sont pas encore bien compris mais impliquent une interaction entre eIF4G1 et eIF1 dont le rôle est de faciliter par la dissociation d'eIF4E à la coiffe 5' de l'ARNm (Sinvani *et al.*, 2015).

Dans notre étude, nous avons également identifié un autre groupe d'ARNm non-TOP dont la traduction est dépendante d'eIF4E. Les transcrits (*Il1a*, *Il1b*, *Il10*, *Il12b*, *Ccl5*, *Ccl12*, *Cd40* et *Cxcl10*) possèdent un 5' UTR court supérieur à 30 nucléotides, sauf pour celui d'*Il1a* qui est inférieur à 30 nucléotides. Cependant, aucun d'entre eux ne possèdent un élément TISU. Ces ARNm ne semblent pas contenir les critères indispensables des ARNm sensibles à eIF4E. Ces données mettent en lumière un groupe d'ARNm non-TOP régulé par 4E-BP1/2 dont les mécanismes structuraux sont encore à explorer. Cette régulation sélective que nous et d'autres (Colina *et al.*, 2008; Dowling *et al.*, 2010; Gandin *et al.*, 2016) observons, montre que mTORC1 peut contrôler indépendamment chaque composant du complexe eIF4F. L'ensemble de ces données suggère que l'effet de mTORC1 sur le translatome peut être influencé par de nombreux facteurs comme la stochiométrie des composants du complexe eIF4F et également, la nature du stimulus et le type cellulaire. Bien que mTORC1 agit sur eIF4A et eIF4G, ces dernières modulent aussi des transcrits qui ne sont pas sensibles à eIF4E (Modelska *et al.*, 2015; Ramirez-Valle *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2014). En plus des composants du complexe eIF4F, mTORC1 phosphoryle aussi d'autres eIFs qui affectent sélectivement la traduction. C'est le cas d'eIF4B qui soutient l'activité hélicase eIF4A mais qui est un substrat de S6Ks, lequel a été décrit pour réguler sélectivement la traduction d'ARNm impliqués dans la survie et la prolifération (*C-myc*, *Xiap*, *Cdc25*, *Odc* et *Bcl-2*) (Csibi *et al.*, 2014; Shahbazian *et al.*, 2010). La majorité des recherches sur le translatome ont été réalisées avec les cellules stimulées contrairement à nos cibles qui proviennent de macrophages non stimulés. Ces résultats

démontrent qu'en l'absence des 4E-BP1/2, les macrophages sont amorcés au préalable pour répondre plus rapidement aux stimuli externes. Ce type d'observation a été souligné dans d'autres cellules immunitaires, les cellules NK (Mao *et al.*, 2016). Notre étude élargie le catalogue des ARNm sensibles à mTOR et démontre que plus d'études sont encore nécessaires pour identifier d'autres cibles ainsi que les mécanismes altérant le translatome par mTOR. Une alternative capable d'améliorer les connaissances sur les mécanismes qui régulent les ARNm liés à la réponse immunitaire dans les macrophages est l'application de la technologie de NanoCAGE. Cette technologie nous permettrait d'identifier les structures des extrémités 5' UTR de nos transcrits. En utilisant nos échantillons d'ARNs provenant de l'analyse des profils de polysomes, les fractions « intermediate-heavy » à « light » polysomales seront sélectionnées pour le nanoCAGE. Ils seront soumis au préalable, à la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) par RTqPCR et ensuite au séquençage des 5' UTR (Gandin *et al.*, 2016). Cette exploration pourrait indiquer que d'autres caractéristiques 5' UTR au-delà des motifs 5' TOP doivent rendre la traduction de l'ARNm sensible à mTOR.

Bien que notre étude ciblait principalement la régulation traductionnelle à l'extrémité 5' UTR dépendante des 4E-BP1/2, cependant, il existe de nombreux éléments régulateurs de l'ARNm aux extrémités 5' et 3' UTR qui ont un impact majeur sur le devenir de l'ARNm. Selon les observations de Jack D. Keene, les procaryotes sont capables de réagir rapidement et efficacement à divers signaux grâce à l'organisation de leurs gènes impliqués dans une même voie sous forme d'opérons d'ADN. Cet arrangement facilite la coordination de l'expression des gènes qui génère des transcrits polycistroniques. Ces transcrits sont traduits simultanément permettant ainsi la synthèse coordonnée de protéines (Keene, 2007). Contrairement, chez les eucaryotes, les opérons d'ADN sont rares et la coordination de l'expression des gènes impliquerait une activation et une répression sur plusieurs sites promoteurs de la transcription (Ben-Shahar *et al.*, 2007). Basé sur ces observations, Jack D. Keene a émit l'hypothèse selon laquelle les RNPs pourraient être des opérons post-transcriptionnels ou des régulateurs d'ARN. Les ARNm codent pour des protéines impliquées dans des processus biologiques identiques, ou partagent les mêmes sites de localisation cellulaire et leur régulation est coordonnée par des facteurs agissant en *trans*. Ces facteurs correspondent à des protéines de liaison à l'ARNm, RBPs et peuvent être associés aux miRNAs. Ils peuvent servir d'adaptateurs pour recruter des composants de la machinerie cellulaire et ainsi réguler un groupe d'ARNm présent dans un RNP (Keene & Tenenbaum, 2002). Des nombreux résultats soutiennent cette hypothèse et démontrent que plusieurs ARNm sont co-régulés par une ou plusieurs protéines de liaison à

l'ARNm qui guident leur épissage, leur exportation, leur localisation, leur stabilité et leur traduction (Halbeisen *et al.*, 2008). Ces recherches ont donné lieu à un modèle dans lequel les ARNm qui codent pour des protéines ayant des fonctions similaires sont régulés de manière coordonnée au cours de la croissance et de la différenciation cellulaire sous forme de régulons d'ARN par le biais d'un mécanisme induit par les RNPs (Keene & Tenenbaum, 2002; Mansfield & Keene, 2009; Pullmann *et al.*, 2007). Les facteurs en *trans* interagissent avec des éléments régulateurs dans les ARNm appelés « Untranslated Sequence Elements for Regulation » USERS situés en 5' UTR et 3' UTR. Les USERS permettent de coordonner le processus de régulation en déterminant l'association des RNPs et le mode de régulation des ARNm (Culjkovic *et al.*, 2007). Une étude a montré que le facteur d'initiation eIF4E joue un rôle essentiel de régulons d'ARN qui affecte chaque étape de la progression du cycle cellulaire. En particulier, eIF4E favorise de manière coordonnée l'exportation d'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Culjkovic *et al.*, 2006). eIF4E contrôle au niveau cytoplasmique la traduction des ARNm, cependant une fraction nucléaire d'eIF4E serait également impliquée dans le contrôle de l'exportation nucléaire d'ARN spécifiques. Les rôles d'eIF4E dans la traduction et dans l'exportation d'ARNm sont distincts. L'exportation d'ARNm dépendante d'eIF4E est médiée par un élément commun dans l'extrémité 3' UTR, le récepteur d'export CRM1 responsable de l'export nucléocytoplasmique de protéines et d'ARNm (Hutten & Kehlenbach, 2007). Ces études ont décrit qu'eIF4E contrôle un régulon d'ARN en modulant l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Borden, 2016). D'autres mécanismes de régulation de l'ARNm affectent l'expression des gènes. La protéine nucléocytoplasmique 4E-T se lie à eIF4E et permet son importation dans le noyau ; cette interaction 4E-T/eIF4E réprime la traduction. À l'état d'équilibre, 4E-T est localisé dans des corps cytoplasmiques appelés « Processing bodies » (P-bodies) qui sont des sites de dégradation de l'ARNm. De ce fait, eIF4E est également retrouvée dans les P-bodies et pourrait jouer un rôle dans la séquestration et la stabilité des ARNm dans les P-bodies (Ferraiuolo *et al.*, 2005).

Outre eIF4E, un autre facteur de l'initiation de la traduction qui exerce un contrôle post-transcriptionnel de l'ARN est eIF2 α . Dans les conditions de stress (privation de nutriments, radiation, stress oxydatif, infections) pouvant conduire à des lésions ou la mort cellulaire (Holcik & Sonenberg, 2005), eIF2 α phosphorylée, inhibe l'initiation de la traduction en bloquant la formation du complexe ternaire (eIF2 α /GTP/Met-tRNA_i) (Harding *et al.*, 2000). Cette régulation par eIF2 α pourrait jouer un rôle fondamental dans la régulation traductionnelle des transcrits qui sont sensibles aux divers facteurs intervenants au cours des manipulations expérimentales, *in*

vitro, imposées par la différenciation et la culture des macrophages. Cette régulation serait à prendre en considération pour expliquer la quantité de cibles identifiées dans notre modèle. L'arrêt global de la traduction par exemple lors d'un stress conduit à l'accumulation d'ARNm dans les granules de stress (Scheu *et al.*, 2006). Les granules de stress sont des corps cytoplasmiques contenant des facteurs d'initiation de la traduction, des ARNm, des protéines de liaison à l'ARN telle que TIA-1 et d'autres protéines non lié à l'ARNm (Jain *et al.*, 2016). TIA-1 est une RBP qui module la traduction en se liant aux ARE situés sur les 3' UTR de ses ARNm cibles. TIA-1 est majoritairement localisée dans les granules de stress. La régulation de la stabilité des ARNm par les AREs joue un rôle important dans l'expression des gènes. Les ARNm stockés dans les granules de stress sont traduits ultérieurement en fonction des besoins cellulaires. Les ARNm sont aussi stockés dans les P-bodies. Les P-bodies contiennent des ARNm associés à des répresseurs de la traduction et aux mécanismes de dégradation de l'ARNm. Ces ARNm peuvent être ciblés pour être dégradés (Aizer *et al.*, 2014). Ces deux structures cytoplasmiques représentent un mode de régulation post-transcriptionnel des transcrits contribuant à l'homéostasie cellulaire.

Un autre exemple de régulateur négatif de la traduction est le complexe GAIT. Il inhibe la traduction de la céruloplasmine, une protéine de la phase aiguë qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme du fer (Vashchenko & MacGillivray, 2013) laquelle possède une activité antioxydante et bactéricide (Klebanoff, 1992). Elle est sécrétée par les monocytes et macrophages activés. La céruloplasmine est induite par l'IFN- γ mais la synthèse de la protéine est interrompue seize heures après l'activation malgré l'abondance d'ARNm de céruloplasmine (Mazumder & Fox, 1999). Ceci est dû à la suppression de la traduction induite par la liaison du complexe GAIT à l'extrémité 3' UTR de la céruloplasmine. Le complexe GAIT régule négativement d'autres cibles et participe ainsi à la résolution de l'inflammation (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

La diversité des mécanismes de régulations post-transcriptionnelles des ARNm permettent d'expliquer et de comprendre que le niveau d'expression traductionnelle dans des cellules naïves peut être limité à certains transcrits. L'ensemble de ces données suggèrent que d'autres mécanismes de régulation post-transcriptionnelle spécifique peuvent affecter le translatome et par conséquent, le protéome.

Parmi les 11 transcrits identifiés, nous avons mis en évidence les transcrits (*Il-10*, *Ptgs2/Cox-2*, *Ccl5* et *Cxcl10*) dont la traduction était plus efficace en absence des 4E-BP1/2

(Figure 1B et 1C article 1, Figure 2B article 2). L'implication des 4E-BP1/2 dans l'inhibition de l'activité traductionnelle d'ARNm spécifiques révèle qu'elles participent à la régulation de plusieurs processus biologiques spécifiques : la prolifération (Dowling *et al.*, 2010), la survie et la réponse immunitaire (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011) en lien avec le maintien de l'homéostasie cellulaire. L'approfondissement de ces connaissances dans notre étude a révélé un rôle particulier des 4E-BP1/2 dans la réponse pro- et anti-inflammatoire induite par les macrophages avec des conséquences sur leur capacité fonctionnelle. De nombreuses études ont rapporté que la voie mTOR module la polarisation M1/M2 des macrophages (Byles *et al.*, 2013; Powell *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014). En fonction du microenvironnement, les macrophages sont capables de modifier leurs propriétés fonctionnelles. Ils vont adopter un phénotype de type M1 pour amorcer une activité microbicide et pro-inflammatoire (Gordon, 2003), un phénotype de type M2a pour répondre à la réparation et cicatrisation tissulaire (Wynn *et al.*, 2013) et un phénotype M2b et M2c pour une réponse anti-inflammatoire (Martinez & Gordon, 2014). Ces propriétés fonctionnelles des macrophages dépendent en partie de la voie mTOR, laquelle est sensible aux variations intra et extracellulaires. L'activation de mTOR va coordonner de façon spécifique, l'activité des macrophages en réponse aux stimuli. Dans notre étude, nous avons utilisé le LPS comme agent immunomodulateur qui induit une réponse inflammatoire et anti-microbienne très forte dans les macrophages (Fang *et al.*, 2004). La liaison du LPS à son récepteur, le TLR4, conduit à l'activation de nombreuses cascades de signalisation cellulaire notamment, les voies mTORC1 (Schaeffer *et al.*, 2011) et MNK1/2 (Herdy *et al.*, 2012b). L'activation des macrophages M1 est caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant des études ont observé que la stimulation des macrophages par le LPS et l'IFN- γ induit une production accrue d'IL-12p35 et d'IL-12p40 qui maintiennent la polarisation M1 des macrophages par l'induction d'IFN- γ par les lymphocytes de type Th1 favorisant ainsi la production d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β) (Mantovani *et al.*, 2004; Mosser & Zhang, 2008). Par contre, l'activation des macrophages par l'IL-4 et l'IL-13 entraîne une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'IL-1 β causée par l'augmentation de l'expression du récepteur antagoniste de l'IL-1, sIL-1Ra. Cette régulation cytokinique est associée à un phénotype M2a correspondant à une faible activité microbicide (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez & Gordon, 2014). L'activation des macrophages par le LPS seul induit à la fois la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1) et anti-inflammatoires (IL-10) (Mantovani *et al.*, 2004). Cette caractéristique des macrophages activés avec le LPS est complètement différente des réponses observées avec les phénotypes M1 et M2a. Ces changements sont dus à la reprogrammation des

macrophages activés qui en présence ou non de complexes immuns augmentent leur production d'IL-10 et diminuent leur production d'IL-12 bloquant ainsi leur polarisation M1 (Sutterwala *et al.*, 1998). Ces macrophages sont associés à un phénotype de type M2b et n'ont pas une activité anti-inflammatoire proprement dite mais sont considérés comme des régulateurs de l'inflammation (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008). Très intéressant, ce phénotype M2b correspond au profil des transcrits pro- et anti-inflammatoires régulés traductionnellement par 4E-BP1/2 que nous avons décrit dans nos études. Nos données révèlent un nouveau mécanisme de régulation de l'inflammation par les macrophages M2b dépendant de la voie mTORC1-4E-BP1/2. Ce contrôle par les répresseurs 4E-BP1/2 nous a conduit à investiguer sur l'impact de la régulation de l'activité traductionnelle des transcrits *Il-10* et *Cox-2* dans la fonction bactéricide des macrophages et dans la migration cellulaire induite par les chimiokines *Ccl5* et *Cxcl10*.

2. EFFETS DES 4E-BP1/2 SUR LES FONCTIONS ANTI-INFLAMMATOIRES DES MACROPHAGES

Les macrophages représentent la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes (Murray & Wynn, 2011). De ce rôle découlent de nombreuses fonctions biologiques qu'ils doivent assumer notamment, la réponse inflammatoire. Une fois activée par le LPS ou par des agents pathogènes, les macrophages vont induire une réponse pro-inflammatoire très forte par la sécrétion de cytokines tel que $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 (Arango Duque & Descoteaux, 2014). Sans aucun contrôle, cette réponse peut être nocive pour l'organisme et avoir des conséquences graves comme le choc septique dans le cas d'une infection bactérienne (Schulte *et al.*, 2013). L'instauration d'un équilibre est indispensable pour contrebalancer la réponse pro-inflammatoire accrue. Pour ramener cet équilibre, les macrophages vont activer une réponse anti-inflammatoire (Zhang & Wang, 2014). La régulation de la réponse anti-inflammatoire dans les macrophages par 4E-BP1/2 n'a pas encore été décrite. Notre travail révèle le rôle des 4E-BP1/2 dans l'homéostasie cellulaire et les mécanismes moléculaires impliqués. L'axe mTORC1-4E-BP1/2 contrôle la traduction de deux principaux facteurs anti-inflammatoires : IL-10 et COX-2.

IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par de nombreuses cellules notamment les macrophages (Sanin *et al.*, 2015). Lors d'une infection, l'IL-10 peut soit bloquer l'élimination des pathogènes, soit améliorer l'immunopathologie : elle est considérée comme un immunorégulateur clé dans la réponse inflammatoire (Couper *et al.*, 2008). La stimulation des macrophages par le LPS induit l'expression d'IL-10 via les voies MAPK (Liu *et al.*, 2006) et mTOR (Ohtani *et al.*, 2008). L'IL-10 exerce un effet anti-inflammatoire à la fois autocrine et paracrine à travers l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire et le facteur de transcription STAT3 (Williams *et al.*, 2004). Cette activation va conduire à la transcription de gènes anti-inflammatoires (Carl *et al.*, 2004; Kuwata *et al.*, 2003). Jusqu'à maintenant, les mécanismes moléculaires par lesquels l'IL-10 régule la réponse inflammatoire n'étaient pas connus au niveau du contrôle traductionnel. Mes travaux de recherche décrivent l'activation traductionnelle de l'expression de l'IL-10 induite par le LPS dans les macrophages à travers l'axe mTORC1-4E-BP1/2. Nous soulignons un point important de la régulation de l'IL-10 modulant ses effets anti-inflammatoires. Nos résultats sont en accord avec études précédentes montrant l'induction de l'expression de l'IL-10 par le LPS à travers la voie mTOR (Jorgensen *et al.*, 2001; Ohtani *et al.*, 2008). En effet, l'expression protéique et ARNm de l'IL-10 étaient significativement augmentées en l'absence de 4E-BP1/2 dans les macrophages stimulés avec

le LPS comparé au WT (Figures 2B et 2D, article 1). Cette induction d'IL-10 a provoqué la dimérisation et la translocation de STAT3 dans le noyau comme indiqué dans l'étude de Carl et collaborateurs (Carl *et al.*, 2004), cependant, celle-ci est plus élevée dans les macrophages 4E-BP1/2 DKO contrairement au WT (Figures 3C et 3D, article 1). Ce qui confirme l'implication de 4E-BP1/2 dans la signalisation IL-10-STAT3 qui est démontrée pour la première fois dans mon étude. De plus, nous prouvons que l'activation transcriptionnelle des gènes anti-inflammatoires (sIL-1Ra, NFIL-3) est en grande partie dépendante de l'axe IL-10-STAT3 par le blocage d'IL-10 et l'inhibition de STAT3 (Figures 4A et 4B, article 1).

Une autre cible anti-inflammatoire sous le contrôle de 4E-BP1/2, qui joue un rôle crucial dans l'inflammation est la COX-2, elle synthétise des médiateurs chimiques (prostaglandines et thromboxanes) impliqués dans le processus inflammatoire (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Tout comme l'IL-10, COX-2 contribue à l'équilibre de la réponse inflammatoire lors d'une infection (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Son induction par le LPS a été décrite ainsi que son activité traductionnelle par mTORC1 mais les mécanismes qui contrôlent cette induction n'ont pas été clairement établies (Mazumder *et al.*, 2010; Schaeffer *et al.*, 2011; Shaheen *et al.*, 2015). L'activation de COX-2 induit la production de PGE₂ qui contribue à la régulation des cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-1, TNF α (Di Mari *et al.*, 2003). Cependant, nous montrons que l'activité dérégulée des 4E-BP1/2 modifie à la baisse la production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 7, article 1). En effet, la PEG₂ active un programme anti-inflammatoire en s'associant à des facteurs de transcription CREB et C/EBP β (Na *et al.*, 2015). Nous confirmons dans notre étude, que l'activation transcriptionnelle de C/EBP β conduit l'expression de gènes anti-inflammatoires (*Arg1*, *SerpinB2*) dans les macrophages 4E-BP1/2 DKO. Ces résultats suggèrent que l'axe mTORC1-4E-BP1/2 contribue à maintenir un équilibre dans la réponse inflammatoire des macrophages en favorisant la traduction d'ARNm spécifiques. La dérégulation de l'IL-10 et COX-2 a déclenché la transcription de gènes anti-inflammatoires et de ce fait a favorisé la survie de la bactérie *E. coli* dans macrophages déficients en 4E-BP1/2.

La réponse inflammatoire induite par les cellules immunitaires dont les macrophages, va permettre de maîtriser rapidement la progression de l'infection par la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Newton & Dixit, 2012). Ces processus ont été largement étudiés cependant, le rôle de 4E-BP1/2 dans la capacité bactéricide des macrophages n'est pas connu. A travers les mécanismes de signalisation cellulaire, les protéines sont synthétisées pour transmettre rapidement les informations moléculaires aux cellules. Ce processus est dirigé en partie par des modifications post-traductionnelles qui comprennent la phosphorylation et

l'ubiquitination des régulateurs de la traduction. L'étude d'Ivanov et Roy illustre comment les macrophages exercent leur capacité bactéricide pour éliminer un pathogène virulent, *Legionella pneumophila* et également les stratégies utilisées par le pathogène via des modifications post-traductionnelles pour détourner ces réponses (Ivanov & Roy, 2013). En effet, les auteurs ont montré que la souche pathogène, contrairement à un mutant non virulent, entraîne l'ubiquitination des régulateurs de mTOR (PI3K et Akt) conduisant à son inactivation, ce qui inhibe l'initiation de la traduction et favorise une réponse cytokinique pro-inflammatoire. Contrairement à leur étude, nous avons utilisé une souche bactérienne *E. coli* non pathogène, MG1655 pour évaluer leur survie dans les macrophages. Nous avons prétraités les macrophages WT et déficients en 4E-BP1/2 avec le LPS puis infecté avec *E. coli*. En plus du LPS certaines cellules ont été prétraitées avec un anti-IL-10 et un inhibiteur de COX-2 pour bloquer pour les voies IL-10-STAT3 et PGE₂-C/EBPβ, respectivement. Cette stratégie nous a permis d'évaluer l'implication de la voie mTORC1-4E-BP1/2 dans la capacité bactéricide des macrophages. En ligne avec l'étude d'Ivanov et Roy, nous avons observé qu'en l'absence de 4E-BP1/2 les macrophages transcrivent moins de *Tnf*, *Il-6* et *Nos2* en réponse au LPS que les cellules sauvages. En comparant l'effet combiné de l'anti-IL-10 et l'inhibiteur de COX-2 dans les macrophages 4E-BP1/2 DKO et WT, nous avons conclu que 4E-BP1/2 régulent la capacité bactéricide des macrophages, au moins en partie, en réprimant la traduction des ARNm de l'*Il-10* et de *Cox-2*. Enfin, nous avons découvert un rôle important de 4E-BP1/2 dans l'homéostasie des macrophages en limitant l'action anti-inflammatoire de la signalisation via IL-10-STAT3 et COX-2-PGE₂-C/EBPβ. Des études complémentaires utilisant des souches bactériennes pathogènes d'intérêt médical telles que *E. coli* entérohémorragiques producteurs de la Shigatoxine (souche EDL 933) et *Salmonella Typhimurium*, permettront de mieux comprendre l'impact des 4E-BP1/2 dans la capacité bactéricide des macrophages.

3. EFFETS DES 4E-BP1/2 SUR LA FONCTION CHIMIOTACTIQUE DES MACROPHAGES

Le contrôle traductionnel constitue un des mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire des macrophages (Mazumder *et al.*, 2010; Schott *et al.*, 2014). A travers notre étude, nous mettons en évidence la régulation traductionnelle sélective des chimiokines pro-inflammatoires CCL5 et CXCL10 par 4E-BP1/2. Les macrophages dépourvus des 4E-BP1/2 présentent une activité traductionnelle accrue des ARNm *Ccl5* et *Cxcl10* dans les macrophages, ceci augmente la synthèse des chimiokines et par conséquent, leur activité chimiotactique envers les cellules T CCR5⁺ et CXCR3⁺.

Les chimiokines CCL5 et CXCL10 sont des puissants chimioattractants induites par les cellules immunitaires (incluant les macrophages) pour activer la migration des cellules T, des neutrophiles aux sites de l'inflammation (Sokol & Luster, 2015). Outre la chimiotaxie, CCL5 et CXCL10 possèdent également d'autres fonctions biologiques pour lesquels elles sont sollicitées telles que la prolifération, la survie, la production de cytokines et l'apoptose (Khalid *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011b; Murooka *et al.*, 2006). La présence des chimiokines aux sites de l'inflammation est indispensable pour une réponse cellulaire rapide aux stress ; CCL5 est l'un des principaux acteurs de ce processus qui parmi les nombreuses chimiokines reste la plus étudiée pour son implication dans la réponse immunitaire (Lv *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2010). Contrairement à CCL5, CXCL10 est moins étudiée, cependant, sa régulation au niveau traductionnelle a été suggérée dans les MEFs (Kaur *et al.*, 2007). En cohérence avec les études précédentes, nos données confirment et démontrent pour la première fois dans un autre type de cellules immunitaires, que l'axe mTORC1-4E-BP1/2 régule la migration cellulaire de façon dépendante de CCL5 et CXCL10. Nos résultats sont basés sur des technologies récentes (nanosting) et une méthode indispensable pour évaluer l'efficacité traductionnelle (analyse de profile de polysome), également une approche génétique et biochimique de validation. Bien que CCL5 ait été montrée comme étant régulée au niveau post-transcriptionnel par d'autres mécanismes comme les microARNs (Perry *et al.*, 2008) et le complexe GAIT (Basu *et al.*, 2014a; Poddar *et al.*, 2016) l'un des principaux mécanismes de son activation est la voie de signalisation mTORC1 activée par la détection des signaux de danger déclenchant un processus de protection pour les cellules. Aucune investigation n'a décrit clairement et avec précision que l'efficacité traductionnelle de CXCL10 dépendait de la voie mTORC1-4E-BP1/2. Notre investigation sur la régulation traductionnelle de CCL5 et CXCL10 apporte des preuves du contrôle traductionnel sélectif par l'axe mTORC1-4E-BP1/2 en mettant à jour ces connaissances

et ouvre une nouvelle voie d'exploration des mécanismes du chimiotactisme pouvant être régulés par cet axe.

Hormis la voie de signalisation mTORC1, le contrôle traductionnel est aussi régulé par la voie MAPK à travers l'activation des MNK1/2, parmi lesquels MNK1 phosphoryle l'unique site de phosphorylation d'eIF4E, la sérine 209 (Chan *et al.*, 2012; Furic *et al.*, 2010; Herdy *et al.*, 2012b; Piccirillo *et al.*, 2014). L'activation des MAPKs par divers stimuli, induit l'expression protéique des chimiokines notamment au niveau de la régulation transcriptionnelle et de la stabilité des ARNm (Valledor *et al.*, 2008). Bien que reporté que les chimiokines CCL5 et CXCL10 soient modulées dans de nombreux processus tumoraux, la phosphorylation d'eIF4E ne semble pas être impliquée dans leur régulation traductionnelle (Robichaud *et al.*, 2018a; Seidel *et al.*, 2016; Zumwalt *et al.*, 2015). En ligne avec ces données, nous démontrons que la phosphorylation d'eIF4E n'affecte pas la production de CCL5 et CXCL10. Néanmoins, il serait souhaitable d'investiguer si les MNK1/2 pourraient contrôler l'activité traductionnelle de ces chimiokines de façon indépendante d'eIF4E. L'utilisation d'une approche génétique de macrophages issus de souris déficientes pour les kinases MNK1/2 orienterait sur leur impact dans la régulation traductionnelle de CCL5 et CXCL10 (Landon *et al.*, 2014).

En dehors de la réponse immunitaire liée à l'infection, les chimiokines CCL5 et CXCL10 régulent le recrutement des cellules inflammatoires dans diverses pathologies comme les maladies auto-immunes (Lee *et al.*, 2017), le diabète (Sarkar *et al.*, 2012) et de nombreux cancers (Aldinucci & Colombatti, 2014; Zhou *et al.*, 2016a; Zumwalt *et al.*, 2015). Cette activation de CCL5 et CXCL10 contribue à la progression des maladies et, dans le cas de cancers, favorise les métastases par des mécanismes impliquant les métalloprotéases « Matrix Metalloproteinases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) » (Ding *et al.*, 2016a; Murooka *et al.*, 2008). MMP-2 et MMP-9 appartiennent à la famille des MMPs dont l'activité est impliquée dans la protéolyse de la matrice extracellulaire, la régulation de la migration et l'adhésion cellulaire, le traitement des facteurs de croissance et la libération des facteurs angiogéniques (Bauvois, 2012). L'induction de MMP-2 et MMP-9 par CCL5 et CXCL10 contribue à la migration cellulaire (Ding *et al.*, 2016a; Murooka *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2016a). Cependant, l'implication de la voie mTORC1-4E-BP1/2 dans la régulation de MMP-2 et MMP-9 n'est pas connue. Dans mon étude, il serait très intéressant d'explorer le rôle des 4E-BP1/2 dans la régulation des MMP-2/9 par la technique de zymographie en gélatine qui consiste à faire migrer dans un gel d'acrylamide les lysats cellulaires contenant les protéines d'intérêt. Cette approche expérimentale permettrait

d'évaluer l'activité enzymatique de la forme lente et de la forme active des gélatinases MMP-2/9 dans les macrophages 4E-BP1/2 DKO.

Parmi les autres perspectives, il serait très intéressant d'explorer l'impact de la régulation des autres cibles des 4E-BP1/2 sur les fonctions des macrophages. Entre autres, les transcrits *Ifit2* et *Mx1* pourrait compléter les études précédentes affichant une régulation traductionnelle du facteur de transcription IRF7 par 4E-BP1/2, lequel contrôle la production d'IFN-I et confère aux MEFs une résistance antivirale (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011; Nehdi *et al.*, 2014). L'IFN-I est une protéine sécrétée par les cellules en réponse à différents pathogènes (virus, bactérie, parasites, champignons) pour déclencher les défenses du système immunitaire contre l'infection. La sécrétion d'IFN-I va induire via les récepteurs de l'interféron, IFNAR, l'expression des « IFN stimulated genes (ISGs) » parmi lesquels on retrouve *Ifit2* et *Mx1* (Schoggins & Rice, 2011). « IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2) » appartient à une famille de protéines caractérisées par des motifs répétés de tetratricopeptide qui activent une variété d'interactions protéiques impliquées dans l'initiation de la traduction, la réplication virale, la signalisation d'ARN double brin, la migration cellulaire et la prolifération (D'Andrea & Regan, 2003). Une des principales fonctions d'IFIT2 est de réduire la réplication virale. IFIT2 est impliquée dans un programme antiviral non spécifique par une interaction directe avec eIF3, lequel supprime plus de 60% de la traduction dans les cellules et les virus durant la synthèse protéique (Hui *et al.*, 2005). « Myxovirus resistance protein 1 (Mx1) » a été découverte dans une lignée de souris résistante au virus grippaux de type A. Elle appartient à une superfamille de grandes GTPases, elle est induite par les IFNs et inhibe une grande variété de virus en bloquant les étapes précoces de leur cycle de réplication ainsi que leur transcription (Verhelst *et al.*, 2013).

Pour évaluer l'impact des 4E-BP1/2 dans les fonctions antivirales des macrophages via IFIT2 ou Mx1, deux approches expérimentales pourraient être développées ici. Dans une approche biochimique, *in vitro*, les macrophages WT et déficients en 4E-BP1/2 seraient stimulés avec un ARN double brin synthétique, le Poly(I:C). Les macrophages déclenchent une réponse pro-inflammatoire importante en réponse aux ARN viraux qui devrait induire la production d'IFN-I qui va augmenter l'expression des ISGs dont IFIT2 et Mx1. L'efficacité traductionnelle des ARNm *Ifit2* et *Mx1* serait explorée par « Polysome profiling » et RT-qPCR. Leur expression protéique serait analysée par immunoblot (IFIT2, Mx1) mais également la sécrétion dans le surnageant de culture par ELISA (IFN α , IFN β). Pour vérifier l'effet 4E-BP1/2 sur la fonction

antivirale des macrophages via la répression traductionnelle de *Ifit2* et *Mx1*, les cellules WT et déficients en 4E-BP1/2 seront prétraités séparément avec un ARN interférent « RNA interférence (RNAi) » pour inhiber l'expression de *Ifit2* et *Mx1*, puis infectées avec le VSV. Les cellules seront colorées au crystal violet pour évaluer leur mortalité et la résistance au VSV.

Dans une autre approche, *in vitro*, les macrophages WT et déficients en 4E-BP1/2 seraient traités préalablement au Poly(I:C). L'activité antivirale serait évaluée dans le surnageant de culture des macrophages sur des fibroblastes murins MEFs infectés par le VSV. A travers cette expérience, nous allons pouvoir vérifier si la capacité antivirale des macrophages est contrôlée par 4E-BP1/2 via l'activation traductionnelle d'*Ifit2* et *Mx1*. Ces études pourront compléter et approfondir les données des études précédentes (Colina *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2011; Nehdi *et al.*, 2014) démontrant que la résistance des cellules aux virus serait probablement due, en partie, à l'augmentation de la traduction d'*Ifit2* et *Mx1* qui inhibent la réplication virale.

Un manque dans notre étude est l'impact du répresseur 4E-BP3 dans le contrôle traductionnel des transcrits liés à l'immunité dans les macrophages. Bien que 4E-BP3 soit moins investiguée, une étude récente a rapporté que la transcription de 4E-BP3 était augmentée suite à l'inhibition de mTOR. Il s'en suit une activation traductionnelle de transcrits impliqués dans la progression du cancer (Tsukumo *et al.*, 2016a). Il serait intéressant d'évaluer si 4E-BP3 est impliquée dans d'autres processus biologiques notamment, la réponse immunitaire. Les gènes 4E-BP1/2 ne semblent pas être soumis à une activité transcriptionnelle en l'absence de leur inactivation par mTOR. De plus, le manque du motif RAIP dans la structure de 4E-BP3 et son induction lors de la déphosphorylation des 4E-BP1/2 (ils restent donc constitutivement actifs) pourrait lui assurer un rôle de contrôleur des répresseurs 4E-BPs qui vient pallier à la défaillance des 4E-BP1/2. Ainsi, 4E-BP3 assurerait une répression sélective dans le contrôle de la traduction des ARNm dépendants d'eIF4E (Chen *et al.*, 2012; Tsukumo *et al.*, 2016a). Dans notre modèle, il serait important de vérifier si 4E-BP3 ne prend pas le relais en absence des 4E-BP1/2. Serait-elle plus induite chez les souris déficientes en 4E-BP1/2 ? Aussi, l'utilisation de macrophages extraits de souris déficientes pour *Eif4e-bp1-2-3*, pourrait confirmer nos données.

Dans le cadre de mon projet de recherche, nous nous sommes limités à la stimulation des macrophages par le LPS, néanmoins, l'utilisation de différents agents immunomodulateurs pourrait apporter des informations supplémentaires à savoir si la régulation traductionnelle de

Il-10, *Cox-2*, *Ccl5* et *Cxcl10*, et d'autres cibles potentielles dans les macrophages via 4E-BP1/2 serait liée aux types de stimuli. Aussi, la confirmation de ces résultats avec d'autres types de cellules immunitaires renforcerait le rôle des 4E-BP1/2 dans la régulation traductionnelle des transcrits liés à la réponse immunitaire (cellules dendritiques, natural killer, lymphocytes, neutrophiles). Finalement, l'utilisation de la technologie de « RNA-seq » pour analyser le transcriptome entier des macrophages en réponse au LPS permettrait de compléter le répertoire des ARNm régulés traductionnellement par l'axe mTORC1-4E-BP1/2.

CHAPITRE VI.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de nos données révèle que les répresseurs traductionnels 4E-BP1/2 coordonnent des programmes traductionnels et transcriptionnels lesquels restreints la réponse anti-inflammatoire et la capacité chimiotactique des macrophages. 4E-BP1/2 contribuent à instaurer un équilibre indispensable pour contrebalancer les réponses pro- et anti-inflammatoires, en contrôlant la traduction des transcrits *Ccl5*, *Cxcl10*, *Il-10* et *Cox-2*.

La traduction dérégulée des transcrits *Il-10* et *Cox-2* dans les macrophages déficients en 4E-BP1/2 stimulés avec le LPS déclenchent un programme anti-inflammatoire qui diminue leur capacité bactéricide. Ce programme active la transcription de gènes anti-inflammatoires qui stimule les voies signalétiques IL-10-STAT3 et COX-2-PGE2-C/EBP β . Cette première étude met en évidence l'implication des 4E-BP1/2 dans la réponse anti-inflammatoire.

De plus, la délétion génétique des 4E-BP1/2 dans les macrophages stimulés ou pas avec le LPS conduit à une dérégulation traductionnelle des transcrits *Ccl5* et *Cxcl10*, qui a pour conséquence une augmentation de la synthèse protéique de CCL5 et CXCL10, favorisant la chimiotaxie des cellules T. En définitive, 4E-BP1/2 participent activement à la résolution des réponses inflammatoires dans les macrophages en modulant l'activité traductionnelle accrue des chimiokines CCL5 et CXCL10, responsables de l'infiltration des cellules T dans les tissus endommagés.

Nos données suggèrent que dans les conditions pathologiques, telles que les infections et les cancers, la dérégulation de l'activité des 4E-BP1/2 pourrait modifier l'état traductionnel et par conséquent l'activité transcriptionnelle des macrophages, et ainsi contribuer au développement des maladies. Notre étude indique que 4E-BP1/2 participent dans le maintien l'homéostasie des macrophages en limitant les réponses pro- et anti-inflammatoires. Par conséquent, l'axe mTORC1-4E-BP1/2 pourrait constituer une cible thérapeutique pertinente dans les infections où cette voie est dérégulée dans les macrophages et également, dans les cancers présentant des rapports eIF4E/4E-BP altérés ou une phosphorylation élevée des 4E-BP1/2 dans les « tumor-associated macrophages (TAMs) ». À cet égard, l'analyse approfondie du translatome des macrophages provenant de patients atteints de différentes maladies par le séquençage à haut débit pourrait fournir les données sur l'ensemble des ARNm régulés traductionnellement à travers 4E-BP1/2.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham RT (2016) 4E-BP2 hardwires lymphocytes for rapamycin sensitivity. *Science signaling* 9(430):fs10.
- Afroz T, Skrisovska L, Belloc E, Guillen-Boixet J, Mendez R & Allain FH (2014) A fly trap mechanism provides sequence-specific RNA recognition by CPEB proteins. *Genes Dev.* 28(13):1498-1514.
- Agard M, Asakrah S & Morici LA (2013) PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Front Cell Infect Microbiol* 3:45.
- Aizer A, Kalo A, Kafri P, Shraga A, Ben-Yishay R, Jacob A, Kinor N & Shav-Tal Y (2014) Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *J. Cell Sci.* 127(Pt 20):4443-4456.
- Alain T, Morita M, Fonseca BD, Yanagiya A, Siddiqui N, Bhat M, Zammit D, Marcus V, Metrakos P, Voyer L-A, Gandin V, Liu Y, Topisirovic I & Sonenberg N (2012a) eIF4E/4E-BP Ratio Predicts the Efficacy of mTOR Targeted Therapies. *Cancer Research* 72(24):6468-6476.
- Albina JE, Mahoney EJ, Daley JM, Wesche DE, Morris SM, Jr. & Reichner JS (2005) Macrophage arginase regulation by CCAAT/enhancer-binding protein beta. *Shock* 23(2):168-172.
- Aldinucci D & Colombatti A (2014) The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm.* 2014:292376.
- Algire MA, Maag D & Lorsch JR (2005) Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol. Cell* 20(2):251-262.
- Ali SM & Sabatini DM (2005) Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J. Biol. Chem.* 280(20):19445-19448.
- Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL & Pestova TV (2006) In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125(6):1125-1136.
- Altara R, Mallat Z, Booz GW & Zouein FA (2016) The CXCL10/CXCR3 Axis and Cardiac Inflammation: Implications for Immunotherapy to Treat Infectious and Noninfectious Diseases of the Heart. *Journal of immunology research* 2016:12.
- Anderson P (2010) Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10(1):24-35.
- Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C & Fallahi P (2014) Chemokine (C,ÄiX,ÄiC motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 13(3):272-280.
- Aoki K, Adachi S, Homoto M, Kusano H, Koike K & Natsume T (2013) LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS Lett.* 587(14):2173-2178.
- Appay V & Rowland-Jones SL (2001) RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology* 22(2):83-87.

- Arango Duque G & Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5:491.
- Auweter SD, Oberstrass FC & Allain FH (2006) Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res.* 34(17):4943-4959.
- Avni D, Biberman Y & Meyuhas O (1997) The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 25(5):995-1001.
- Azar R, Alard A, Susini C, Bousquet C & Pyronnet S (2009) 4E-BP1 is a target of Smad4 essential for TGFbeta-mediated inhibition of cell proliferation. *EMBO J.* 28(22):3514-3522.
- Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T & Matsuguchi T (2012) LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages. *FEBS Lett.* 586(10):1540-1546.
- Banko JL, Merhav M, Stern E, Sonenberg N, Rosenblum K & Klann E (2007) Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87(2):248-256.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215-233.
- Basu A, Poddar D, Robinet P, Smith JD, Febbraio M, Baldwin WM, 3rd & Mazumder B (2014a) Ribosomal protein L13a deficiency in macrophages promotes atherosclerosis by limiting translation control-dependent retardation of inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34(3):533-542.
- Bauvois B (2012) New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1825(1):29-36.
- Beard RE, Abate-Daga D, Rosati SF, Zheng Z, Wunderlich JR, Rosenberg SA & Morgan RA (2013) Gene expression profiling using nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 19(18):4941-4950.
- Ben-Shahar Y, Nannapaneni K, Casavant TL, Scheetz TE & Welsh MJ (2007) Eukaryotic operon-like transcription of functionally related genes in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(1):222-227.
- Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN & Sonenberg N (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 15(3):658-664.
- Beretta L, Singer NG, Hinderer R, Gingras AC, Richardson B, Hanash SM & Sonenberg N (1998) Differential regulation of translation and eIF4E phosphorylation during human thymocyte maturation. *J. Immunol.* 160(7):3269-3273.
- Bernstein P, Peltz SW & Ross J (1989) The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 9(2):659-670.
- Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J & Topisirovic I (2015) Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14(4):261-278.

Bhat M, Yanagiya A, Graber T, Razumilava N, Bronk S, Zammit D, Zhao Y, Zakaria C, Metrakos P, Pollak M, Sonenberg N, Gores G, Jaramillo M, Morita M & Alain T (2017) Metformin requires 4E-BPs to induce apoptosis and repress translation of Mcl-1 in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* 8(31):50542-50556.

Bi X & Goss DJ (2000) Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J. Biol. Chem.* 275(23):17740-17746.

Bjur E, Larsson O, Yurchenko E, Zheng L, Gandin V, Topisirovic I, Li S, Wagner CR, Sonenberg N & Piccirillo CA (2013) Distinct translational control in CD4⁺ T cell subsets. *PLoS Genet.* 9(5):e1003494.

Bogdan C, Mattner J & Schleicher U (2004) The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* 202:33-48.

Borden KL (2016) The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a "cap" for many occasions. *Translation (Austin)* 4(2):e1220899.

Bousquet-Antonelli C & Deragon JM (2009) A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* 15(5):750-764.

Braunstein S, Badura ML, Xi Q, Formenti SC & Schneider RJ (2009) Regulation of protein synthesis by ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.* 29(21):5645-5656.

Braunstein S, Karpisheva K, Pola C, Goldberg J, Hochman T, Yee H, Cangiarella J, Arju R, Formenti SC & Schneider RJ (2007) A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol. Cell* 28(3):501-512.

Brown J, Wang H, Suttles J, Graves DT & Martin M (2011) Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) negatively regulates Toll-like receptor 4-mediated inflammatory response via FoxO1. *J. Biol. Chem.* 286(52):44295-44305.

Buchkovich NJ, Yu Y, Zampieri CA & Alwine JC (2008) The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(4):266-275.

Buxade M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, Bain J, Espel E & Proud CG (2005) The Mnk3 are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 23(2):177-189.

Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD & Horng T (2013) The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nature communications* 4:2834.

Calero G, Wilson KF, Ly T, Rios-Steiner JL, Clardy JC & Cerione RA (2002) Structural basis of m⁷GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nat. Struct. Biol.* 9(12):912-917.

Cao R, Robinson B, Xu H, Gkogkas C, Khoutorsky A, Alain T, Yanagiya A, Nevarko T, Liu AC, Amir S & Sonenberg N (2013) Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling. *Neuron* 79(4):712-724.

Carl VS, Gautam JK, Comeau LD & Smith MF, Jr. (2004) Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression. *J Leukoc Biol* 76(3):735-742.

- Carpenter S, Aiello D, Atianand MK, Ricci EP, Gandhi P, Hall LL, Byron M, Monks B, Henry-Bezy M, Lawrence JB, O'Neill LAJ, Moore MJ, Caffrey DR & Fitzgerald KA (2013) A Long Noncoding RNA Mediates Both Activation and Repression of Immune Response Genes. *Science* 341(6147):789-792.
- Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P & Roux PP (2008) Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr. Biol.* 18(17):1269-1277.
- Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM, Krijgsveld J & Hentze MW (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 149(6):1393-1406.
- Castello A, Fischer B, Frese CK, Horos R, Alleaume AM, Foehr S, Curk T, Krijgsveld J & Hentze MW (2016) Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol. Cell* 63(4):696-710.
- Chaby R (2004) Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(14):1697-1713.
- Chan CS, Ming-Lum A, Golds GB, Lee SJ, Anderson RJ & Mui AL (2012) Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha translation through a SHIP1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 287(45):38020-38027.
- Chen CC, Lee JC & Chang MC (2012) 4E-BP3 regulates eIF4E-mediated nuclear mRNA export and interacts with replication protein A2. *FEBS Lett.* 586(16):2260-2266.
- Chen WW, Chan DC, Donald C, Lilly MB & Kraft AS (2005) Pim family kinases enhance tumor growth of prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 3(8):443-451.
- Chew GL, Pauli A & Schier AF (2016) Conservation of uORF repressiveness and sequence features in mouse, human and zebrafish. *Nature communications* 7:11663.
- Chiu SY, Lejeune F, Ranganathan AC & Maquat LE (2004) The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* 18(7):745-754.
- Choe J, Oh N, Park S, Lee YK, Song OK, Locker N, Chi SG & Kim YK (2012) Translation initiation on mRNAs bound by nuclear cap-binding protein complex CBP80/20 requires interaction between CBP80/20-dependent translation initiation factor and eukaryotic translation initiation factor 3g. *J. Biol. Chem.* 287(22):18500-18509.
- Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP & Blenis J (2008) Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(45):17414-17419.
- Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, Jaramillo M, Tai LH, Breitbach CJ, Martineau Y, Larsson O, Rong L, Svitkin YV, Makrigiannis AP, Bell JC & Sonenberg N (2008) Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* 452(7185):323-328.
- Connor JH & Lyles DS (2002) Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J. Virol.* 76(20):10177-10187.

- Cottrell KA, Chaudhari HG, Cohen BA & Djuranovic S (2018) PTRE-seq reveals mechanism and interactions of RNA binding proteins and miRNAs. *Nature communications* 9(1):301.
- Couper KN, Blount DG & Riley EM (2008) IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* 180(9):5771-5777.
- Covarrubias AJ, Aksoylar HI & Horng T (2015) Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Semin. Immunol.* 27(4):286-296.
- Csibi A, Lee G, Yoon SO, Tong H, Ilter D, Elia I, Fendt SM, Roberts TM & Blenis J (2014) The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation. *Curr. Biol.* 24(19):2274-2280.
- Culjkovic B, Topisirovic I & Borden KL (2007) Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 6(1):65-69.
- Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M & Borden KL (2006) eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J. Cell Biol.* 175(3):415-426.
- Cumano A & Godin I (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 25:745-785.
- D'Andrea LD & Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* 28(12):655-662.
- Daigle F, Graham JE & Curtiss R, 3rd (2001) Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Molecular microbiology* 41(5):1211-1222.
- Dan HC, Ebbs A, Pasparakis M, Van Dyke T, Basseres DS & Baldwin AS (2014) Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I κ B kinase alpha (IKK α). *J. Biol. Chem.* 289(36):25227-25240.
- Darty K, Denise A & Ponty Y (2009) VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* 25(15):1974-1975.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE & Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14(10):986-995.
- De Benedetti A & Graff JR (2004) eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23(18):3189-3199.
- Dever TE & Green R (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(7):a013706.
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D & Ellisen LW (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 22(2):239-251.
- Dhamija S, Winzen R, Doerrie A, Behrens G, Kuehne N, Schauerte C, Neumann E, Dittrich-Breiholz O, Kracht M & Holtmann H (2013) Interleukin-17 (IL-17) and IL-1 activate translation of overlapping sets of mRNAs, including that of the negative regulator of inflammation, MCP1P1. *J. Biol. Chem.* 288(26):19250-19259.

- Di Mari JF, Mifflin RC, Adegboyega PA, Saada JI & Powell DW (2003) IL-1alpha-induced COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts is dependent on a PKCzeta-ROS pathway. *Gastroenterology* 124(7):1855-1865.
- Dias SM, Wilson KF, Rojas KS, Ambrosio AL & Cerione RA (2009) The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(9):930-937.
- Ding H, Zhao L, Dai S, Li L, Wang F & Shan B (2016a) CCL5 secreted by tumor associated macrophages may be a new target in treatment of gastric cancer. *Biomed. Pharmacother.* 77:142-149.
- Ding H, Zhao L, Dai S, Li L, Wang F & Shan B (2016b) CCL5 secreted by tumor associated macrophages may be a new target in treatment of gastric cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77(Supplement C):142-149.
- Ding M, Van der Kwast TH, Vellanki RN, Foltz WD, McKee TD, Sonenberg N, Pandolfi PP, Koritzinsky M & Wouters BG (2018) The mTOR Targets 4E-BP1/2 Restrain Tumor Growth and Promote Hypoxia Tolerance in PTEN-driven Prostate Cancer. *Mol. Cancer Res.* 16(4):682-695.
- Dixon DA, Balch GC, Kedersha N, Anderson P, Zimmerman GA, Beauchamp RD & Prescott SM (2003) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J. Exp. Med.* 198(3):475-481.
- Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE & Pagano M (2006) S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314(5798):467-471.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G & Sonenberg N (2010) mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 328(5982):1172-1176.
- Dreyfus M & Regnier P (2002) The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111(5):611-613.
- Dufner A & Thomas G (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell Res.* 253(1):100-109.
- Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE & Luster AD (2002) IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *The Journal of Immunology* 168(7):3195-3204.
- Dunn EF & Connor JH (2011) Dominant inhibition of Akt/protein kinase B signaling by the matrix protein of a negative-strand RNA virus. *J. Virol.* 85(1):422-431.
- Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J & Diaz-Meco MT (2011) p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol. Cell* 44(1):134-146.
- Eberhardt W, Doller A, Akool el S & Pfeilschifter J (2007) Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* 114(1):56-73.
- Eichelbaum K & Krijgsveld J (2014) Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis, and secretion during macrophage activation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13(3):792-810.

- Elfakess R, Sinvani H, Haimov O, Svitkin Y, Sonenberg N & Dikstein R (2011) Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acids Res.* 39(17):7598-7609.
- Elia A, Constantinou C & Clemens MJ (2008) Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. *Oncogene* 27(6):811-822.
- Engelman JA, Luo J & Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7(8):606-619.
- Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB & Tridandapani S (2004) Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J. Immunol.* 173(1):360-366.
- Fatica A & Bozzoni I (2014) Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.* 15(1):7-21.
- Fenton TR & Gout IT (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43(1):47-59.
- Feoktistova K, Tuvshintogs E, Do A & Fraser CS (2013) Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(33):13339-13344.
- Fernandez J, Yaman I, Huang C, Liu H, Lopez AB, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC, Snider MD, Kaufman RJ, Lamers WH & Hatzoglou M (2005) Ribosome stalling regulates IRES-mediated translation in eukaryotes, a parallel to prokaryotic attenuation. *Mol. Cell* 17(3):405-416.
- Fernandez N, Gonzalez A, Valera I, Alonso S & Crespo MS (2007) Mannan and peptidoglycan induce COX-2 protein in human PMN via the mammalian target of rapamycin. *Eur J Immunol* 37(9):2572-2582.
- Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR & Sonenberg N (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell Biol.* 170(6):913-924.
- Festuccia WT, Pouliot P, Bakan I, Sabatini DM & Laplante M (2014) Myeloid-specific Rictor deletion induces M1 macrophage polarization and potentiates in vivo pro-inflammatory response to lipopolysaccharide. *PLoS One* 9(4):e95432.
- Fingar DC & Blenis J (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23(18):3151-3171.
- Fombonne E (2009) Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr. Res.* 65(6):591-598.
- Fonseca BD, Smith EM, Yelle N, Alain T, Bushell M & Pause A (2014) The ever-evolving role of mTOR in translation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36:102-112.
- Fonseca BD, Zakaria C, Jia JJ, Graber TE, Svitkin Y, Tahmasebi S, Healy D, Hoang HD, Jensen JM, Diao IT, Lussier A, Dajadian C, Padmanabhan N, Wang W, Matta-Camacho E, Hearnden J, Smith EM, Tsukumo Y, Yanagiya A, Morita M, Petroulakis E, Gonzalez JL, Hernandez G, Alain T & Damgaard CK (2015) La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine

(TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* 290(26):15996-16020.

Fortes P, Inada T, Preiss T, Hentze MW, Mattaj IW & Sachs AB (2000) The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol. Cell* 6(1):191-196.

Fortes P & Morris KV (2016) Long noncoding RNAs in viral infections. *Virus Res.* 212:1-11.

Fox CJ, Hammerman PS, Cinalli RM, Master SR, Chodosh LA & Thompson CB (2003) The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev.* 17(15):1841-1854.

Fraser CS, Berry KE, Hershey JW & Doudna JA (2007) eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Mol. Cell* 26(6):811-819.

Fukunaga R & Hunter T (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* 16(8):1921-1933.

Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, Petroulakis E, Robichaud N, Pollak M, Gaboury LA, Pandolfi PP, Saad F & Sonenberg N (2010) eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(32):14134-14139.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S & Otomo S (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47(1):55-59.

Gandin V, Masvidal L, Hulea L, Gravel SP, Cargnello M, McLaughlan S, Cai Y, Balanathan P, Morita M, Rajakumar A, Furic L, Pollak M, Porco JA, Jr., St-Pierre J, Pelletier J, Larsson O & Topisirovic I (2016) nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome Res.* 26(5):636-648.

Gao D, Rahbar R & Fish EN (2016) CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells. *Open biology* 6(6).

Garcia MA, Meurs EF & Esteban M (2007) The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89(6-7):799-811.

Garcia-Garcia C, Frieda KL, Feoktistova K, Fraser CS & Block SM (2015) RNA BIOCHEMISTRY. Factor-dependent processivity in human eIF4A DEAD-box helicase. *Science* 348(6242):1486-1488.

Garcia-Martinez JM & Alessi DR (2008) mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 416(3):375-385.

Garcia-Sastre A & Biron CA (2006) Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science* 312(5775):879-882.

Garneau NL, Wilusz J & Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(2):113-126.

- Garre E, Romero-Santacreu L, De Clercq N, Blasco-Angulo N, Sunnerhagen P & Alepuz P (2012) Yeast mRNA cap-binding protein Cbc1/Sto1 is necessary for the rapid reprogramming of translation after hyperosmotic shock. *Mol. Biol. Cell* 23(1):137-150.
- Gasteiger G, D'Oswaldo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM & Hartl D (2017) Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J. Innate Immun.* 9(2):111-125.
- Gebauer F & Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(10):827-835.
- Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, James JJ, Maysuria M, Mitton JD, Oliveri P, Osborn JL, Peng T, Ratcliffe AL, Webster PJ, Davidson EH, Hood L & Dimitrov K (2008) Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* 26(3):317-325.
- Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszyńska A, Aebersold R & Sonenberg N (2001a) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* 15(21):2852-2864.
- Gingras AC, Raught B & Sonenberg N (2001b) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15(7):807-826.
- Gingras AC, Svitkin Y, Belsham GJ, Pause A & Sonenberg N (1996) Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(11):5578-5583.
- Ginhoux F & Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14(6):392-404.
- Gkogkas CG, Khoutorsky A, Ran I, Rampakakis E, Nevarko T, Weatherill DB, Vasuta C, Yee S, Truitt M, Dallaire P, Major F, Lasko P, Ruggero D, Nader K, Lacaille JC & Sonenberg N (2013) Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493(7432):371-377.
- Gomez MA, Contreras I, Halle M, Tremblay ML, McMaster RW & Olivier M (2009) Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Science signaling* 2(90):ra58.
- Gonatopoulos-Pournatzis T & Cowling VH (2014) Cap-binding complex (CBC). *Biochem. J.* 457(2):231-242.
- Gonskikh Y & Polacek N (2017) Alterations of the translation apparatus during aging and stress response. *Mech. Ageing Dev.* 168:30-36.
- Gonzalez-Teran B, Cortes JR, Manieri E, Matesanz N, Verdugo A, Rodriguez ME, Gonzalez-Rodriguez A, Valverde AM, Martin P, Davis RJ & Sabio G (2013) Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF-alpha translation in LPS-induced hepatitis. *J. Clin. Invest.* 123(1):164-178.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3(1):23-35.
- Gordon S (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1:S9-17.
- Gordon S & Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5):593-604.

- Gordon S & Pluddemann A (2018) Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front. Immunol.* 9:127.
- Gordon SB & Read RC (2002) Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br. Med. Bull.* 61:45-61.
- Graff JR, Konicek BW, Carter JH & Marcusson EG (2008) Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res.* 68(3):631-634.
- Grolleau A, Sonenberg N, Wietzerbin J & Beretta L (1999) Differential regulation of 4E-BP1 and 4E-BP2, two repressors of translation initiation, during human myeloid cell differentiation. *J. Immunol.* 162(6):3491-3497.
- Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E & Rhoads RE (2006) Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *J. Biol. Chem.* 281(4):1857-1867.
- Gruner S, Peter D, Weber R, Wohlbold L, Chung MY, Weichenrieder O, Valkov E, Igreja C & Izaurralde E (2016) The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. *Mol. Cell* 64(3):467-479.
- Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P & Kay MA (2009) Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(2):144-150.
- Guertin DA & Sabatini DM (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12(1):9-22.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE & Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30(2):214-226.
- Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T & Gerber AP (2008) Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(5):798-813.
- Hammami A, Abidin BM, Charpentier T, Fabié A, Duguay A-P, Heinonen KM & Stäger S (2017) HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLOS Pathogens* 13(9):e1006616.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP & Thompson RC (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343(6256):336-340.
- Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C & Avruch J (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* 273(23):14484-14494.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M & Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6(5):1099-1108.
- Harding HP, Zhang Y & Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397(6716):271-274.

- Harvey RF, Smith TS, Mulrone T, Queiroz RML, Pizzinga M, Dezi V, Villeneuve E, Ramakrishna M, Lilley KS & Willis AE (2018) Trans-acting translational regulatory RNA binding proteins. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 9(3):e1465.
- Hay N & Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18(16):1926-1945.
- He C, Sidoli S, Warneford-Thomson R, Tatomer DC, Wilusz JE, Garcia BA & Bonasio R (2016) High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell* 64(2):416-430.
- Heesom KJ, Gampel A, Mellor H & Denton RM (2001) Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr. Biol.* 11(17):1374-1379.
- Heiman M, Kulicke R, Fenster RJ, Greengard P & Heintz N (2014) Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat. Protoc.* 9(6):1282-1291.
- Heitman J, Movva NR, Hiestand PC & Hall MN (1991) FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(5):1948-1952.
- Herdy B, Jaramillo M, Svitkin YV, Rosenfeld AB, Kobayashi M, Walsh D, Alain T, Sean P, Robichaud N, Topisirovic I, Furic L, Dowling RJ, Sylvestre A, Rong L, Colina R, Costa-Mattioli M, Fritz JH, Olivier M, Brown E, Mohr I & Sonenberg N (2012a) Translational control of the activation of transcription factor NF-kappaB and production of type I interferon by phosphorylation of the translation factor eIF4E. *Nat Immunol* 13(6):543-550.
- Herdy B, Jaramillo M, Svitkin YV, Rosenfeld AB, Kobayashi M, Walsh D, Alain T, Sean P, Robichaud N, Topisirovic I, Furic L, Dowling RJO, Sylvestre A, Rong L, Colina R, Costa-Mattioli M, Fritz JH, Olivier M, Brown E, Mohr I & Sonenberg N (2012b) Translational control of the activation of transcription factor NF-kappaB and production of type I interferon by phosphorylation of the translation factor eIF4E. *Nat. Immunol.* 13(6):543-550.
- Hershey JW, Sonenberg N & Mathews MB (2012) Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(12).
- Herzner AM, Wolter S, Zillinger T, Schmitz S, Barchet W, Hartmann G, Bartok E & Schlee M (2016) G-rich DNA-induced stress response blocks type-I-IFN but not CXCL10 secretion in monocytes. *Sci. Rep.* 6:38405.
- Hinnebusch AG (2015) Translational control 1995-2015: unveiling molecular underpinnings and roles in human biology. *RNA* 21(4):636-639.
- Hinnebusch AG, Ivanov IP & Sonenberg N (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* 352(6292):1413-1416.
- Hirayama D, Iida T & Nakase H (2017) The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1).
- Ho JJD, Wang M, Audas TE, Kwon D, Carlsson SK, Timpano S, Evagelou SL, Brothers S, Gonzalgo ML, Krieger JR, Chen S, Uniacke J & Lee S (2016) Systemic Reprogramming of Translation Efficiencies on Oxygen Stimulus. *Cell reports* 14(6):1293-1300.
- Holcik M & Pestova TV (2007) Translation mechanism and regulation: old players, new concepts. Meeting on translational control and non-coding RNA. *EMBO reports* 8(7):639-643.

- Holcik M & Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(4):318-327.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP & Blenis J (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123(4):569-580.
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N & Taniguchi T (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434(7034):772-777.
- Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D & Lemon SM (1996) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222(1):31-42.
- Hong S, Freeberg MA, Han T, Kamath A, Yao Y, Fukuda T, Suzuki T, Kim JK & Inoki K (2017) LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *eLife* 6.
- Hui DJ, Terenzi F, Merrick WC & Sen GC (2005) Mouse p56 blocks a distinct function of eukaryotic initiation factor 3 in translation initiation. *J. Biol. Chem.* 280(5):3433-3440.
- Hutchins AP, Diez D & Miranda-Saavedra D (2013) The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in functional genomics* 12(6):489-498.
- Hutchins AP, Poulain S & Miranda-Saavedra D (2012a) Genome-wide analysis of STAT3 binding in vivo predicts effectors of the anti-inflammatory response in macrophages. *Blood* 119(13):e110-e119.
- Hutchins AP, Poulain Sp & Miranda-Saavedra D (2012b) Genome-wide analysis of STAT3 binding in vivo predicts effectors of the anti-inflammatory response in macrophages. *Blood* 119(13):e110-e119.
- Hutten S & Kehlenbach RH (2007) CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 17(4):193-201.
- Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM & Weissman JS (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat. Protoc.* 7(8):1534-1550.
- Isaksson A, Berggren M, Ekeland-Sjoberg K, Samuelsson T & Ricksten A (2007) Cell specific internal translation efficiency of Epstein-Barr virus present in solid organ transplant patients. *J. Med. Virol.* 79(5):573-581.
- Ivanov A, Mikhailova T, Eliseev B, Yeramala L, Sokolova E, Susorov D, Shuvalov A, Schaffitzel C & Alkalaeva E (2016) PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res.* 44(16):7766-7776.
- Ivanov SS & Roy CR (2013) Pathogen signatures activate a ubiquitination pathway that modulates the function of the metabolic checkpoint kinase mTOR. *Nat. Immunol.* 14(12):1219-1228.
- Ivshina M, Lasko P & Richter JD (2014) Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 30:393-415.

- Jackson RJ, Hellen CU & Pestova TV (2010a) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(2):113-127.
- Jackson RJ, Hellen CU & Pestova TV (2012) Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 86:45-93.
- Jain S, Wheeler JR, Walters RW, Agrawal A, Barsic A & Parker R (2016) ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* 164(3):487-498.
- Janzen C, Sen S, Cuevas J, Reddy ST & Chaudhuri G (2011) Protein phosphatase 2A promotes endothelial survival via stabilization of translational inhibitor 4E-BP1 following exposure to tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(11):2586-2594.
- Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, Luxenburg R, Rosenfeld A, Colina R, McMaster RW, Olivier M, Costa-Mattioli M & Sonenberg N (2011) Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell host & microbe* 9(4):331-341.
- Jiang F, Hua LM, Jiao YL, Ye P, Fu J, Cheng ZJ, Ding G & Ji YH (2014) Activation of mammalian target of rapamycin contributes to pain nociception induced in rats by BmK I, a sodium channel-specific modulator. *Neurosci. Bull.* 30(1):21-32.
- Jiang F, Pang XY, Niu QS, Hua LM, Cheng M & Ji YH (2013) Activation of mammalian target of rapamycin mediates rat pain-related responses induced by BmK I, a sodium channel-specific modulator. *Mol. Pain* 9:50.
- Jiang HY & Wek RC (2005) GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem. J.* 385(Pt 2):371-380.
- Johanna S & Georg S (2010) Networks controlling mRNA decay in the immune system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1(3):432-456.
- Johnstone TG, Bazzini AA & Giraldez AJ (2016) Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J.* 35(7):706-723.
- Jorgensen PF, Wang JE, Almlof M, Solberg R, Okkenhaug C, Scholz T, Thiemermann C, Foster SJ & Aasen AO (2001) Sirolimus interferes with the innate response to bacterial products in human whole blood by attenuation of IL-10 production. *Scand. J. Immunol.* 53(2):184-191.
- Joshi B, Lee K, Maeder DL & Jagus R (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* 5:48.
- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL & McMaster WR (2002) Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120(1):33-40.
- Joshi S & Plataniias LC (2015) Mnk kinases in cytokine signaling and regulation of cytokine responses. *Biomolecular concepts* 6(1):85.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D & Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1(1):15-25.
- Kanduri C (2016) Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. *Biochim. Biophys. Acta* 1859(1):102-111.

- Kariminik A, Dabiri S & Yaghobi R (2016) Polyomavirus BK Induces Inflammation via Up-regulation of CXCL10 at Translation Levels in Renal Transplant Patients with Nephropathy. *Inflammation* 39(4):1514-1519.
- Karlsson E, Perez-Tenorio G, Amin R, Bostner J, Skoog L, Fornander T, Sgroi DC, Nordenskjold B, Hallbeck AL & Stal O (2013) The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomised Stockholm tamoxifen trials. *Breast Cancer Res.* 15(5):R96.
- Katze MG, He Y & Gale M, Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat. Rev. Immunol.* 2(9):675-687.
- Kaur S, Lal L, Sassano A, Majchrzak-Kita B, Srikanth M, Baker DP, Petroulakis E, Hay N, Sonenberg N, Fish EN & Plataniias LC (2007) Regulatory effects of mammalian target of rapamycin-activated pathways in type I and II interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 282(3):1757-1768.
- Kaur S, Sassano A, Dolniak B, Joshi S, Majchrzak-Kita B, Baker DP, Hay N, Fish EN & Plataniias LC (2008) Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(12):4808-4813.
- Keating R & McGargill MA (2016) mTOR Regulation of Lymphoid Cells in Immunity to Pathogens. *Front. Immunol.* 7:180.
- Keene JD (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 8(7):533-543.
- Keene JD & Tenenbaum SA (2002) Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell* 9(6):1161-1167.
- Keith CT & Schreiber SL (1995) PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270(5233):50-51.
- Kelleher RJ, 3rd & Bear MF (2008) The autistic neuron: troubled translation? *Cell* 135(3):401-406.
- Keshwani MM, von Daake S, Newton AC, Harris TK & Taylor SS (2011) Hydrophobic motif phosphorylation is not required for activation loop phosphorylation of p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1). *J. Biol. Chem.* 286(26):23552-23558.
- Kevil CG, De Benedetti A, Payne DK, Coe LL, Laroux FS & Alexander JS (1996) Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 65(6):785-790.
- Khalid A, Wolfram J, Ferrari I, Mu C, Mai J, Yang Z, Zhao Y, Ferrari M, Ma X & Shen H (2015) Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. *Mini Rev. Med. Chem.* 15(13):1063-1072.
- Khoutorsky A, Bonin RP, Sorge RE, Gkogkas CG, Pawlowski SA, Jafarnejad SM, Pitcher MH, Alain T, Perez-Sanchez J, Salter EW, Martin L, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y, Cervero F, Mogil JS & Sonenberg N (2015) Translational control of nociception via 4E-binding protein 1. *eLife* 4.

- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110(2):163-175.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sabatini DM (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11(4):895-904.
- Kim KM, Cho H, Choi K, Kim J, Kim BW, Ko YG, Jang SK & Kim YK (2009a) A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap-binding protein CBP80/20-dependent translation. *Genes Dev.* 23(17):2033-2045.
- Kim YY, Von Weyern L, Larsson O, Fan D, Underwood JM, Peterson MS, Hecht SS, Polunovsky VA & Bitterman PB (2009b) Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein Family of Proteins: Sentinels at a Translational Control Checkpoint in Lung Tumor Defense. *Cancer Research* 69(21):8455-8462.
- Kim YY, Von Weyern L, Larsson O, Fan D, Underwood JM, Peterson MS, Hecht SS, Polunovsky VA & Bitterman PB (2009c) Eukaryotic initiation factor 4E binding protein family of proteins: sentinels at a translational control checkpoint in lung tumor defense. *Cancer Res.* 69(21):8455-8462.
- King HA, Cobbold LC, Pichon X, Poyry T, Wilson LA, Booden H, Jukes-Jones R, Cain K, Lilley KS, Bushell M & Willis AE (2014) Remodelling of a polypyrimidine tract-binding protein complex during apoptosis activates cellular IRESs. *Cell Death Differ.* 21(1):161-171.
- King HA, Cobbold LC & Willis AE (2010) The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* 38(6):1581-1586.
- King HA & Gerber AP (2016) Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Briefings in functional genomics* 15(1):22-31.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT & Mourelatos Z (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129(6):1141-1151.
- Kitamura H, Ito M, Yuasa T, Kikuguchi C, Hijikata A, Takayama M, Kimura Y, Yokoyama R, Kaji T & Ohara O (2008) Genome-wide identification and characterization of transcripts translationally regulated by bacterial lipopolysaccharide in macrophage-like J774.1 cells. *Physiol. Genomics* 33(1):121-132.
- Klebanoff SJ (1992) Bactericidal effect of Fe²⁺, ceruloplasmin, and phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 295(2):302-308.
- Kneller EL, Rakotondrafara AM & Miller WA (2006) Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res.* 119(1):63-75.
- Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T, Hansen JJ, Doty KR, Pope SD, Smale ST, Hibi T, Rothman PB, Kashiwada M & Plevy SE (2011) NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J Immunol* 186(8):4649-4655.
- Kolitz SE & Lorsch JR (2010) Eukaryotic initiator tRNA: finely tuned and ready for action. *FEBS Lett.* 584(2):396-404.

- Komar AA & Hatzoglou M (2011) Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10(2):229-240.
- Konarska MM, Padgett RA & Sharp PA (1984) Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell* 38(3):731-736.
- Kong J & Lasko P (2012) Translational control in cellular and developmental processes. *Nat. Rev. Genet.* 13(6):383-394.
- Koraha J, Tsuneyoshi N, Kimoto M, Gauchat JF, Nakatake H & Fukudome K (2005) Comparison of lipopolysaccharide-binding functions of CD14 and MD-2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(11):1292-1297.
- Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A & Sonenberg N (1992) mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J* 11(11):4153-4158.
- Kristensen AR, Gsponer J & Foster LJ (2013a) Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation. *Molecular systems biology* 9(1).
- Kroczyńska B, Kaur S, Katsoulidis E, Majchrzak-Kita B, Sassano A, Kozma SC, Fish EN & Plataniias LC (2009) Interferon-dependent engagement of eukaryotic initiation factor 4B via S6 kinase (S6K)- and ribosomal protein S6K-mediated signals. *Mol Cell Biol* 29(10):2865-2875.
- Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J & Medvinsky A (2002) Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129(21):4891-4899.
- Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K & Akira S (2003) IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages. *Blood* 102(12):4123-4129.
- Lahr RM, Fonseca BD, Ciotti GE, Al-Ashtal HA, Jia JJ, Niklaus MR, Blagden SP, Alain T & Berman AJ (2017) La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. *eLife* 6.
- Landon AL, Muniandy PA, Shetty AC, Lehrmann E, Volpon L, Houng S, Zhang Y, Dai B, Peroutka R, Mazan-Mamczarz K, Steinhardt J, Mahurkar A, Becker KG, Borden KL & Gartenhaus RB (2014) MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nature communications* 5:5413.
- Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL & Murray PJ (2002) Shaping Gene Expression in Activated and Resting Primary Macrophages by IL-10. *The Journal of Immunology* 169(5):2253-2263.
- Laplante M & Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122(Pt 20):3589-3594.
- Laplante M & Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2):274-293.
- Larance M, Ahmad Y, Kirkwood KJ, Ly T & Lamond AI (2013) Global subcellular characterization of protein degradation using quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 12(3):638-650.

- Larsson O, Li S, Issaenko OA, Avdulov S, Peterson M, Smith K, Bitterman PB & Polunovsky VA (2007) Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. *Cancer Res.* 67(14):6814-6824.
- Larsson O, Morita M, Topisirovic I, Alain T, Blouin MJ, Pollak M & Sonenberg N (2012) Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(23):8977-8982.
- Larsson O, Sonenberg N & Nadon R (2010) Identification of differential translation in genome wide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(50):21487-21492.
- Larsson O, Sonenberg N & Nadon R (2011) anota: Analysis of differential translation in genome-wide studies. *Bioinformatics* 27(10):1440-1441.
- Lasfargues C, Martineau Y, Bousquet C & Pyronnet S (2012) Changes in translational control after pro-apoptotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1):177-190.
- Le Bacquer O, Combe K, Montaurier C, Salles J, Giraudet C, Patrac V, Domingues-Faria C, Guillet C, Louche K, Boirie Y, Sonenberg N, Moro C & Walrand S (2017) Muscle metabolic alterations induced by genetic ablation of 4E-BP1 and 4E-BP2 in response to diet-induced obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* 61(9).
- Lee JH, Kim B, Jin WJ, Kim HH, Ha H & Lee ZH (2017) Pathogenic roles of CXCL10 signaling through CXCR3 and TLR4 in macrophages and T cells: relevance for arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 19(1):163.
- Lee MV, Topper SE, Hubler SL, Hose J, Wenger CD, Coon JJ & Gasch AP (2011) A dynamic model of proteome changes reveals new roles for transcript alteration in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 7:514.
- Leroux LP, Dasanayake D, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Jardim A & Dzierszynski FS (2015) Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. *International journal for parasitology* 45(5):319-332.
- Leroux LP, Lorent J, Graber TE, Chaparro V, Masvidal L, Aguirre M, Fonseca BD, van Kempen LC, Alain T, Larsson O & Jaramillo M (2018) The Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* Selectively Reprograms the Host Cell Translatome. *Infect. Immun.* 86(9).
- Lewis JD & Izaurralde E (1997) The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur. J. Biochem.* 247(2):461-469.
- Liepelt A, Mossanen JC, Denecke B, Heymann F, De Santis R, Tacke F, Marx G, Ostareck DH & Ostareck-Lederer A (2014) Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation. *RNA* 20(6):899-911.
- Lin HY, Chang KT, Hung CC, Kuo CH, Hwang SJ, Chen HC, Hung CH & Lin SF (2014) Effects of the mTOR inhibitor rapamycin on monocyte-secreted chemokines. *BMC Immunol.* 15:37.
- Liu B & Qian SB (2014) Translational reprogramming in cellular stress response. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 5(3):301-315.
- Liu J, Li F, Ping Y, Wang L, Chen X, Wang D, Cao L, Zhao S, Li B, Kalinski P, Thorne SH, Zhang B & Zhang Y (2015) Local production of the chemokines CCL5 and CXCL10 attracts CD8+ T lymphocytes into esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 6(28):24978-24989.

- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO & Stiles JK (2011a) CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22(3):121-130.
- Liu M, Guo S & Stiles JK (2011b) The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol. Lett.* 2(4):583-589.
- Liu YW, Chen CC, Tseng HP & Chang WC (2006) Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell. Signal.* 18(9):1492-1500.
- Lopez de Quinto S & Martinez-Salas E (2000) Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* 6(10):1380-1392.
- Lopez-Pelaez M, Fumagalli S, Sanz C, Herrero C, Guerra S, Fernandez M & Alemany S (2012) Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 controls mTORC1-mediated mRNA translation in Toll-like receptor-activated macrophages. *Mol. Biol. Cell* 23(15):2982-2992.
- Lopez-Pelaez M, Soria-Castro I, Bosca L, Fernandez M & Alemany S (2011) Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implications for NO synthase 2 expression. *Eur. J. Immunol.* 41(6):1733-1741.
- Lorenz R, Bernhart SH, Honer Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF & Hofacker IL (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 6:26.
- Lu PD, Harding HP & Ron D (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167(1):27-33.
- Lui SL, Tsang R, Chan KW, Zhang F, Tam S, Yung S & Chan TM (2008) Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23(9):2768-2776.
- Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R & Mackman N (2008) Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J. Immunol.* 180(6):4218-4226.
- Lv D, Zhang Y, Kim HJ, Zhang L & Ma X (2013) CCL5 as a potential immunotherapeutic target in triple-negative breast cancer. *Cell. Mol. Immunol.* 10(4):303-310.
- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O & Sonenberg N (2006) mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25(48):6416-6422.
- Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O, Rajasekhar VK & Sonenberg N (2007) Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 2(2):e242.
- Manning J, Beutler K, Knepper MA & Vehaskari VM (2002) Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283(1):F202-206.
- Mansfield KD & Keene JD (2009) The ribosome: a dominant force in co-ordinating gene expression. *Biol. Cell* 101(3):169-181.

- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25(12):677-686.
- Mao Y, van Hoef V, Zhang X, Wennerberg E, Lorent J, Witt K, Masvidal L, Liang S, Murray S, Larsson O, Kiessling R & Lundqvist A (2016) IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood* 128(11):1475-1489.
- Marcais A, Tomkowiak M, Walzer T, Coupet CA, Ravel-Chapuis A & Marvel J (2006) Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur J Immunol* 36(10):2745-2754.
- Marchese FP, Raimondi I & Huarte M (2017) The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol.* 18(1):206.
- Marintchev A & Wagner G (2005) eIF4G and CBP80 share a common origin and similar domain organization: implications for the structure and function of eIF4G. *Biochemistry* 44(37):12265-12272.
- Marques RE, Guabiraba R, Russo RC & Teixeira MM (2013) Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* 17(12):1439-1460.
- Martin KC & Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136(4):719-730.
- Martineau Y, Azar R, Bousquet C & Pyronnet S (2013) Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* 32(6):671-677.
- Martineau Y, Derry MC, Wang X, Yanagiya A, Berlanga JJ, Shyu AB, Imataka H, Gehring K & Sonenberg N (2008) Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.* 28(21):6658-6667.
- Martinez FO & Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6:13.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A & Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13:453-461.
- Masek T, Valasek L & Pospisek M (2011) Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients. *Methods Mol. Biol.* 703:293-309.
- Masvidal L, Hulea L, Furic L, Topisirovic I & Larsson O (2017a) mTOR-sensitive translation: Cleared fog reveals more trees. *RNA Biol.* 14(10):1299-1305.
- Masvidal L, Hulea L, Furic L, Topisirovic I & Larsson O (2017b) mTOR-sensitive translation: Cleared fog reveals more trees. *RNA biology* 10.1080/15476286.2017.1290041:1-7.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF & Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317(5845):1764-1767.
- Mazumder B & Fox PL (1999) Delayed translational silencing of ceruloplasmin transcript in gamma interferon-activated U937 monocytic cells: role of the 3' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* 19(10):6898-6905.

- Mazumder B, Li X & Barik S (2010) Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response. *J. Immunol.* 184(7):3311-3319.
- Mazza C, Ohno M, Segref A, Mattaj IW & Cusack S (2001) Crystal structure of the human nuclear cap binding complex. *Mol. Cell* 8(2):383-396.
- Melanson G, Timpano S & Uniacke J (2017) The eIF4E2-Directed Hypoxic Cap-Dependent Translation Machinery Reveals Novel Therapeutic Potential for Cancer Treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017:6098107.
- Mercalli A, Calavita I, Dugnani E, Citro A, Cantarelli E, Nano R, Melzi R, Maffi P, Secchi A, Sordi V & Piemonti L (2013) Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. *Immunology* 140(2):179-190.
- Meylan E, Tschopp J & Karin M (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442(7098):39-44.
- Meyuhas O (2008) Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 268:1-37.
- Mickleburgh I, Kafasla P, Cherny D, Llorian M, Curry S, Jackson RJ & Smith CW (2014) The organization of RNA contacts by PTB for regulation of FAS splicing. *Nucleic Acids Res.* 42(13):8605-8620.
- Miller WA, Wang Z & Treder K (2007) The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochem. Soc. Trans.* 35(Pt 6):1629-1633.
- Miller WA & White KA (2006) Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:447-467.
- Mills CD, Thomas AC, Lenz LL & Munder M (2014) Macrophage: SHIP of Immunity. *Front. Immunol.* 5:620.
- Miloslavski R, Cohen E, Avraham A, Iluz Y, Hayouka Z, Kasir J, Mudhasani R, Jones SN, Cybulski N, Ruegg MA, Larsson O, Gandin V, Rajakumar A, Topisirovic I & Meyuhas O (2014) Oxygen sufficiency controls TOP mRNA translation via the TSC-Rheb-mTOR pathway in a 4E-BP-independent manner. *Journal of molecular cell biology* 6(3):255-266.
- Mitchell SA, Spriggs KA, Coldwell MJ, Jackson RJ & Willis AE (2003) The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol. Cell* 11(3):757-771.
- Mitchell SF, Walker SE, Algire MA, Park EH, Hinnebusch AG & Lorsch JR (2010) The 5'-7-methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway. *Mol. Cell* 39(6):950-962.
- Modelska A, Turro E, Russell R, Beaton J, Sbarrato T, Spriggs K, Miller J, Graf S, Provenzano E, Blows F, Pharoah P, Caldas C & Le Quesne J (2015) The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. *Cell Death Dis.* 6:e1603.
- Mohr I & Sonenberg N (2012) Host translation at the nexus of infection and immunity. *Cell host & microbe* 12(4):470-483.

- Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC & Thomas G (1999) Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285(5436):2126-2129.
- Morita M, Gravel SP, Chenard V, Sikstrom K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I & Sonenberg N (2013) mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab.* 18(5):698-711.
- Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J & Topisirovic I (2015) mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14(4):473-480.
- Morita M, Prudent J, Basu K, Goyon V, Katsumura S, Hulea L, Pearl D, Siddiqui N, Strack S, McGuirk S, St-Pierre J, Larsson O, Topisirovic I, Vali H, McBride HM, Bergeron JJ & Sonenberg N (2017a) mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Mol. Cell* 67(6):922-935 e925.
- Morley SJ, Coldwell MJ & Clemens MJ (2005) Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ.* 12(6):571-584.
- Mortier A, Van Damme J & Proost P (2008) Regulation of chemokine activity by posttranslational modification. *Pharmacology & Therapeutics* 120(2):197-217.
- Mosser DM & Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* 226:205-218.
- Mukhopadhyay R, Jia J, Arif A, Ray PS & Fox PL (2009) The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 34(7):324-331.
- Mukhopadhyay R, Ray PS, Arif A, Brady AK, Kinter M & Fox PL (2008) DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression. *Mol. Cell* 32(3):371-382.
- Muller D, Lasfargues C, El Khawand S, Alard A, Schneider RJ, Bousquet C, Pyronnet S & Martineau Y (2013) 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. *Translation (Austin)* 1(2):e25819.
- Muller-McNicoll M & Neugebauer KM (2013) How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat. Rev. Genet.* 14(4):275-287.
- Murooka TT, Rahbar R, Plataniias LC & Fish EN (2008) CCL5-mediated T-cell chemotaxis involves the initiation of mRNA translation through mTOR/4E-BP1. *Blood* 111(10):4892-4901.
- Murooka TT, Wong MM, Rahbar R, Majchrzak-Kita B, Proudfoot AE & Fish EN (2006) CCL5-CCR5-mediated apoptosis in T cells: Requirement for glycosaminoglycan binding and CCL5 aggregation. *J. Biol. Chem.* 281(35):25184-25194.
- Murray PJ & Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11(11):723-737.
- Musa J, Orth MF, Dallmayer M, Baldauf M, Pardo C, Rotblat B, Kirchner T, Leprivier G & Grunewald TG (2016) Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis. *Oncogene* 35(36):4675-4688.
- Na YR, Jung D, Yoon BR, Lee WW & Seok SH (2015) Endogenous prostaglandin E2 potentiates anti-inflammatory phenotype of macrophage through the CREB-C/EBP-beta cascade. *Eur. J. Immunol.* 45(9):2661-2671.

- Naeyegele S & Morley SJ (2004) Molecular cross-talk between MEK1/2 and mTOR signaling during recovery of 293 cells from hypertonic stress. *J. Biol. Chem.* 279(44):46023-46034.
- Nehdi A, Sean P, Linares I, Colina R, Jaramillo M & Alain T (2014) Deficiency in either 4E-BP1 or 4E-BP2 augments innate antiviral immune responses. *PLoS One* 9(12):e114854.
- Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES & Hasko G (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 175(12):8260-8270.
- Newton K & Dixit VM (2012) Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(3).
- Nikolcheva T, Pyronnet S, Chou SY, Sonenberg N, Song A, Clayberger C & Krensky AM (2002) A translational rheostat for RFLAT-1 regulates RANTES expression in T lymphocytes. *J Clin Invest* 110(1):119-126.
- Noeske J & Cate JH (2012) Structural basis for protein synthesis: snapshots of the ribosome in motion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22(6):743-749.
- Oh N, Kim KM, Cho H, Choe J & Kim YK (2007) Pioneer round of translation occurs during serum starvation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362(1):145-151.
- Ohno M, Sakamoto H & Shimura Y (1987) Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84(15):5187-5191.
- Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S & Koyasu S (2008) Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 112(3):635-643.
- Olson KE, Booth GC, Poulin F, Sonenberg N & Beretta L (2009) Impaired myelopoiesis in mice lacking the repressors of translation initiation, 4E-BP1 and 4E-BP2. *Immunology* 128(1 Suppl):e376-384.
- Orkin SH & Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132(4):631-644.
- Ortiz-Zapater E, Pineda D, Martinez-Bosch N, Fernandez-Miranda G, Iglesias M, Alameda F, Moreno M, Eliscovich C, Eyras E, Real FX, Mendez R & Navarro P (2011) Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nat. Med.* 18(1):83-90.
- Osborne MJ, Volpon L, Kornblatt JA, Culjkovic-Kraljacic B, Baguet A & Borden KL (2013) eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(10):3877-3882.
- Pabis M, Neufeld N, Shav-Tal Y & Neugebauer KM (2010) Binding properties and dynamic localization of an alternative isoform of the cap-binding complex subunit CBP20. *Nucleus (Calcutta)* 1(5):412-421.
- Pacheco A & Martinez-Salas E (2010) Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:458927.

Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Garcia-Zepeda E, Carrero JC & Morales-Montor J (2014) The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets. *Journal of immunology research* 2014:849720.

Patursky-Polischuk I, Kasir J, Miloslavski R, Hayouka Z, Hausner-Hanochi M, Stolovich-Rain M, Tsukerman P, Biton M, Mudhasani R, Jones SN & Meyuhas O (2014) Reassessment of the role of TSC, mTORC1 and microRNAs in amino acids-mediated translational control of TOP mRNAs. *PLoS One* 9(10):e109410.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr. & Sonenberg N (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371(6500):762-767.

Pelletier J & Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334(6180):320-325.

Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM & Lindsay MA (2008) Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol.* 180(8):5689-5698.

Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ & Wynn TA (2009) Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5(4):e1000371.

Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ & Hellen CU (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(1):67-83.

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS & Sabatini DM (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137(5):873-886.

Petroulakis E, Parsyan A, Dowling RJ, LeBacquer O, Martineau Y, Bidinosti M, Larsson O, Alain T, Rong L, Mamane Y, Paquet M, Furic L, Topisirovic I, Shahbazian D, Livingstone M, Costa-Mattioli M, Teodoro JG & Sonenberg N (2009) p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs. *Cancer Cell* 16(5):439-446.

Philippe L, Vasseur JJ, Debart F & Thoreen CC (2018) La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 46(3):1457-1469.

Piccirillo CA, Bjur E, Topisirovic I, Sonenberg N & Larsson O (2014) Translational control of immune responses: from transcripts to translomes. *Nat. Immunol.* 15(6):503-511.

Pique M, Lopez JM, Foissac S, Guigo R & Mendez R (2008) A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* 132(3):434-448.

Pisarev AV, Hellen CU & Pestova TV (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131(2):286-299.

Poddar D, Kaur R, Baldwin Iii WM & Mazumder B (2015) L13a-dependent translational control in macrophages limits the pathogenesis of colitis. *Cellular And Molecular Immunology* 13:816.

- Poddar D, Kaur R, Baldwin WM, 3rd & Mazumder B (2016) L13a-dependent translational control in macrophages limits the pathogenesis of colitis. *Cell. Mol. Immunol.* 13(6):816-827.
- Poulin F, Brueschke A & Sonenberg N (2003) Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK. *J. Biol. Chem.* 278(52):52290-52297.
- Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S & Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 273(22):14002-14007.
- Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB & Horton MR (2012) Regulation of immune responses by mTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 30:39-68.
- Powell MJ, Thompson SAJ, Tone Y, Waldmann H & Tone M (2000) Posttranscriptional Regulation of IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region. *The Journal of Immunology* 165(1):292-296.
- Preiss T & M WH (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25(12):1201-1211.
- Proudfoot NJ (2011) Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25(17):1770-1782.
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA & Thomas G (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279(5351):707-710.
- Pullmann R, Jr., Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Yang X & Gorospe M (2007) Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 27(18):6265-6278.
- Qidwai T & Khan MY (2016) Impact of genetic variations in C-C chemokine receptors and ligands on infectious diseases. *Human Immunology* 77(10):961-971.
- Quinn JJ & Chang HY (2016) Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.* 17(1):47-62.
- Radimerski T, Montagne J, Rintelen F, Stocker H, van der Kaay J, Downes CP, Hafen E & Thomas G (2002) dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat. Cell Biol.* 4(3):251-255.
- Rajkowitsch L, Vilela C, Berthelot K, Ramirez CV & McCarthy JE (2004) Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *J. Mol. Biol.* 335(1):71-85.
- Ramanathan A, Robb GB & Chan SH (2016) mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 44(16):7511-7526.
- Ramirez-Valle F, Braunstein S, Zavadil J, Formenti SC & Schneider RJ (2008) eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J. Cell Biol.* 181(2):293-307.
- Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N & Hershey JW (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* 23(8):1761-1769.
- Reddy R, Singh R & Shimba S (1992) Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions. *Pharmacol. Ther.* 54(3):249-267.

- Ricciotti E & FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(5):986-1000.
- Riley A, Jordan LE & Holcik M (2010) Distinct 5' UTRs regulate XIAP expression under normal growth conditions and during cellular stress. *Nucleic Acids Res.* 38(14):4665-4674.
- Robichaud N, del Rincon SV, Huor B, Alain T, Petruccelli LA, Hearnden J, Goncalves C, Grotegut S, Spruck CH, Furic L, Larsson O, Muller WJ, Miller WH & Sonenberg N (2015) Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene* 34(16):2032-2042.
- Robichaud N, Hsu BE, Istomine R, Alvarez F, Blagih J, Ma EH, Morales SV, Dai DL, Li G, Souleimanova M, Guo Q, Del Rincon SV, Miller WH, Jr., Ramon YCS, Park M, Jones RG, Piccirillo CA, Siegel PM & Sonenberg N (2018a) Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115(10):E2202-E2209.
- Rodnina MV & Wintermeyer W (2009) Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21(3):435-443.
- Rolli-Derkinderen M, Machavoine F, Baraban JM, Grolleau A, Beretta L & Dy M (2003) ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. *J. Biol. Chem.* 278(21):18859-18867.
- Rom E, Kim HC, Gingras AC, Marcotrigiano J, Favre D, Olsen H, Burley SK & Sonenberg N (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J. Biol. Chem.* 273(21):13104-13109.
- Rosenwald IB, Kaspar R, Rousseau D, Gehrke L, Leboulch P, Chen JJ, Schmidt EV, Sonenberg N & London IM (1995) Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* 270(36):21176-21180.
- Roux PP & Topisirovic I (2012) Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(11).
- Roux PP & Topisirovic I (2018) Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* 38(12).
- Rubio CA, Weisburd B, Holderfield M, Arias C, Fang E, DeRisi JL & Fanidi A (2014) Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation. *Genome Biol.* 15(10):476.
- Rufener SC & Muhlemann O (2013) eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20(6):710-717.
- Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N & Nerlov C (2009) A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41):17475-17480.
- Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB & Thomas G (2002) Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 277(22):20104-20112.

- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L & Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320(5882):1496-1501.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA & Sabatini DM (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell* 25(6):903-915.
- Sanin DE, Prendergast CT & Mountford AP (2015) IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *J. Immunol.* 195(3):1218-1232.
- Saraiva M & O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10(3):170-181.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM & Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307(5712):1098-1101.
- Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, Nguyen TT, Walters JA, Burrack A, Eberlein J, Hildemann SK & Homann D (2012) Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. *Diabetes* 61(2):436-446.
- Sato H & Maquat LE (2009) Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev.* 23(21):2537-2550.
- Schaeffer V, Arbabi S, Garcia IA, Knoll ML, Cuschieri J, Bulger EM & Maier RV (2011) Role of the mTOR pathway in LPS-activated monocytes: influence of hypertonic saline. *J. Surg. Res.* 171(2):769-776.
- Schalm SS & Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.* 12(8):632-639.
- Schalm SS, Tee AR & Blenis J (2005) Characterization of a conserved C-terminal motif (RSPRR) in ribosomal protein S6 kinase 1 required for its mammalian target of rapamycin-dependent regulation. *J. Biol. Chem.* 280(12):11101-11106.
- Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ & Proud CG (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J. Biol. Chem.* 277(5):3303-3309.
- Scheu S, Stetson DB, Reinhardt RL, Leber JH, Mohrs M & Locksley RM (2006) Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation. *Nat. Immunol.* 7(6):644-651.
- Schilling E, Weiss R, Grahnert A, Bitar M, Sack U & Hauschildt S (2018) Molecular mechanism of LPS-induced TNF- α biosynthesis in polarized human macrophages. *Mol. Immunol.* 93:206-215.
- Schmelzle T & Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103(2):253-262.
- Schmitt E, Naveau M & Mechulam Y (2010) Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS Lett.* 584(2):405-412.
- Schoggins JW & Rice CM (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* 1(6):519-525.

- Schott J, Reitter S, Philipp J, Haneke K, Schafer H & Stoecklin G (2014) Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation. *PLoS Genet.* 10(6):e1004368.
- Schroder WA, Le TT, Major L, Street S, Gardner J, Lambley E, Markey K, MacDonald KP, Fish RJ, Thomas R & Suhrbier A (2010) A physiological function of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 184(5):2663-2670.
- Schulte W, Bernhagen J & Bucala R (2013) Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013:165974.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ & Geissmann F (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336(6077):86-90.
- Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W & Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473(7347):337-342.
- Seidel P, Sun Q, Costa L, Lardinois D, Tamm M & Roth M (2016) The MNK-1/eIF4E pathway as a new therapeutic pathway to target inflammation and remodelling in asthma. *Cell. Signal.* 28(10):1555-1562.
- Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Topisirovic I, Martineau Y, Gibbs BF, Svitkin Y & Sonenberg N (2010) Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol. Cell. Biol.* 30(6):1478-1485.
- Shaheen ZR, Naatz A & Corbett JA (2015) CCR5-Dependent Activation of mTORC1 Regulates Translation of Inducible NO Synthase and COX-2 during Encephalomyocarditis Virus Infection. *J. Immunol.* 195(9):4406-4414.
- Sharma A, Yilmaz A, Marsh K, Cochrane A & Boris-Lawrie K (2012) Thriving under stress: selective translation of HIV-1 structural protein mRNA during Vpr-mediated impairment of eIF4E translation activity. *PLoS Pathog.* 8(3):e1002612.
- Shatsky IN, Dmitriev SE, Terenin IM & Andreev DE (2010) Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol. Cells* 30(4):285-293.
- Shatsky IN, Terenin IM, Smirnova VV & Andreev DE (2018) Cap-Independent Translation: What's in a Name? *Trends Biochem. Sci.* 10.1016/j.tibs.2018.04.011.
- Shaw RJ (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol. (Oxf.)* 196(1):65-80.
- Shay AE, Diwakar BT, Guan BJ, Narayan V, Urban JF, Jr. & Prabhu KS (2017) IL-4 up-regulates cyclooxygenase-1 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* 292(35):14544-14555.
- She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, Solit DB & Rosen N (2010) 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell* 18(1):39-51.
- Shi C & Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11(11):762-774.

- Shin S, Wolgamott L, Tcherkezian J, Vallabhapurapu S, Yu Y, Roux PP & Yoon SO (2014) Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene* 33(13):1690-1699.
- Shoemaker CJ, Eyler DE & Green R (2010) Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* 330(6002):369-372.
- Shoemaker CJ & Green R (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(51):E1392-1398.
- Showkat M, Beigh MA & Andrabi KI (2014) mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Mol. Biol. Int.* 2014:686984.
- Siddiqui N & Sonenberg N (2015) Signalling to eIF4E in cancer. *Biochemical Society transactions* 43(5):763-772.
- Signer RA, Qi L, Zhao Z, Thompson D, Sigova AA, Fan ZP, DeMartino GN, Young RA, Sonenberg N & Morrison SJ (2016) The rate of protein synthesis in hematopoietic stem cells is limited partly by 4E-BPs. *Genes Dev.* 30(15):1698-1703.
- Sikalidis AK, Mazor KM, Kang M, Liu H & Stipanuk MH (2013) Total 4EBP1 Is Elevated in Liver of Rats in Response to Low Sulfur Amino Acid Intake. *Journal of amino acids* 2013:864757.
- Sinvani H, Haimov O, Svitkin Y, Sonenberg N, Tamarkin-Ben-Harush A, Viollet B & Dikstein R (2015) Translational tolerance of mitochondrial genes to metabolic energy stress involves TISU and eIF1-eIF4GI cooperation in start codon selection. *Cell Metab.* 21(3):479-492.
- Sladek Z & Rysanek D (2009) Expression of macrophage CD44 receptor in the course of experimental inflammatory response of bovine mammary gland induced by lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. *Res. Vet. Sci.* 86(2):235-240.
- Slepenkov SV, Darzynkiewicz E & Rhoads RE (2006) Stopped-flow kinetic analysis of eIF4E and phosphorylated eIF4E binding to cap analogs and capped oligoribonucleotides: evidence for a one-step binding mechanism. *J. Biol. Chem.* 281(21):14927-14938.
- So L, Lee J, Palafox M, Mallya S, Woxland CG, Arguello M, Truitt ML, Sonenberg N, Ruggero D & Fruman DA (2016) The 4E-BP-eIF4E axis promotes rapamycin-sensitive growth and proliferation in lymphocytes. *Science signaling* 9(430):ra57.
- Sokol CL & Luster AD (2015) The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(5).
- Soliman GA (2013) The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. *Nutrients* 5(6):2231-2257.
- Soliman GA, Acosta-Jaquez HA & Fingar DC (2010) mTORC1 inhibition via rapamycin promotes triacylglycerol lipolysis and release of free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids* 45(12):1089-1100.
- Sonenberg N (2008) eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem. Cell Biol.* 86(2):178-183.

Sonenberg N & Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136(4):731-745.

Spahn CM, Jan E, Mulder A, Grassucci RA, Sarnow P & Frank J (2004) 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(4):465-475.

Spangenberg L, Shigunov P, Abud AP, Cofre AR, Stimamiglio MA, Kuligovski C, Zych J, Schittini AV, Costa AD, Rebelatto CK, Brofman PR, Goldenberg S, Correa A, Naya H & Dallagiovanna B (2013) Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem cell research* 11(2):902-912.

Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA & Willis AE (2005) Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ.* 12(6):585-591.

Spriggs KA, Bushell M & Willis AE (2010) Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40(2):228-237.

Steimle A, Autenrieth IB & Frick JS (2016) Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 306(5):290-301.

Stein M, Keshav S, Harris N & Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176(1):287-292.

Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M & Kambayashi T (1994) Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *The Journal of Experimental Medicine* 180(6):2365-2370.

Su X, Yu Y, Zhong Y, Giannopoulou EG, Hu X, Liu H, Cross JR, Ratsch G, Rice CM & Ivashkiv LB (2015) Interferon-gamma regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nat. Immunol.* 16(8):838-849.

Subramaniam KS, Tham ST, Mohamed Z, Woo YL, Mat Adenan NA & Chung I (2013) Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. *PloS one* 8(7):e68923.

Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P & Mosser DM (1998) Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J. Exp. Med.* 188(1):217-222.

Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ & Sonenberg N (2001) The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* 7(3):382-394.

Swanson BJ, Murakami M, Mitchell TC, Kappler J & Marrack P (2002) RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity* 17(5):605-615.

Tahmasebi S, Alain T, Rajasekhar VK, Zhang JP, Prager-Khoutorsky M, Khoutorsky A, Dogan Y, Gkogkas CG, Petroulakis E, Sylvestre A, Ghorbani M, Assadian S, Yamanaka Y, Vinagolu-Baur JR, Teodoro JG, Kim K, Yang XJ & Sonenberg N (2014) Multifaceted regulation of somatic cell reprogramming by mRNA translational control. *Cell stem cell* 14(5):606-616.

- Tamburini J, Green AS, Bardet V, Chapuis N, Park S, Willems L, Uzunov M, Ifrah N, Dreyfus F, Lacombe C, Mayeux P & Bouscary D (2009) Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* 114(8):1618-1627.
- Tang CH, Hsu CJ & Fong YC (2010) The CCL5/CCR5 axis promotes interleukin-6 production in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 62(12):3615-3624.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M & Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4):S1-5.
- Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, Huttlin EL, Lavoie G, Gygi SP & Roux PP (2014) Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev.* 28(4):357-371.
- Terenin IM, Andreev DE, Dmitriev SE & Shatsky IN (2013) A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent. *Nucleic Acids Res.* 41(3):1807-1816.
- Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS & Sabatini DM (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485(7396):109-113.
- Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M & Borden KL (2004) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res.* 64(23):8639-8642.
- Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N & Shatkin AJ (2011) Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2(2):277-298.
- Traver D & Zon LI (2002) Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* 108(6):731-734.
- Troutman TD, Bazan JF & Pasare C (2012) Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* 11(19):3559-3567.
- Truitt ML, Conn CS, Shi Z, Pang X, Tokuyasu T, Coady AM, Seo Y, Barna M & Ruggero D (2015) Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. *Cell* 162(1):59-71.
- Tsukiyama-Kohara K, Poulin F, Kohara M, DeMaria CT, Cheng A, Wu Z, Gingras AC, Katsume A, Elchebly M, Spiegelman BM, Harper ME, Tremblay ML & Sonenberg N (2001) Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat. Med.* 7(10):1128-1132.
- Tsukiyama-Kohara K, Vidal SM, Gingras AC, Glover TW, Hanash SM, Heng H & Sonenberg N (1996) Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2. *Genomics* 38(3):353-363.
- Tsukumo Y, Alain T, Fonseca BD, Nadon R & Sonenberg N (2016a) Translation control during prolonged mTORC1 inhibition mediated by 4E-BP3. *Nature communications* 7:11776.
- Tsukumo Y, Sonenberg N & Alain T (2016b) Transcriptional induction of 4E-BP3 prolongs translation repression. *Cell Cycle* 15(24):3325-3326.
- Udofa EA, Stringer BW, Gade P, Mahony D, Buzza MS, Kalvakolanu DV & Antalis TM (2013) The transcription factor C/EBP-beta mediates constitutive and LPS-inducible transcription of murine SerpinB2. *PLoS One* 8(3):e57855.

- Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S & Fukunaga R (2004) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol. Cell. Biol.* 24(15):6539-6549.
- Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, Franovic A, Jacob MD, Fabian MR, Payette J, Holcik M, Pause A & Lee S (2012) An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 486(7401):126-129.
- Valledor AF, Sanchez-Tillo E, Arpa L, Park JM, Caelles C, Lloberas J & Celada A (2008) Selective roles of MAPKs during the macrophage response to IFN-gamma. *J. Immunol.* 180(7):4523-4529.
- Valverde R, Edwards L & Regan L (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS J.* 275(11):2712-2726.
- Van Der Kelen K, Beyaert R, Inze D & De Veylder L (2009) Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44(4):143-168.
- Van Eden ME, Byrd MP, Sherrill KW & Lloyd RE (2004) Translation of cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (c-IAP1) mRNA is IRES mediated and regulated during cell stress. *RNA* 10(3):469-481.
- Varol C, Mildner A & Jung S (2015) Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33:643-675.
- Vashchenko G & MacGillivray RT (2013) Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients* 5(7):2289-2313.
- Vazquez-Pianzola P, Urlaub H & Rivera-Pomar R (2005) Proteomic analysis of reaper 5' untranslated region-interacting factors isolated by tobramycin affinity-selection reveals a role for La antigen in reaper mRNA translation. *Proteomics* 5(6):1645-1655.
- Verhelst J, Hulpiau P & Saelens X (2013) Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77(4):551-566.
- Visvanathan KV & Goodbourn S (1989) Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. *The EMBO Journal* 8(4):1129-1138.
- Vockerodt M, Pinkert D, Smola-Hess S, Michels A, Ransohoff RM, Tesch H & Kube D (2005) The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation. *Int J Cancer* 114(4):598-605.
- von der Haar T, Gross JD, Wagner G & McCarthy JE (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11(6):503-511.
- Vyas K, Chaudhuri S, Leaman DW, Komar AA, Musiyenko A, Barik S & Mazumder B (2009) Genome-wide polysome profiling reveals an inflammation-responsive posttranscriptional operon in gamma interferon-activated monocytes. *Mol. Cell. Biol.* 29(2):458-470.
- Walsh D & Mohr I (2004) Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev.* 18(6):660-672.
- Walsh D & Mohr I (2011) Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(12):860-875.

- Walters B & Thompson SR (2016) Cap-Independent Translational Control of Carcinogenesis. *Front. Oncol.* 6:128.
- Wang L, Lawrence JC, Jr., Sturgill TW & Harris TE (2009) Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity is associated with phosphorylation of raptor by mTOR. *J. Biol. Chem.* 284(22):14693-14697.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR & Proud CG (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20(16):4370-4379.
- Wang X & Proud CG (2008) A novel mechanism for the control of translation initiation by amino acids, mediated by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2B. *Mol. Cell. Biol.* 28(5):1429-1442.
- Wapinski O & Chang HY (2011) Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.* 21(6):354-361.
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG & Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16(8):1909-1920.
- Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Horl WH, Hengstschlager M, Muller M & Saemann MD (2008) The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 29(4):565-577.
- Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, Rosner M, Zlabinger GJ, Hengstschlager M, Muller M, Horl WH & Saemann MD (2011) Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood* 117(16):4273-4283.
- Weichhart T & Saemann MD (2009) The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol.* 30(5):218-226.
- Weingarten-Gabbay S, Elias-Kirma S, Nir R, Gritsenko AA, Stern-Ginossar N, Yakhini Z, Weinberger A & Segal E (2016) Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* 351(6270).
- Weingarten-Gabbay S & Segal E (2016) Toward a systematic understanding of translational regulatory elements in human and viruses. *RNA Biol.* 13(10):927-933.
- Weinlich S, Huttelmaier S, Schierhorn A, Behrens SE, Ostareck-Lederer A & Ostareck DH (2009) IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 15(8):1528-1542.
- Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Teruya-Feldstein J, Pelletier J & Lowe SW (2007) Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev.* 21(24):3232-3237.
- Wethmar K, Barbosa-Silva A, Andrade-Navarro MA & Leutz A (2014) uORFdb--a comprehensive literature database on eukaryotic uORF biology. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D60-67.
- Wightman SC, Uppal A, Pitroda SP, Ganai S, Burnette B, Stack M, Oshima G, Khan S, Huang X, Posner MC, Weichselbaum RR & Khodarev NN (2015) Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome. *Br. J. Cancer* 113(2):327-335.

Willcocks MM, Locker N, Gomwalk Z, Royall E, Bakhshesh M, Belsham GJ, Idamakanti N, Burroughs KD, Reddy PS, Hallenbeck PL & Roberts LO (2011) Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES. *J. Virol.* 85(9):4452-4461.

William M, Leroux L-P, Chaparro V, Lorent J, Graber TE, M'Boutchou M-N, Charpentier T, Fabié A, Dozois CM, Stäger S, van Kempen LC, Alain T, Larsson O & Jaramillo M (2018a) eIF4E-Binding Proteins 1 and 2 Limit Macrophage Anti-Inflammatory Responses through Translational Repression of IL-10 and Cyclooxygenase-2. *The Journal of Immunology* 200(12):4102-4116.

Williams L, Bradley L, Smith A & Foxwell B (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J. Immunol.* 172(1):567-576.

Workenhe ST, Simmons G, Pol JG, Lichty BD, Halford WP & Mossman KL (2014) Immunogenic HSV-mediated oncolysis shapes the antitumor immune response and contributes to therapeutic efficacy. *Mol. Ther.* 22(1):123-131.

Wullschleger S, Loewith R & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471-484.

Wynn TA, Chawla A & Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496(7446):445-455.

Xia CQ, Peng R, Chernatynskaya AV, Yuan L, Carter C, Valentine J, Sobel E, Atkinson MA & Clare-Salzler MJ (2014) Increased IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in human Th1-mediated type 1 diabetes: pDCs augment Th1 responses through IFN-alpha production. *J. Immunol.* 193(3):1024-1034.

Xu H, Zhu J, Smith S, Foldi J, Zhao B, Chung AY, Outtz H, Kitajewski J, Shi C, Weber S, Saftig P, Li Y, Ozato K, Blobel CP, Ivashkiv LB & Hu X (2012a) Notch-RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nat Immunol* 13(7):642-650.

Xu H, Zhu J, Smith S, Foldi J, Zhao B, Chung AY, Outtz H, Kitajewski J, Shi C, Weber S, Saftig P, Li Y, Ozato K, Blobel CP, Ivashkiv LB & Hu X (2012b) Notch, RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nature Immunology* 13:642.

Xue S, Tian S, Fujii K, Kladwang W, Das R & Barna M (2015) RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* 517(7532):33-38.

Xue Y, Zhou Y, Wu T, Zhu T, Ji X, Kwon YS, Zhang C, Yeo G, Black DL, Sun H, Fu XD & Zhang Y (2009) Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol. Cell* 36(6):996-1006.

Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N & Oka Y (2008) ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 7(3):269-276.

- Yamashita A & Takeuchi O (2017) Translational control of mRNAs by 3'-Untranslated region binding proteins. *BMB reports* 50(4):194-200.
- Yanagiya A, Suyama E, Adachi H, Svitkin YV, Aza-Blanc P, Imataka H, Mikami S, Martineau Y, Ronai ZA & Sonenberg N (2012) Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol. Cell* 46(6):847-858.
- Yang DQ & Kastan MB (2000) Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat. Cell Biol.* 2(12):893-898.
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ & Pavletich NP (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497(7448):217-223.
- Yang RB, Mark MR, Gurney AL & Godowski PJ (1999) Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163(2):639-643.
- Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D & Koumenis C (2010) The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 29(12):2082-2096.
- Yi W, Gupta S, Ricker E, Manni M, Jessberger R, Chinenov Y, Molina H & Pernis AB (2017) The mTORC1-4E-BP-eIF4E axis controls de novo Bcl6 protein synthesis in T cells and systemic autoimmunity. *Nature communications* 8(1):254.
- Zakaria C, Sean P, Hoang HD, Leroux LP, Watson M, Workenhe ST, Hearnden J, Pearl D, Truong VT, Robichaud N, Yanagiya A, Tahmasebi S, Jafarnejad SM, Jia JJ, Pelin A, Diallo JS, Le Boeuf F, Bell JC, Mossman KL, Graber TE, Jaramillo M, Sonenberg N & Alain T (2018) Active-site mTOR inhibitors augment HSV1-dICP0 infection in cancer cells via dysregulated eIF4E/4E-BP axis. *PLoS Pathog.* 14(8):e1007264.
- Zhang L & Wang CC (2014) Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 13(2):138-152.
- Zhang W, Dunkle JA & Cate JH (2009) Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science* 325(5943):1014-1017.
- Zhang X, Yue P, Page BD, Li T, Zhao W, Namanja AT, Paladino D, Zhao J, Chen Y, Gunning PT & Turkson J (2012) Orally bioavailable small-molecule inhibitor of transcription factor Stat3 regresses human breast and lung cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(24):9623-9628.
- Zhou H, Wu J, Wang T, Zhang X & Liu D (2016a) CXCL10/CXCR3 axis promotes the invasion of gastric cancer via PI3K/AKT pathway-dependent MMPs production. *Biomed. Pharmacother.* 82:479-488.
- Zhu L, Yang T, Li L, Sun L, Hou Y, Hu X, Zhang L, Tian H, Zhao Q, Peng J, Zhang H, Wang R, Yang Z, Zhang L & Zhao Y (2014) TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease. *Nature communications* 5:4696.
- Zimmer SG, DeBenedetti A & Graff JR (2000) Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 20(3A):1343-1351.
- Zlotnik A & Yoshie O (2012) The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36(5):705-716.

Zoncu R, Efeyan A & Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12(1):21-35.

Zumwalt TJ, Arnold M, Goel A & Boland CR (2015) Active secretion of CXCL10 and CCL5 from colorectal cancer microenvironments associates with GranzymeB⁺ CD8⁺ T-cell infiltration. *Oncotarget* 6(5):2981-2991.