



HAL
open science

Implication des protéines ribosomiques dans le processus de transformation induit par l'oncogène v-erbA

Anh Thu Nguyen-Lefebvre

► To cite this version:

Anh Thu Nguyen-Lefebvre. Implication des protéines ribosomiques dans le processus de transformation induit par l'oncogène v-erbA. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10058 . tel-01127412

HAL Id: tel-01127412

<https://theses.hal.science/tel-01127412>

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

THESE

présentée devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention du DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 07 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 04 Mai 2012

par

Anh Thu NGUYEN-LEFEBVRE

Implication des protéines ribosomiques dans le processus de transformation induit par l'oncogène *v-erbA*

Directeurs de thèse : Olivier GANDRILLON et Sandrine GONIN-GIRAUD

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires (CG ϕ MC), CNRS - UMR 5534.
Bâtiment Grégor Mendel, 16 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex. France.

École Doctorale (ED340) Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire.

JURY :

Mme. Lydie DA COSTA

Mme. Isabelle DUSANTER-FOURT

Mme. Sandrine GIRAUD

Mme. Sylvie MAZOYER

M. Olivier GANDRILLON

M. Pierre-Emmanuel GLEIZES

Rapporteuse

Examinatrice

Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Rapporteur

THESE

présentée devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention du DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 07 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 04 Mai 2012

par

Anh Thu NGUYEN-LEFEBVRE

Implication des protéines ribosomiques dans le processus de transformation induit par l'oncogène *v-erbA*

Directeurs de thèse : Olivier GANDRILLON et Sandrine GONIN-GIRAUD

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires (CG ϕ MC), CNRS - UMR 5534.
Bâtiment Grégor Mendel, 16 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex. France.

École Doctorale (ED340) Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire.

JURY :

Mme. Lydie DA COSTA

Mme. Isabelle DUSANTER-FOURT

Mme. Sandrine GIRAUD

Mme. Sylvie MAZOYER

M. Olivier GANDRILLON

M. Pierre-Emmanuel GLEIZES

Rapporteuse

Examinatrice

Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD ~ LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon
Sud–Charles Mérieux

Administrateur provisoire : M. le Professeur
G. KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche
en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme la Professeure

V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord les membres de mon jury de thèse, Pierre-Emmanuel Gleizes et Lydie Da Costa pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail de thèse, ainsi que Sylvie Mazoyer et Isabelle Dusanter-Fourt pour avoir accepté de faire partie du jury.

J'ai eu beaucoup de mal à écrire ces remerciements car je sais que mon aventure avec l'équipe *BM2A* s'arrête là, après cinq années passées au sein de cette merveilleuse équipe.

Je voudrais particulièrement dire un très grand merci à Olivier Gandrillon pour m'avoir intégrée dans son équipe en 2007 dans le cadre de mon Master 2 Recherche et pour m'avoir permis de poursuivre en thèse sous sa direction. Olivier s'est montré durant toutes ces années un chef exceptionnel : malgré son emploi du temps très chargé, il a toujours trouvé du temps pour m'aider à résoudre les problèmes scientifiques que j'ai rencontrés au cours de ma thèse. Un très grand merci pour sa confiance dans mes travaux, pour son encouragement et son soutien quotidiens, et pour ses conseils qui m'ont permis et qui continueront à me permettre d'avancer dans ma vie professionnelle.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Sandrine Gonin-Giraud pour son encadrement depuis mon arrivée dans l'équipe. Sans elle, je ne pense pas que j'aurais eu la détermination de préparer cette thèse. Elle a été une excellente directrice de thèse, à la fois sur le plan professionnel que personnel, je ne pouvais pas mieux espérer comme directrice de thèse. Grâce à elle, j'ai appris toute la rigueur, l'anticipation, les remises en questions et les réflexions nécessaires pour travailler dans le monde de la recherche. Tout ce dont je suis capable de faire aujourd'hui, c'est à elle que je le dois. Je la remercie de tout mon cœur pour le soutien, la disponibilité et la gentillesse qu'elle m'a accordés durant toutes ces années.

Je souhaite également remercier Jean-Jacques Madjar pour toute la rigueur à la fois sur plan expérimental que sur le plan linguistique (un être humain et non un humain). Grâce à lui, j'ai appris à aimer travailler avec les protéines, et particulièrement avec les protéines ribosomiques. Il a contribué grandement à mon côté « maniaque » dans les expériences scientifiques, ainsi qu'à la recherche inaccessible de la perfection. J'ai été très ravie et très honorée d'avoir eu cette chance inestimable de travailler avec Jean-Jacques durant mon M2 et ma thèse.

Je remercie aussi les membres actuels et passés de l'équipe BM2A pour les bons moments passés ensemble. Merci à José pour ton aide en analyse statistique ainsi que pour les discussions scientifiques et « autres » que nous avons eues durant ma thèse. Merci à Valérie, Laetitia, Ophélie, Emmanuelle, Gaël le Grand, Gaël le Petit et Mimoun pour les fous rires et les « pétages de plomb » qui rendaient la vie au laboratoire et le travail plus agréables quotidiennement.

Je désire remercier aussi l'ensemble des membres du CGPM pour la bonne ambiance, les échanges scientifiques et leur disponibilité à m'aider et à me conseiller au cours de mon passage dans ce centre.

Un grand merci également à mes amis, spécialement à Camille et Laure, et à mon mari, Brice, qui m'ont soutenue et qui ont supporté mes caprices et mes sauts d'humeur durant les périodes difficiles de ma thèse.

Enfin, je voudrais exprimer toute ma gratitude envers mes grands-parents paternels et à mon père qui m'ont offert cette opportunité de venir en France et de faire des études supérieures.

Table des matières

Liste des abréviations	p 9
Liste des figures et tableaux	p 11
Préambule	p 14
<hr/>	
CHAPITRE I : Introduction bibliographique	p 16
Partie I : Les cellules souches hématopoïétiques, les T2EC et l'oncogène <i>v-erbA</i>	p 17
<u>A/ Les cellules souches embryonnaires et adultes</u>	p 18
A.1/ Les cellules souches embryonnaires	p 18
A.2/ Les cellules souches adultes : exemple des cellules souches hématopoïétiques (CSH)	p 19
<u>B/ Les T2EC : un modèle d'étude de l'auto-renouvellement physiologique et pathologique, et de différenciation</u>	p 22
B.1/ Les T2EC : modèle d'auto-renouvellement et de différenciation physiologiques	p 22
B.2/ Les T2EC : modèle d'auto-renouvellement pathologique	p 23
<u>C/ L'oncogène <i>v-erbA</i></u>	p 24
C.1/ Le gène cellulaire : <i>c-erbAα</i>	p 24
C.2/ Les caractéristiques de l'oncogène <i>v-erbA</i>	p 24
C.3/ Les effets de l'oncogène <i>v-erbA</i>	p 26
Partie II : La biogenèse des ribosomes	p 28
<u>A/ Les ARN ribosomiques (ARNr)</u>	p 30
A.1/ La transcription et la maturation du pré-ARNr 45S pour former les trois ARNr 28S, 18S et 5,8S	p 30
A.2/ La transcription et la maturation de l'ARNr 5S	p 33
A.3/ Les modifications post-transcriptionnelles des ARNr	p 34

<u>B/ Les protéines ribosomiques (r-protéines)</u>	p 36
B.1/ Les gènes codant les r-protéines	p 37
B.2/ Les r-protéines, leur importation dans le noyau et leurs modifications post-traductionnelles	p 40
<u>C/ L'assemblage et le transport des sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme</u>	p 44
C.1/ La maturation des particules ribosomiques pré-40S et pré-60S dans le noyau	p 45
C.2/ L'exportation des deux particules ribosomiques pré-40S et pré-60S vers le cytoplasme et leurs maturations cytoplasmiques	p 48
C.3/ L'association des ARNr et des r-protéines	p 50
<u>Partie III : Ribosomes, cancers et « ribosomopathies »</u>	p 53
<u>Fonctions extra-ribosomiques et Pathologies</u>	
<u>A/ Ribosomes, cancers et « ribosomopathies »</u>	p 54
A.1/ Ribosomes et cancers	p 54
A.2/ Les « ribosomopathies »	p 64
<u>B/ Fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques et pathologies</u>	p 74
B.1/ Les fonctions extra-ribosomiques des r-protéines	p 75
B.2/ Pathologies associées aux fonctions extra-ribosomiques	p 80

CHAPITRE II : Résultats	p 86
Contexte scientifique, Objectifs de la thèse et Organisation des résultats	p 87
<u>Partie I : Approche gène à gène : Analyse du taux des protéines RPS3 et RPS3a</u>	p 90
<u>A/ Généralités sur les protéines RPS3 et RPS3a</u>	p 91
<u>B/ Résultats</u>	p 91
<u>Partie II : Identification des protéines ribosomiques chez <i>Gallus gallus</i></u>	p 93

<u>A/ Identification des r-protéines par électrophorèse bidimensionnelle associée à de la spectrométrie de mass</u>	p 94
A.1/Purification des ribosomes et extraction des r-protéines	p 95
A.2/Séparation des r-protéines par électrophorèse bidimensionnelle	p 96
A.3/Identification des r-protéines par spectrométrie de masse	p 97
<u>B/ Identification des r-prtoéines par Tandem Mass Tag Spectrométrie</u>	p 97
<u>C/ Nombre de r-protéines identifiées</u>	p 98
<u>Article 1 : Identification of human, rat and chicken ribosomal proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry</u>	p 99
<u>Partie III : Analyse de la composition des ribosomes en r-protéines et étude de la protéine RPL11</u>	p 119
<u>A/ Détermination de la quantité de ribosomes sous l'effet de l'oncogène <i>v-erbA</i></u>	p 120
<u>B/ La 2D-DIGE</u>	p 121
B.1/Technique de la 2D-DIGE	p 121
B.2/Analyse de la composition des ribosomes sous l'effet de <i>v-erbA</i>	p 122
<u>C/ Démonstration de l'existence de ribosomes dépourvus de RPL11</u>	p 123
C.1/L'immunoprécipitation des ribosomes	p 123
C.2/Séparation des ribosomes contenant RPL11 des ribosomes dépourvus de RPL11 dans les T2EC exprimant <i>v-erbA</i>	p 126
<u>D/ Analyse de la fonction biologique de la protéine RPL11</u>	p 127
D.1/Analyse du taux de la protéine RPL11 dans les T2EC exprimant <i>v-erbA</i> ou <i>S61G</i>	p 128
D.2/Etude de la foncton biologique de la protéine RPL11 par inhibition transitoire de son expression	p 129
D.3/Etude de la foncton biologique de la protéine RPL11 par sur-expression transitoire de son expression	p 130
<u>Partie IV : Ribosomes non conventionnels : traduction d'ARNm spécifiques</u>	p 133
<u>Matériels & Méthodes</u>	p 137

CHAPITRE III : Discussion & Conclusion	p 149
<u>A/ Composition variable des ribosomes en protéines ribosomiques</u>	p 150
<u>B/ La protéine RPL11</u>	p 153
B.1/La protéine RPL11 et les ribosomes	p 154
B.2/La protéine RPL11 et des fonctions extra-ribosomiques	p 155
<u>C/ Conclusion</u>	p 158

Références	p 159
-------------------	-------

Résumé en français et en anglais	p 186
---	-------

Liste des abréviations

2D-DIGE : Two-Dimensional Difference In Gel Electrophoresis

AEV : Avian Erythroblastosis Virus

AKT : Protein Kinase B or Serine/Threonine protein kinase

ARNr : Ribosomal RNA

ASC : Adult Stem Cell

CEF : Chicken Embryo Fibroblast

CFU-E: Forming Unit-Erythroid

CFU-S : Colony Forming Unit-Spleen

CHH : Cartilage-Hair Hypoplasia

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

DBA : Diamond-Blackfan Anemia

DC : Dyskeratosis Congenita

DKC1: Dyskerin

ES : Embryo Stem Cell

ETS : External Transcribed Spacer

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

IRES : Internal Ribosome Entry Site

ITS : Internal Transcribed Spacer

(m)TOR : (Mammalian) Target Of Rapamycin

MDM2 : Mouse Double Minutes 2

NES : Nuclear Export Sequence

NLS : Nuclear Localization Signal

NOR : Nucleolus Organizer Region

NPC : Nuclear Pore Complex

NPM1 : Nucleophosmin

p14Arf : The 14 kDa protein of Alternative Reading Frame

p70S6K : The 70 kDa ribosomal protein S6 kinase

PI3K : PhosphoInositol-3-Kinase

Pol I, II & III : RNA Polymerases I, II and III

pRB : Retinoblastoma Protein

PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

RA : Retinoic Acid

RAR : Retinoic Acid Receptor

RARE : Retinoic Acid Response Element

RPL : Ribosomal Protein of the Large Subunit

r-protein : ribosomal protein

RPS : Ribosomal Protein of the Small Subunit

RT-qPCR : Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction

RXR : Retinoid X Receptor

S(B)DS : Shwachman-(Boocock)-Diamond Syndrome

SAGE : Serial Analysis Gene Expression

SL1: Selectivity Factor 1

snoRNP : Small Nucleolar RiboNucleoprotein Particle

T2EC : TGF- α /TGF- β induced erythrocytic cells

T3 : Thyroid hormone T3

TGF- α : Transforming Growth Factor alpha

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TIF: Transcription Initiation Factor

TMT : Tandem Mass Tag

TOP : Tract of OligoPyrimidine

p53 : Tumor Protein 53

TR: Thyroid hormone T3 Receptor

TRE : Thyroid hormone T3 Response Element

TRRAP : Transformation/Transcription domain Associated-Protein

UBF : Upstream Binding Factor

UTR : Untranslated Region

Liste des figures et tableaux

Figure 1	L'hématopoïèse
Figure 2	Le modèle cellulaire T2EC (TGF- α /TGF- β induced erythrocytic cells)
Figure 3	Contrôle de la transcription des gènes cibles du récepteur à l'hormone thyroïdienne T3 en association avec les co-activateurs et les co-répresseurs
Figure 4	c-ErbA α , v-ErbA et S61G
Figure 5	Cartographie des gènes codant les ARNr et les r-protéines composant le ribosome humain
Figure 6	Organisation structurale du gène codant le pré-ARNr 45S chez la souris
Figure 7	Formation du complexe de pré-initiation de la transcription des gènes d'ARNr 45S
Figure 8	Clivage du pré-ARNr 45S dans les cellules humaines (HeLa) pour former les trois ARNr 28S, 18S et 5,8S
Figure 9	Transcription et maturation de l'ARNr 5S
Figure 10	Pseudo-uridylation et 2'-O-méthylations des pré-ARNr
Figure 11	La structure du nucléole
Figure 12	Structure cristallographique au rayon X du ribosome eucaryote 80S (<i>S. cerevisiae</i>)
Figure 13	Biogenèse des ribosomes chez <i>S. cerevisiae</i>
Figure 14	La voie de signalisation mTORC1
Figure 15	La voie de signalisation TOR contrôle l'activité des trois ARN Polymérase chez <i>S. cerevisiae</i>
Figure 16	Régulation de la progression du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire et de la biogenèse des ribosomes par la protéine RB
Figure 17	Maturation du pré-ARN ribosomique chez l'être humain et les fonctions potentielles des r-protéines dans la DBA
Figure 18	Un modèle des mécanismes dépendants de p53 dans le syndrome de 5q-

Figure 19	Analyse du taux d'ARNm de <i>RPS3</i> , <i>RPS3a</i> , <i>RPS9</i> et <i>RPL13</i> par PCR en temps réel
Figure 20	Alignement des séquences des protéines ribosomiques S3 et S3a chez <i>Gallus gallus</i> , <i>Homo sapiens</i> et <i>Mus musculus</i>
Figure 21	Analyse du taux de la protéine ribosomique S3 dans la fraction des protéines totales
Figure 22	Analyse du taux de la protéine ribosomique S3a dans la fraction des protéines totales
Figure 23	Protocole de purification des ribosomes et d'extraction des r-protéines
Figure 24	Triplex Mass Tag
Figure 25	Quantification des ribosomes provenant de T2EC exprimant <i>v-erbA</i> ou <i>S61G</i>
Figure 26	2D-DIGE (Two-Dimensionnal Difference In Gel Electrophoresis)
Figure 27	Analyse de la composition des ribosomes en r-protéines par 2D-DIGE
Figure 28	Analyse de la composition des ribosomes en r-protéines par 2D-DIGE (bis)
Figure 29	Différentes étapes de l'immunoprécipitation permettant de séparer les ribosomes constitués de la protéine ribosomique L11 et dépourvus de la protéine ribosomique L11
Figure 30	Mise au point des conditions d'immunoprécipitation
Figure 31	Deux hypothèses testées par des expériences d'immunoprécipitation
Figure 32	Analyse des fractions obtenues après immunoprécipitation des ribosomes et des sous-unités ribosomiques avec un anticorps dirigé contre la protéine ribosomique L11 à partir de T2EC exprimant <i>v-erbA</i> ou <i>S61G</i>
Figure 33	Analyse du taux de la protéine ribosomique L11 dans la fraction des protéines totales
Figure 34	Vecteurs permettant l'inhibition et la sur-expression de <i>RPL11</i> dans les T2EC
Figure 35	Analyse du taux d'ARNm de <i>RPL11</i> dans les T2EC transfectées avec des vecteurs portant les shRNA dirigés contre <i>RPL11</i> ou contre la <i>luciférase</i> (contrôle) par PCR quantitative
Figure 36	Etude de la sur-expression de <i>RPL11</i> dans les T2EC
Figure 37	Modèle de maturation de la sous-unité 60S chez <i>S. cerevisiae</i>

Figure 38	Modèle expliquant l'effet biologique observé dans les T2EC exprimant <i>v-erbA</i>
Tableau 1	Homologies de séquences des protéines ribosomiques du rat et de l'être humain
Tableau 2	Pathologies liées à la mutation de gènes codant les protéines ribosomiques ou des facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes
Tableau 3	Protéines ribosomiques avec des fonctions extra-ribosomiques
Tableau 4	Protéines ribosomiques avec des fonctions extra-ribosomiques impliquées dans les régulations de la transcription et de la traduction des gènes
Tableau 5	Cancers associés à une sur-expression des protéines ribosomiques
Tableau 6	Identification des protéines avec un niveau d'expression différentielle entre les T2EC exprimant <i>v-erbA</i> ou <i>S61G</i>

PRÉAMBULE

L'auto-renouvellement est une propriété fondatrice du concept des cellules souches. Il s'agit de la capacité d'une cellule à se diviser sans acquérir de marqueurs caractéristiques de la différenciation. Les travaux de recherche de notre équipe ont pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le processus d'auto-renouvellement de progéniteurs érythrocytaires ainsi que de leurs dérégulations lors de processus leucémogènes. Afin d'étudier plus spécifiquement les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus, un modèle de progéniteurs érythrocytaires aviaires, non modifiés génétiquement, appelés T2EC (TGF- α /TGF- β induced Erythrocytic Cells), a été développé au sein de l'équipe. Ces cellules peuvent être transformées par l'oncogène *v-erbA*, une forme modifiée du récepteur à l'hormone thyroïdienne T3, capable de bloquer les T2EC en état d'auto-renouvellement.

Grâce à la technique SAGE (Serial of Gene Expression) et par PCR quantitative en temps réel, l'équipe a identifié de nouveaux gènes cibles de *v-erbA* potentiellement impliqués dans son activité transformante. Parmi ces gènes cibles, certains gènes de protéines ribosomiques, mais pas tous, voient leur expression réprimée sous l'effet de *v-erbA* : c'est le cas de *RPS3*, *RPS3a*, *RPS9* et *RPL13*. Sur la base de ces données, mon travail de thèse a consisté à déterminer d'une part si l'oncogène *v-erbA* pouvait induire aussi des variations du taux de certaines protéines ribosomiques, en particulier celles associées aux ribosomes, et d'autre part, à initier l'étude des conséquences physiologiques de ces modifications, qui vient juste de démarrer.

Ce manuscrit sera composé de trois chapitres. Le premier chapitre de ce mémoire sera consacré à une introduction bibliographique sous-divisée en trois parties : je commencerai par décrire très brièvement notre modèle d'étude, les T2EC, ainsi que l'oncogène *v-erbA*. Ensuite, je m'attarderai davantage sur la biogenèse des ribosomes. Et finalement, je développerai les pathologies liées à un défaut des ribosomes ou des fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques.

Le second chapitre de mon manuscrit sera consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus au cours de ma thèse. Les perspectives de mon travail, tout en tenant compte des connaissances actuelles, seront discutées dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Chapitre I

Introduction bibliographique

PARTIE I

Les cellules souches hématopoïétiques, les T2EC et l'oncogène *v-erbA*

La question de la définition à donner aux cellules souches fait débat depuis plus de 30 ans. Cependant, nous pouvons définir les cellules souches comme étant des cellules présentant une capacité d'auto-renouvellement illimité ou prolongé. Ces cellules peuvent donner naissance à différentes lignées de cellules fortement différenciées (Watt and Hogan, 2000). Les cellules souches jouent un rôle essentiel, dans un premier temps dans l'édification de l'embryon, et dans un deuxième temps en tant que réservoir permanent de cellules capables de renouveler les tissus chez l'adulte. Il existe ainsi des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes.

A/ Les cellules souches embryonnaires et adultes

A.1/ Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ES) ont été isolées en 1981 à partir de la masse interne des blastocystes par Evans et Kaufman (Evans and Kaufman, 1981). Elles sont pluripotentes, c'est-à-dire, qu'elles sont individuellement capables de former les trois feuillets embryonnaires (le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme), et de donner naissance à des cellules de la lignée germinale. Des études *in vitro* montrent que ces cellules peuvent à la fois s'auto-renouveler et se différencier selon la composition des facteurs de croissance du milieu de culture (Wobus and Boheler, 2005). En conséquence, elles sont capables de générer des cellules souches multipotentes et monopotentes. Les cellules souches multipotentes sont définies comme étant des cellules souches adultes, déjà engagées dans une voie de différenciation, et qui ont donc un potentiel de se différencier plus restreint que celui des ES ; en effet, elles ne peuvent plus donner naissance à un individu entier, mais elles sont à l'origine de diverses populations de cellules différenciées (par exemple des cellules souches hématopoïétiques). Les cellules souches monopotentes ne sont

capables de générer qu'une seule population de cellules différenciées, souvent elles sont appelées des progéniteurs.

Le caractère pluripotent des ES est maintenu en culture *in vitro*, grâce à l'activation d'une variété de facteurs de transcription (Yamanaka et al., 2008) tels que Oct4, Nanog et Sox2 dans ces cellules, mais aussi par des signaux extrinsèques (BMPs, Wnts), provenant du sérum de veau fœtal ou par ajout dans le milieu de culture d'un supplément comme le facteur inhibiteur de leucémie (LIF) (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Il a été montré que l'absence des membres de la famille des interleukines 6 (IL-6), l'absence d'une sous-couche nutritive formée essentiellement de fibroblastes embryonnaires de souris, ou l'inactivation de STAT3 induisent une différenciation spontanée des ES. La différenciation des ES se traduit par la formation d'agrégats de cellules, appelés des corps embryoïdes, qui vont poursuivre leur différenciation et leur maturation pour former une variété de lignées cellulaires différenciées comme des cellules musculaires, hématopoïétiques, endothéliales, pancréatiques, hépatiques, lipidiques, cartilagineuses, ou encore des cellules neurales et gliales (Yamanaka et al., 2008).

A.2/ Les cellules souches adultes : exemple des cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Chez l'adulte, il existe des cellules souches multipotentes, appelées des cellules souches adultes (ASC), qui sont présentes dans de nombreux tissus, comme la moelle osseuse, le muscle, le foie, le pancréas, le cœur, les glandes salivaires, la peau, etc (Prentice, 2004). De nombreux termes ont été attribués à ces cellules : les cellules souches tissulaires, les cellules souches somatiques ou encore les cellules souches post-natales. L'exemple des cellules souches hématopoïétiques sera développé très brièvement ci-dessous, le modèle cellulaire utilisé au sein de notre équipe étant des progéniteurs érythrocytaires monopotents.

A.2.1/ Les cellules souches hématopoïétiques

En 1909, Alexander Maximow, médecin militaire à Saint-Petersburg, était le premier à suggérer l'existence des cellules souches hématopoïétiques (HSC) : ces cellules avaient une morphologie proche de celle des lymphocytes et étaient capables de migrer *via* le sang pour atteindre des niches hématopoïétiques qui leur permettaient de proliférer et de se différencier en lignées spécifiques (Maximow, 1909). Dans les années 1960, Till et McCulloch ont démontré l'existence des cellules souches hématopoïétiques parmi les cellules de la moelle osseuse (Till and McCulloch, 1963) : des souris ont été irradiées avec une dose de 1000 rads induisant d'une part une destruction de leur tissu hématopoïétique et d'autre part une aplasie médullaire mortelle en absence de greffe de la moelle osseuse. L'injection d'extraits de moelle osseuse de souris syngéniques, c'est-à-dire immunologiquement compatibles, ont conduit au bout d'une semaine à la formation de colonies macroscopiques, contenant des cellules de différentes lignées cellulaires, dans la rate. Une colonie observée correspondait à une cellule souche injectée. Ces colonies ont été appelées CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen). De nos jours, les HSC sont définies comme étant des cellules multipotentes, clonogéniques qui sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en diverses lignées hématopoïétiques : les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes. Après la naissance, les HSC constituent un très petit réservoir de cellules, variant entre 0,05% à 0,5% des cellules de la moelle osseuse et restent à l'état quiescent. Ces cellules vont permettre, à travers le processus appelé hématopoïèse, la production des cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu.

A.2.2/ L'hématopoïèse

L'hématopoïèse désigne l'ensemble des mécanismes qui assure le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines. Il s'agit d'un système cellulaire complexe qui aboutit à ajuster très précisément la production cellulaire aux conditions physiologiques et aux différentes agressions extérieures de l'organisme. L'hématopoïèse assure ainsi une production d'environ 10^{13} cellules

sanguines chaque jour. Ces cellules sanguines peuvent être classées en deux grandes catégories ([Figure 1](#)) : les cellules lymphoïdes (les lymphocytes T, B et les lymphocytes NK (Natural Killer)) et les cellules myéloïdes (les granulocytes, les monocytes, les érythrocytes et les mégacaryocytes). Toutes ces cellules ont une durée de vie limitée qui varie de quelques heures pour les granulocytes, à 120 jours pour les érythrocytes, et jusqu'à plusieurs années pour les lymphocytes T mémoires (Gunsilius et al., 2001). La génération des cellules sanguines matures à partir des HSC multipotentes implique un processus de différenciation finement régulé en passant par des étapes d'engagement dans un lignage cellulaire spécifique, une différenciation terminale des progéniteurs, ainsi qu'un arrêt de croissance cellulaire et une apoptose. La différenciation d'une HSC dépend fortement de la nature des facteurs stimulants sécrétés par son environnement qui est composé de cellules stromales, de molécules de la matrice extracellulaire, et de cytokines régulatrices solubles comme les facteurs de croissance et de différenciation.

Le siège de l'hématopoïèse varie au cours du temps. L'hématopoïèse foetale s'effectue au cours de la vie intra-utérine et elle commence initialement au niveau du sac vitellin jusqu'au 2^{ème} mois, et au bout de la 6^{ème} et 7^{ème} semaines de gestation, les premières cellules hématopoïétiques colonisent le foie et la rate pour produire essentiellement, au cours du premier trimestre, des érythroblastes. Elle devient médullaire à partir du 4^{ème} mois et coïncide avec le développement des ébauches osseuses. Après la naissance, la production normale des cellules sanguines est exclusivement faite par les HSC localisées dans la moelle osseuse. Jusqu'à l'âge de 5 ans, tous les os ont une activité hématopoïétique. Ensuite, cette activité va se limiter progressivement au niveau des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres et os iliaques).

L'utilisation des HSC pour traiter les maladies liées à des défauts de la moelle osseuse, comme l'anémie aplastique, a été initiée par Lorenz, Congdon et Thomas dans les années 1950 (Congdon, 1957; Lorenz et al., 1951; Thomas et al., 1957). De nos jours, la transplantation des HSC est utilisée chez les patients atteints de maladies malignes (leucémies) ayant subis une chimio-radiothérapie pour permettre une

reconstitution hématopoïétique, ou atteints de maladies liées à un défaut du système immunitaire.

B/ Les T2EC : un modèle d'étude de l'auto-renouvellement physiologique et pathologique, et de différenciation

B.1/ Les T2EC : modèle d'auto-renouvellement et de différenciation physiologiques

Les études menées dans l'équipe de recherche d'Olivier Gandrillon utilise un modèle cellulaire tout à fait original constitué de progéniteurs érythrocytaires aviaires issus de cultures primaires et non altérées génétiquement. Ces cellules appelées T2EC pour TGF- α /TGF- β induced erythrocytic cells (Gandrillon et al., 1999) sont originaires de la moelle osseuse d'embryons de poulet âgés de 19 jours. Elles peuvent être maintenues *ex vivo* dans un état d'auto-renouvellement sous une combinaison de facteurs de croissance (TGF- α , TGF- β et Dexaméthasone) pendant environ 4 semaines. Au-delà, ces cellules étant des cellules primaires, elles vont arrêter de proliférer et mourir, probablement à cause de la sénescence cellulaire. Ces cellules présentent une grande capacité à s'auto-renouveler dans le milieu de culture appelé LM1 et forment des grappes de cellules réfringentes ([Figure 2](#)). D'autre part, les T2EC peuvent être basculées dans un programme de différenciation terminale pour devenir des érythrocytes matures, en remplaçant les facteurs de croissance cités ci-dessus, par de l'insuline et du sérum de poulet anémié (ACS : Anemic Chicken Serum (Gandrillon and Samarut, 1998)). Trois jours après l'induction de la différenciation des T2EC, certaines cellules montrent une

morphologie caractéristique des érythrocytes normaux, à savoir la forme d'un disque biconcave. Au bout de six jours, toutes les T2EC sont différenciées en une population cellulaire présentant une morphologie d'érythrocytes et expriment des marqueurs spécifiques des érythrocytes matures (coloration positive à la benzidine, expression du gène de la β -globine et de l'antigène JS4 à leur surface membranaire).

B.2/ Les T2EC : modèle d'auto-renouvellement pathologique

Les T2EC peuvent subir une transformation oncogénique grâce à l'utilisation d'un rétrovirus porteur d'oncogènes, celui de l'érythroblastose aviaire, appelé AEV (*Avian Erythroblastosis Virus*), permettant ainsi d'étudier aisément certains dérèglements impliqués dans les processus cancéreux. Le rétrovirus AEV peut induire *in vivo* des maladies telles que des érythroblastoses, des carcinomes et des sarcomes chez le poulet (Bister and Duesberg, 1979). Des études *in vitro* montrent également une transformation des fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF : Chicken Embryo Fibroblasts) infectés par ce rétrovirus (Graf and Beug, 1978). De plus, la mise en contact du rétrovirus AEV avec les progéniteurs érythrocytaires en culture induit la transformation de ces derniers : l'AEV agit en bloquant leur programme de différenciation et en les maintenant au stade CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) (Beug et al., 1982; Samarut and Gazzolo, 1982). Le génome de l'AEV contient deux séquences oncogéniques, *v-erbA* et *v-erbB*, codant deux protéines v-ErbA et v-ErbB. La surproduction de ces deux oncoprotéines par l'AEV conduit à la transformation des cellules qu'il infecte. L'oncogène *v-erbB*, qui dérive du proto-oncogène *c-erbB*, code une protéine tyrosine kinase membranaire correspondant à une forme tronquée du récepteur au TGF- α (Transforming Growth Factor alpha) et à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Downward et al., 1984). A lui seul, il est suffisant pour transformer les CEF (Gandrillon et al., 1987) et stimule la prolifération des progéniteurs érythrocytaires sans bloquer leur engagement dans un programme de différenciation (Frykberg et al., 1983). L'oncogène *v-erbA* et ses mécanismes d'action seront détaillés dans le paragraphe suivant.

C/ L'oncogène *v-erbA*

C.1/ Le gène cellulaire : *c-erbA α*

L'oncogène *v-erbA* est porté par le rétrovirus AEV et code l'oncoprotéine v-ErbA, qui est l'homologue viral du récepteur nucléaire TR α 1, codé par le gène *c-erbA α* . Le gène *c-erbA α* se trouve sur le chromosome 17 chez l'être humain. La transcription du gène *c-erbA α* produit un transcrit primaire qui va subir des épissages alternatifs conduisant à la maturation de trois ARNm, traduits en 3 formes de récepteurs : TR α 1, TR α 2, et TR α 3 (Sap et al., 1986). Les récepteurs TR α 2 et TR α 3 diffèrent du récepteur TR α 1 au niveau de leur domaine de liaison à l'hormone thyroïdienne T3 (pas de liaison de l'hormone), de leur dimérisation avec d'autres facteurs, et l'activation de la transcription des gènes cibles de la T3. Le récepteur TR α 1 forme préférentiellement des hétérodimères fonctionnels avec les différentes isoformes de RXR, ainsi il entre en compétition avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) qui forme aussi des hétérodimères avec RXR. Ces complexes hétérodimères TR α 1-RXR se fixent alors préférentiellement sur les séquences spécifiques TRE (T3 Response Element) dans la région promotrice des gènes cibles de la T3. Après s'être lié à l'ADN, ce complexe de récepteurs nucléaires peut recruter des co-activateurs ou des co-répresseurs, selon la présence ou l'absence de l'hormone T3, au niveau de la région promotrice des gènes cibles afin de réguler la transcription de ces gènes (Figure 3).

C.2/ Caractéristiques de l'oncogène *v-erbA*

L'oncogène *v-erbA* qui résulte d'une recombinaison du génome viral avec le gène cellulaire *c-erbA α* , s'exprime sous la forme d'une protéine fusion p75gag-ErbA.

Par rapport à son homologue cellulaire, il a subi des altérations variées qui sont à l'origine de son pouvoir transformant : tout d'abord, *v-ErbA* a été fusionnée dans sa partie N-terminale à une portion de la protéine Gag ; de plus, la séquence de TR α fusionnée a subi des délétions dans ses parties amino- et carboxy-terminales, et a également accumulé plusieurs mutations. L'oncoprotéine *v-ErbA* a ainsi acquis de nouvelles propriétés qui diffèrent du récepteur nucléaire TR α dont elle dérive. La différence majeure étant son incapacité à lier l'hormone T3. D'autre part, *v-ErbA* peut toujours se dimériser avec RXR, mais ce complexe se fixe d'une part sur les séquences TRE avec une plus faible affinité que le complexe TR α /RXR, et d'autre part reconnaît également les séquences RARE (Retinoic Acid Response Element) de la région promotrice des gènes cibles de l'acide rétinoïque (RA). En conséquence, *v-ErbA* pourrait entrer en compétition avec les récepteurs TR et RAR en se fixant sur leurs gènes cibles, et bloquer ainsi leur accès au niveau des éléments de réponse TRE ou RARE, et/ou en recrutant RXR, empêchant ainsi la formation des complexes TR/RXR et RAR/RXR dans le noyau (Yen et al., 1994).

L'ensemble des modifications acquises par l'oncogène *v-erbA* semble aussi jouer un rôle dans la distribution subcellulaire de *v-ErbA*. Contrairement à TR α qui circule entre le noyau et le cytoplasme, mais qui reste majoritairement dans le noyau, *v-ErbA* s'accumule à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules aviaires infectées par l'AEV. La rétention de la protéine *v-ErbA* pourrait alors interférer avec les voies de signalisation intracellulaires. Des études menées au sein de notre équipe ont montré que la forme transformante de *v-erbA* confère aux progéniteurs érythrocytaires aviaires une indépendance au TGF- β et induit une activation de la voie de signalisation mTOR/p70S6K (Gonin-Giraud et al., 2008). D'autres expériences menées sur des cellules NIH/3T3, des cellules HeLa et des cellules COS-1 ont montré que *v-ErbA* pouvait se dimériser à la fois avec TR α et RXR, et les séquestrer dans le cytoplasme afin de bloquer leur disponibilité dans le noyau, près des régions promotrices de leurs gènes cibles (Bonamy et al., 2005).

Ainsi, d'un point de vue fonctionnel, *v-ErbA* jouerait un rôle de dominant négatif vis-à-vis des récepteurs hormonaux nucléaires à la T3 et à l'acide rétinoïque

(RA), conduisant à bloquer toute activation transcriptionnelle des gènes cibles de la T3 et de la RA (Gandrillon et al., 1995; Sap et al., 1986) (Figure 4). Il existe un mutant ponctuel, non transformant de l'oncogène *v-erbA*, appelé *S61G*. Ce mutant est incapable de se fixer sur les séquences RARE et en conséquence, il ne pourra pas inhiber la transcription des gènes cibles de l'acide rétinoïque (Bonde et al., 1991). Cependant, tout comme *v-ErbA*, le mutant *S61G* se dimérise avec RXR et se lie sur les sites TRE pour bloquer la transcription des gènes sous le contrôle de TR. Ce mutant ponctuel a subi une substitution de la sérine par la glycine en position 61, mutation permettant la restauration de l'acide aminé qui était initialement présent dans le gène *c-erbA α* . La position 61 de la glycine se trouve dans un domaine de liaison à l'ADN des gènes cibles, et plus spécifiquement au niveau du premier doigt de zinc de ce domaine (Figure 4).

C.3/ Les effets de l'oncogène *v-erbA*

L'oncogène *v-erbA*, à lui seul est capable de stimuler la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet (CEF) *in vivo* et *in vitro* (Gandrillon et al., 1987). En effet, *in vivo*, lorsque la quantité de *v-erbA* est importante, cet oncogène est capable d'induire des érythroleucémies chez les poulets.

En association avec *v-erbB*, l'oncogène *v-erbA* est capable de transformer *in vitro* des CEF ainsi que des progéniteurs érythrocytaires en bloquant leur différenciation à un stade précoce appelé CFU-E (Samarut and Gazzolo, 1982). Plus tard, des études menées uniquement sur l'expression de *v-erbA* ont montré qu'à lui seul, *v-erbA* est capable d'induire la transformation de progéniteurs érythrocytaires en bloquant leur engagement d'un programme d'auto-renouvellement vers un programme de différenciation (Gandrillon et al., 1994; Gandrillon et al., 1989).

Les modifications subies par *v-erbA*, ainsi que les données obtenues sur *v-ErbA* à ce jour suggèrent que ce dernier pourrait avoir d'autres mécanismes d'action. Pour conforter cette hypothèse, une étude transcriptomique à grande échelle faite par l'équipe a pu montrer que *v-ErbA* modulait l'expression de différents gènes mettant

en évidence de nouveaux mécanismes d'action de cet oncogène, indépendamment de T3R ou RAR et même du processus de différenciation (Bresson et al., 2007). Il a ainsi été montré que l'oncogène *v-erbA* réprime l'expression de certains gènes codant les protéines ribosomiques (r-protéines), mais pas de tous les gènes des r-protéines. Ce résultat suggère que l'oncogène *v-erbA* serait capable de moduler la quantité, et/ou, la composition des ribosomes en r-protéines.

PARTIE II

La biogenèse des ribosomes eucaryotes

Les ribosomes sont de grands complexes ribonucléoprotéiques, *i.e.*, composés de protéines et de molécules d'ARN (acide ribonucléique), qui sont les acteurs clés dans les processus de traduction des ARN messagers. Les ribosomes ont été observés en microscopie électronique et décrits pour la première fois en 1955 par G. E. Palade : ils ont l'apparence de particules denses ou de granules présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Palade, 1955).

Les ribosomes eucaryotes sont composés de 4 ARN ribosomiques (ARNr) et de 79 r-protéines (Wilson and Nierhaus, 2005). Un ribosome eucaryote mature possède une masse moléculaire d'environ 4 MDa (60% d'ARNr et 40% de r-protéines), et un coefficient de sédimentation de 80S. Il est formé de deux sous-unités, une petite sous-unité 40S qui permet le décodage de l'ARN messager, et une grande sous-unité 60S où se trouve le centre peptidyl-transférase porté par les ARNr (Kramer et al., 2009).

La petite sous-unité 40S comprend un seul ARNr 18S et environ une trentaine de protéines ribosomiques, alors que la grande sous-unité se compose de trois ARNr 5S, 5,8S et 28 S et d'environ une cinquantaine de protéines ribosomiques. Le nombre des protéines ribosomiques varie d'espèce en espèce. Les séquences nucléotidiques des quatre ARNr ont été déterminées dans leur intégrité chez le rat pour la première fois dans les années 80 (Aoyama et al., 1982; Chan et al., 1983; Hadjiolov et al., 1984; Nazar et al., 1975; Torczynski et al., 1983).

Une grande partie des étapes de la biogenèse des ribosomes requiert la participation des trois ARN polymérases (Pol I, Pol II, et Pol III), mais pas toutes. Ces différentes étapes ne sont pas très bien connues, même si elles sont mieux étudiées chez la levure (Fromont-Racine et al., 2003). Les mécanismes moléculaires régulant la synthèse coordonnée des différents éléments des ribosomes sont encore mal connus.

Dans les cellules eucaryotes en prolifération, et spécialement chez les levures en phase de croissance rapide, l'énergie accordée à la biogenèse des ribosomes est très importante puisque les ARNr constituent environ 80% des acides nucléiques contenus dans les cellules (Lempiainen and Shore, 2009).

A/ Les ARN ribosomiques (ARNr)

A.1/ La transcription et la maturation du pré-ARNr 45S pour former les trois ARNr 28S, 18S et 5,8S

A.1.1/ Description de l'unité de transcription du pré-ARNr 45S

Une seule unité transcriptionnelle code les ARNr 28S, 18S et 5,8S et cette unité de 45 kb chez l'être humain existe en grand nombre d'exemplaires sur différents chromosomes. Elle est organisée en répétitions en tandem (Worton et al., 1988), sous forme de répétitions directes ou inversées, sur les chromosomes formant ainsi des NOR (Nucleolus Organizer Region). Le génome diploïde humain contient environ 400 copies réparties sur les bras courts des 5 chromosomes acrocentriques, les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 (Henderson et al., 1973; Worton et al., 1988) ([Figure 5](#)). Le séquençage des gènes codant les pré-ARNr chez de nombreuses espèces a montré que cet ADN a plusieurs propriétés communes chez tous les mammifères. Les trois gènes codant les ARNr 18S, 5,8S et 28S sont contenus dans une unité génique, appelé cluster qui est transcriptionnellement sous le contrôle d'un même promoteur. Ce cluster est fait de 43 kpb (kilo paires de bases) et de 45 kpb, respectivement chez l'être humain et la souris (Gonzalez and Sylvester, 1995). Ces 43 kpb sont constitués d'une séquence de 13 kpb à 14 kpb codant les trois pré-ARNr et des régions intergéniques non codantes (IGS : InterGenic Spacer) d'environ 30 kpb ([Figure 6](#)). L'IGS contient des séquences d'éléments de régulation, comprenant la région promotrice, différentes séquences activatrices et des signaux de terminaison de la transcription (McStay and Grummt, 2008). Le promoteur des gènes codant les ARNr est composé d'une part, d'un cœur du promoteur, adjacent au site d'initiation de la transcription et d'autre part, d'un élément de contrôle (UCE : Upstream Control Element) situé approximativement à 100 nucléotides en amont de ce premier.

Les clusters des gènes d'ARNr chez les mammifères sont encadrés de part et d'autre de leurs extrémités 5' et 3' par une ou plusieurs séquences de terminaison de la transcription qui sont reconnues par le facteur TTF-1 (Transcription Terminator Factor), une protéine liant spécifiquement l'ADN pour permettre l'arrêt de l'élongation de la transcription, et qui joue un rôle important dans la régulation épigénétique des gènes d'ARNr (Grummt et al., 1985). Enfin, les régions du génome correspondant aux trois ARNr matures sont toujours disposées dans le même ordre du 5' vers le 3' : 18S, 5,8S et 28S.

A.1.2/ La transcription du pré-ARNr 45S

Les gènes des ARNr 28S, 18S et 5,8S sont transcrits par la Pol I dans le nucléole sous forme d'un ARNr précurseur 47S, qui est rapidement clivé pour former le pré-ARNr 45S. La transcription des gènes d'ARNr par la Pol I requiert la formation d'un complexe de pré-initiation au niveau du promoteur. Ce complexe est composé d'un homodimère de facteurs UBF (Upstream Binding Factor), d'un complexe SL1 (Selectivity factor 1) chez l'être humain, du facteur TIF-IA (Transcription Initiation Factor IA) et bien sûr de l'ARN Polymérase I ([Figure 7](#)) (Moss et al., 2007). Le facteur UBF forme avec lui-même, dans un premier temps, un homodimère qui s'associe avec le complexe SL1. Le complexe UBF/SL1 se lie ensuite au promoteur des gènes d'ARNr, ce qui induit une courbure de cette région permettant la juxtaposition du cœur du promoteur avec l'élément UCE. Cette courbure favoriserait le recrutement du facteur de régulation TIF-IA par son interaction avec le complexe SL1. Et comme TIF-IA s'associe à la sous-unité β I de la Pol I, cette dernière est recrutée à son tour sur la région promotrice des gènes d'ARNr. Ainsi le complexe de pré-initiation de la transcription s'est formé, induisant par la suite le démarrage de la transcription des ARNr.

Le facteur UBF contrôle la transcription par la Pol I à plusieurs niveaux : il peut jouer un rôle d'activateur de la transcription, celui d'un anti-represseur, et celui d'un régulateur de l'étape d'élongation de la transcription. De plus, il est impliqué dans la condensation de la chromatine. Le complexe SL1 qui fait environ 300 kDa,

est constitué de la protéine TBP (TATA box binding protein) et d'au moins cinq facteurs TAF_I^s (RNA Polymerase I-specific TBP-associated factors) : TAF_I110/95 , TAF_I68, TAF_I48, TAF_I41 et TAF_I12 (McStay and Grummt, 2008). Les facteurs TAF_I41 et TAF_I12 sont requis pour une initiation efficace et spécifique de la transcription par la Pol I, mais de manière plus générale, les facteurs TAF_I^s jouent un rôle important dans l'assemblage des différents facteurs du complexe d'initiation de la transcription, et plus spécialement dans l'établissement des interactions spécifiques entre le promoteur des gènes d'ARNr et la Pol I.

L'ADN ribosomique (ADNr) transcriptionnellement actif se trouve sous la forme d'euchromatine avec des îlots CpG qui sont hypo-méthylés. Certaines histones bien définies de cet ADNr subissent des modifications post-traductionnelles qui sont associées à une transcription active des gènes d'ARNr dans le nucléole. Au contraire, l'ADNr non-actif est empaqueté, hyper-méthylé et lie aussi des histones particulières avec d'autres modifications post-traductionnelles.

A.1.3/ La maturation du pré-ARNr 45S

On peut diviser la maturation des ARNr 28S, 18S et 5,8S en deux étapes, qui en réalité, se passent de manière concomitante : le clivage du pré-ARNr 45S en trois ARNr matures 28S, 18S et 5,8S, et les modifications post-transcriptionnelles de ces ARNr.

La maturation des ARNr et leur insertion dans les sous-unités ribosomales 60S et 40S requièrent au moins 170 protéines accessoires incluant les endo- et les exoribonucléases, des ARN hélicases potentielles dépendantes de l'ATP, les chaperones ou les facteurs d'assemblage et de nombreux snoRNP (Small Nucleolar RiboNucleoprotein Particles) (Fromont-Racine et al., 2003).

Le pré-ARNr 45S synthétisé par l'ARN Pol I va subir de nombreuses étapes de clivage par des endonucléases et exonucléases , des snoRNP à boîte C/D (Peculis and Steitz, 1993) et des snoRNP à boîte H/ACA (Henras et al., 2008)) pour donner

naissance à des ARNr matures 28S, 18S et 5,8S ayant respectivement 4700, 1900 et 160 nucléotides.

Le pré-ARNr 45S est composé d'un 5'-ETS (External Transcribed Spacer), d'un ARNr 18S, d'un ITS1 (Internal Transcribed Spacer), d'un ARNr 5,8S, d'un ITS2, d'un ARNr 28S et d'un 3'-ETS. L'existence de deux voies distinctes de clivage du pré-ARNr 45S a été décrite en 1993 dans les cellules humaines ([Figure 8](#)) (Hadjiolova et al., 1993). La différence majeure entre ces deux voies de clivage réside seulement dans l'ordre d'utilisation des sites de clivage du pré-ARNr 45S pour donner soit un transcrit intermédiaire d'environ 41S ou deux transcrits intermédiaires d'environ 30S et 32S. Ces deux voies sont nommées les voies A et B. Les mécanismes moléculaires de ces deux voies ne sont pas bien connus, et le choix de ces deux voies au sein d'une cellule reste encore mal défini.

A.2/ La transcription et la maturation de l'ARNr 5S

L'ARNr 5S est le plus petit des ARNr que contient le ribosome et il est constitué de 120 nucléotides. Le gène de l'ARNr 5S ne se trouve pas dans le même cluster transcriptionnel que celui des ARNr 28S, 18S et 5,8S. Chez les eucaryotes, les gènes codant l'ARNr 5S s'organisent en répétitions en tandem, variant de 375 paires de bases à plusieurs kb avec un nombre de copies variant entre 160 et 20 000 par génome haploïde. Chez l'être humain, le nombre de gènes codant l'ARNr 5S varie de 600 à 2000 copies par génome haploïde, selon le type de cellules : il existe trois pseudogènes et deux formes variantes du gène de l'ARNr 5S (Sorensen and Frederiksen, 1991). Les gènes de l'ARNr 5S se localisent sur différents loci du chromosome 1 chez l'être humain, dont le plus gros cluster se trouve au locus q42.11-13 (Lomholt et al., 1995; Sorensen and Frederiksen, 1991) et comprend entre 100 et 150 répétitions en tandem. Le reste des gènes codant cet ARNr est organisé en un plus petit cluster (de 25% à 30% par rapport au cluster principal) présentant 5 à 10 répétitions sur le même chromosome en position 1q31 (Lomholt et al., 1995) ([Figure 5](#)).

L'ARNr 5S est synthétisé par la Pol III dans une région du noyau autre que le nucléole. La Pol III est composée de 17 sous-unités, et s'associe avec les facteurs de transcription TFIIA (Transcription Factor III A), TFIIB, et TFIIC, et d'autres protéines qui ont une capacité à se fixer sur les séquences PSE (Proximal Sequence Element) et DES (Distal Sequence Element) des gènes d'ARNr 5S ([Figure 9](#)). Le gène de l'ARNr 5S possède un promoteur de type 1 contenant un élément intragénique (boîte A), un élément intermédiaire et une boîte C, qui sont très conservés entre différentes espèces (Chalice and Segall, 1989). Ces trois éléments constituent la région ICR (Internal Control Region), qui permet la reconnaissance et la liaison spécifique avec le facteur TFIIA (Nolte et al., 1998). Ce complexe binaire est ensuite rejoint dans un premier temps par le facteur TFIIC2 en amont du site d'initiation de transcription, ensuite par le complexe TFIIB- β , et enfin par la Pol III. Chez l'être humain, il y a un troisième facteur de transcription nommé TFIIC1 qui est requis pour la transcription par la Pol III et qui augmente l'affinité de fixation des facteurs TFIIA, TFIIC2 et PBP (PSE Binding Protein) au niveau de la région promotrice des gènes dont la transcription est dépendante de l'ARN Pol III (Oettel et al., 1997).

Chez les eucaryotes, le transcrit ARNr 5S lié au facteur TFIIA est exporté du noyau vers le cytoplasme dans un complexe ribonucléoprotéique 7S. Dans le cytoplasme, le facteur TFIIA est remplacé par la protéine ribosomique L5 (RPL5) et le complexe formé par l'ARNr 5S et RPL5 se localise à nouveau dans le noyau. Une partie de ce complexe binaire se dirige vers le nucléole pour participer à la biogenèse de la grande sous-unité 60S et une autre partie, ne s'associe pas aux ribosomes pour former un complexe de stockage en cas de besoin urgent de synthétiser rapidement des ribosomes (Steitz et al., 1988).

A.3/ Les modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Les pré-ARNr sont soumis à des modifications chimiques co-transcriptionnelles qui sont classées en deux catégories : une isomérisation des uridines en pseudouridines et une addition d'un groupement méthyle à l'atome

oxygène qui est lié au carbone 2' des riboses (2'-O-méthylation) ([Figure 10](#)). La majorité de ces modifications se passe au niveau du centre fibrillaire et de la zone fibrillaire dense du nucléole (voir la description de la structure du nucléole : [Figure 11](#)) (Bousquet-Antonelli et al., 1997; Brand et al., 1977) et implique plus d'une centaine de protéines. Chez l'être humain, on dénombre environ 115 méthylations et 95 pseudo-uridylation. Ces modifications sont réalisées par deux groupes de snoRNP (Small Nucleolar RiboNucleoProtein), constitués de protéines et de petits ARN nucléolaires non codants (snoRNA). Les snoRNA servent de guidage des particules snoRNP : des snoRNP à boîte C/D qui catalysent la réaction 2'-O-méthylation (Cavaille et al., 1996), alors que des snoRNP à boîte H/ACA sont responsables des pseudo-uridylation (Kiss et al., 2010). En exemple, la snoRNP contenant la boîte U14 C/D snoRNA et la snoRNA à boîte snR10 H/ACA ont à la fois un rôle dans les clivages du pré-ARNr 45S et sont responsables chacune d'une 2'-O-méthylation et d'une pseudo-uridylation. Chez les mammifères, la fibrillarine associée aux snoRNA U3, U8 et U13 dans la zone fibrillaire dense (DFC) du nucléole, forme des snoRNP à boîte C/D. Elle joue un rôle important dans la réaction catalytique méthyl-transférase au cours des premières étapes de maturation des ARNr (Bartova et al., 2010). Chez l'être humain, la dyskérine, qui est une des protéines essentielles des snoRNP à boîte H/ACA, assure la conversion des uridines en pseudo-uridines sur des résidus spécifiques des ARNr au cours de leur maturation (Montanaro et al., 2011).

Ces modifications transcriptionnelles affectent des sites très précis des ARNr et sont, dans de nombreux cas, proches du centre de décodage et du centre peptidyl-transférase du ribosome (Decatur et al., 2007). Certaines de ces modifications post-transcriptionnelles sont essentielles pour un bon fonctionnement du ribosome, mais pour d'autres, leurs fonctions restent à déterminer. En effet, Fournier et ses collaborateurs ont montré que l'absence d'un sous-groupe de snoRNA participant dans les modifications des nucléotides formant le centre peptidyl-transférase ou l'hélice 69 des ARNr de la grande sous-unité 60S, altère la structure des ARNr et la fidélité et/ou l'activité traductionnelle du ribosome (King et al., 2003; Liang et al., 2007).

B/ Les protéines ribosomiques (r-protéines)

Les ARNr ne sont pas les seuls constituants des ribosomes : 40% de la masse d'un ribosome est composé de r-protéines ([Figure 12](#)). Le nombre de r-protéines dans chaque sous-unité ribosomique varie selon l'espèce. Par exemple, le nombre de r-protéines extraites et purifiées de ribosomes provenant des cellules hépatiques du rat est de 82 (Wool, 1979), le nombre de gènes codant les r-protéines chez l'être humain est de 80 (Uechi et al., 2001) et chez la drosophile, il est de 79 (Marygold et al., 2007). Dans les années 70, les r-protéines eucaryotes ont été fortement étudiées par Wool, McConkey, Meyuhas, Perry, ... pour n'en citer que quelques uns. Elles ont été analysées en utilisant différentes techniques d'électrophorèse bidimensionnelle (séparation selon la charge et le poids moléculaire). Dans ces études, elles ont été numérotées selon leur mobilité électrophorétique dans les deux dimensions et différentes nomenclatures ont été ainsi proposées, rendant initialement très difficile la comparaison des résultats entre différentes équipes.

La première nomenclature des r-protéines a été proposée par Sherton et Wool en 1972 en se basant sur la séparation des r-protéines de foies de rat en électrophorèse bidimensionnelle (Sherton and Wool, 1972). C'est seulement en 1979 qu'une nomenclature uniforme a été établie par McConkey selon les similitudes de migration des r-protéines entre différentes espèces (McConkey et al., 1979). La nomenclature des r-protéines est la suivante : i/ Les r-protéines de la grande sous-unité 60S sont appelées des RPL pour « Ribosomal Protein of the Large subunit » et celles de la petite sous-unité sont appelées des RPS pour « Ribosomal Protein of the Small subunit » ; ii/ Elles sont numérotées par rapport à leur position après séparation sur gel par électrophorèse bidimensionnelle, de gauche à droite et de haut en bas.

En 1973, Delaunay et ses collaborateurs ont montré qu'il n'y a pas de différences notables dans le profil de migration en électrophorèse bidimensionnelle des r-protéines de rat, d'être humain, d'oiseaux et de lézards, au niveau de leur

charge et de leur masse moléculaire (Delaunay et al., 1973). En effet, l'analyse des séquences d'acides aminés des r-protéines de différentes espèces eucaryotes montrent une très forte homologie: par exemple, l'alignement des séquences des r-protéines du rat avec celles de l'être humain montre une homologie variant de 82% à 100% ([Tableau 1](#)).

B.1/ Les gènes codant les r-protéines

B.1.1/ La localisation physique des gènes de r-protéines sur le génome humain

Chez l'être humain, contrairement aux ARNr, initialement, seule une petite fraction des gènes codant les r-protéines a été localisée physiquement sur le génome. En 1992, Feo et ses collaborateurs ont réussi à identifier la position de 24 gènes de r-protéines au sein du génome, dispersés sur 14 chromosomes différents (Feo et al., 1992). En 1998 puis en 2001, les résultats obtenus par le groupe de Kenmochi ont complété les données sur la position des gènes des r-protéines de l'être humain (Kenmochi et al., 1998; Uechi et al., 2008) : 75 gènes codant les r-protéines, parmi les 80, ont été localisés dans le génome en 1998 et les 5 restants ont été positionnés en 2001. Le chromosome 19, caractérisé par une forte densité en gènes, contient un nombre important et inhabituel de gènes de r-protéines. Contrairement aux ARNr, chaque r-protéine est codée par un seul gène. Cependant, pour la majorité des r-protéines, il existe un grand nombre de pseudogènes, copies non fonctionnelles d'un gène actif, qui sont dispersés tout au long du génome (Dudov and Perry, 1984; Wagner and Perry, 1985). La position sur les différents chromosomes des gènes de r-protéines fonctionnels est représentée sur la [figure 5](#).

B.1.2/ La structure des gènes de r-protéines

Yoshihama et ses collaborateurs ont analysé en 2002 la structure de 73 gènes de r-protéines, parmi les 80 gènes existant chez l'être humain (Yoshihama et al., 2002). La taille moyenne des gènes de r-protéines à partir du site d'initiation de la transcription est d'environ 4,4 kpb avec le gène le plus grand *RPS4Y*, contenant 25 kb et le gène le plus petit *RPS28*, constitué de 0,9 kpb. Chaque gène contient en moyenne 5,6 exons, avec les valeurs allant de 3 (pour *RPS29* et *RPL39*) à 10 exons (pour *RPL3* et *RPL4*).

Les gènes des r-protéines sont plus petits par rapport à la taille moyenne des gènes du génome humain : en moyenne les gènes de r-protéines ont des introns de 760 pb, des premiers exons de 45 pb et les régions 5' UTR et 3' UTR (UnTranslated Region) de 42 pb et 56 pb respectivement. On retrouve les mêmes valeurs chez les gènes de r-protéines de Xénope (Amaldi et al., 1995), suggérant ainsi que ces valeurs sont communes aux gènes codant les r-protéines chez les vertébrés.

Les introns des gènes de r-protéines codent certains snoRNA, qui jouent un rôle de guidage des snoRNP dans les modifications post-transcriptionnelles des ARNr : 54 copies des 38 gènes codant les snoRNA se trouvent dans les parties introniques de 26 gènes de r-protéines, soit environ un tiers des snoRNA connus de nos jours.

La région promotrice des gènes de r-protéines est plus riche en GC que la moyenne du génome (61% vs 41%) et 60% de ces régions contiennent une boîte TATA très conservée (Perry, 2005) ou des éléments de séquences similaires (Yoshihama et al., 2002). Des sites de fixation pour des facteurs de transcription, analysés sur 73 séquences de gènes de r-protéines, tels que GATA (45 cas/73), CdxA (Chicken homeobox protein, 43 cas/73), Ets (E-Twenty-Six, 34 cas/73) et Sp1 (Stable Protein 1, 20 cas/73) ont été trouvés, mais aucun facteur de transcription commun à tous ces gènes n'a encore été identifié (Yoshihama et al., 2002).

B.1.3/ La transcription et la traduction des gènes de r-protéines

Les gènes des r-protéines sont transcrits par la Pol II et la transcription commence toujours au niveau d'un résidu C (cytosine) dans une région en 5', spécialement riche en pyrimidines variant entre 5 pb et 25 pb : cette région est appelée le 5' TOP (Tract of OligoPyrimidine) (Meyuhas, 2000). Dans la majorité des cas, c'est le deuxième résidu de cytosine contenu dans la région 5' TOP qui va servir de site d'initiation de la transcription. Cependant, ce site peut varier et le début de la transcription peut alors commencer au niveau d'un autre résidu cytosine ou même thymine contenu dans cette région 5' TOP (cas de *RPL32*) ; dans certains cas, la transcription peut aussi démarrer au niveau de résidus cytosines contenus dans d'autres régions riches en pyrimidines (cas de *RPL39*).

La transcription des gènes de r-protéines par la Pol II représente 50% de l'activité transcriptionnelle de cette ARN polymérase (Warner, 1999). Malgré le fait que les gènes fonctionnels des r-protéines s'expriment de manière ubiquitaire, l'expression de tous les gènes codant les r-protéines n'est pas régulée de la même manière selon les différentes conditions physiologiques (Bresson et al., 2007; Perry, 2005).

Les ARNm codant les r-protéines possèdent une région 5' TOP (5' TOP-ARNm), tout comme leurs gènes. Cette région joue un rôle important dans la régulation spécifique de la synthèse des r-protéines, en comparaison à d'autres ARNm dépourvus de ce 5' TOP. En effet, il a été montré que l'efficacité de la traduction des 5' TOP-ARNm corrèle avec l'activation de la protéine kinase p70S6K, ainsi qu'avec la phosphorylation de la protéine RPS6. La traduction de ces messagers est dépendante de la vitesse de croissance des cellules, et de la présence ou l'absence de nutriments. Ainsi, lorsque la voie mTOR (voir la partie III, paragraphe A.1.1) est activée, on observe une phosphorylation de p70S6K permettant une croissance cellulaire. De même, une traduction importante des 5' TOP-ARNm entraînant une augmentation de la biogenèse des ribosomes a été reportée, afin de synthétiser une quantité suffisante de protéines, nécessaire à la prolifération cellulaire (Meyuhas and Drazan, 2009).

La traduction des transcrits des r-protéines commence par le codon AUG, qui se trouve près des sites d'épissage. Dans 47% des cas, ce codon se trouve dans l'exon 2 et dans 29% des cas, à la fin de l'exon 1 (Perry, 2005). Le codon stop, quant à lui, est dans le dernier exon (sauf pour RPS3, RPS25, RPS28 et RPL9) (Yoshihama et al., 2002).

B.2/ Les r-protéines, leur importation dans le noyau et leurs modifications post-traductionnelles

B.2.1/ Les caractéristiques des r-protéines

Les r-protéines ont une masse moléculaire qui varie de 3,45 kDa (pour RPL41) à 47,28 kDa (pour RPL4) et contiennent entre 25 et 421 acides aminés chez le rat. La majorité de ces protéines sont très basiques, leur point isoélectrique variant entre 4,07 pour RpP1 et 13,46 pour RPL41 ; le point isoélectrique moyen est de 11,05 (Kaltschmidt, 1971). Elles contiennent en général 22% d'acides aminés à chaîne latérale basique tels que l'arginine et la lysine, et 9% d'acides aminés à chaîne latérale acide tels que les acides aspartique et glutamique (Wool et al., 1996). En conséquence, elles sont très insolubles dans la plupart des tampons. Des procédures de purification des ribosomes et d'extraction des r-protéines ont été mises au point par différents groupes (Kaltschmidt and Wittmann, 1970; Madjar, 1994). Une fois purifiées, les r-protéines ont été séparées et analysées par électrophorèse bidimensionnelle afin de déterminer leur point isoélectrique ainsi que leur masse moléculaire.

L'analyse de la structure tertiaire des r-protéines a permis l'identification de motifs particuliers qui sont des motifs en doigt de zinc observés dans la séquence de RPS27a, RPS27, RPS29, RPL37a, RPL37 et RPL40 de rat, des motifs en fermeture éclair à leucine (leucine zipper motif) chez RPL13a, des motifs en fermeture éclair à

leucine précédés d'un domaine basique (bZIP) chez RPL13a, RPL7, RPL9, RPL12, RPL35, RPL37a, RPS2 et RPS9 (Wool et al., 1996).

B.2.2/ Les modifications post-traductionnelles des r-protéines

Certaines r-protéines, après leur synthèse, subissent des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination...etc. Ci-dessous, sont présentés quelques exemples de modifications post-traductionnelles observées chez certaines r-protéines.

La protéine ribosomique S6 possède 6 états de phosphorylation possibles. Ces phosphorylations sont induites par des stimuli tels que les hormones, le taux d'AMP cyclique, une infection virale (Diaz et al., 1989), des changements de conditions de croissance (Wool, 1979). La régulation de la phosphorylation de RPS6 permet donc aux cellules de répondre à des changements dus à l'environnement : le taux de RPS6 phosphorylée augmente lors d'un accroissement de la synthèse protéique et au contraire on trouve une quantité importante de RPS6 non-phosphorylée dans les cellules extraites de foie de rat soumis à un jeun.

La protéine ribosomique S3, constituant de la petite sous-unité 40S, joue à la fois un rôle dans le maintien de l'ARNr 18S et dans la réparation de l'ADN en agissant comme une endonucléase. Les différentes fonctions de RPS3 sont régulées par des modifications post-traductionnelles telles que la méthylation et la phosphorylation. De plus, il a été récemment montré que la sumoylation de cette protéine augmentait sa stabilité face à des protéases (Jang et al., 2011).

En 2008, Xirodimas et ses collaborateurs ont montré que 36 r-protéines sont des cibles de NEDD8, une molécule de type ubiquitine impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire, de la viabilité et du développement. La NEDDylation des r-protéines par NEDD8 les protégerait de la dégradation protéique (Xirodimas et al., 2008).

D'autre part, l'analyse des protéines susceptibles d'être acétylées sur les lysines menée par Choudhary et ses collaborateurs a montré que 75 r-protéines pouvaient être acétylées sur 136 sites, le nombre de sites d'acétylation est variable selon les r-protéines (Choudhary et al., 2009).

Les différentes modifications post-traductionnelles des r-protéines pourraient être ainsi impliquées dans leur stabilité, leur assemblage dans le ribosome, l'efficacité de la traduction sélective de certains ARNm, ou encore pourraient participer à certaines de leurs fonctions extraribosomiques (voir partie III).

B.2.3/ L'importation des r-protéines du cytoplasme vers le noyau

Après avoir été traduites dans le cytoplasme, les r-protéines sont importées rapidement dans le noyau où elles vont s'associer à des ARNr naissants pour former les deux sous-unités ribosomiques au niveau du nucléole. En effet, la demi-vie des protéines ribosomiques dans le cytoplasme après leur synthèse est de 2 à 3 minutes (Jakel and Gorlich, 1998). Il a été montré en 1991 que les r-protéines possédaient des séquences particulières d'acides aminés, qui ont des chaînes latérales chargées positivement et qui constituent des signaux de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal) (Dingwall and Laskey, 1991). Ces signaux sont reconnus par des facteurs protéiques appelés les importines, qui prennent en charge des r-protéines du cytoplasme vers le noyau. Ce transport est actif et en conséquence, il requiert de l'énergie. L'expression de ces importines reflète l'activité de la biogenèse des ribosomes dans une cellule, et il a été récemment montré que leur expression est sous le contrôle de c-Myc et de la protéine p53 (Golomb et al., 2012).

Les NLS classiques peuvent être monopartite ou dipartite constitués de résidus basiques tels que les lysines ou les arginines. Ils sont classés en deux catégories : les NLS à une seule séquence ou à 2 séquences, constitués de deux éléments basiques séparés par 10 résidus. Il a été montré que 32 des 78 r-protéines de mammifères possèdent au moins une partie des NLS à 2 séquences et les 46 autres r-protéines contiennent une séquence NLS d'une autre catégorie (Wool et al., 1996).

Ces séquences de localisation nucléaire vont permettre aux r-protéines nouvellement synthétisées d'être importées dans le noyau et dirigées vers le nucléole, afin d'être associées aux ARNr pour former les sous-unités ribosomiques. L'importation des r-protéines dans le noyau requiert des complexes du pore nucléaire, appelés NPC (Nuclear Pore Complexes) et des facteurs de transport nucléaire tels que les récepteurs de transport, les molécules adaptatrices et les constituants du système RanGTPase (Gorlich, 1997). Il a été mis en évidence en 1996 que les NPC pouvaient faire entrer 100 r-protéines par minute (Gorlich and Mattaj, 1996).

Les travaux de Jäkel et Görlich ont montré que l'importation des r-protéines du cytoplasme vers le noyau n'implique pas majoritairement la voie d'importation nucléaire classique, utilisant les hétérodimères d'importines α/β , mais une autre voie (Jakel and Gorlich, 1998). Cette voie recrute au moins 4 récepteurs de transport de type importine β : l'importine β elle-même, la transportine, RanBP5 et RanBP7. Ces 4 facteurs se lient directement aux r-protéines et les transportent dans le noyau. L'analyse plus précise de RPL23a montre que cette protéine possède un domaine très basique constitué de 32 résidus permettant sa liaison directe avec chacun de ces 4 facteurs et son importation dans le noyau (Jakel and Gorlich, 1998).

Une fois arrivée dans le noyau, les r-protéines sont orientées vers le nucléole. Les mécanismes de ce transport vers le nucléole restent encore très mal connus à ce jour. Les travaux réalisés sur le transport d'autres protéines vers le nucléole par Jacobson et les collaborateurs d'une part, et par Emmott & Hiscox d'autre part proposent une médiation des protéines vers le nucléole par des composants de l'architecture nucléolaire *via* des signaux de localisation nucléolaires, riches en résidus de lysines et arginines (Emmott and Hiscox, 2009; Jacobson et al., 1995).

C/ L'assemblage et le transport des sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme

La biogenèse des ribosomes se déroule dans le nucléole, un sous-compartiment cellulaire du noyau. Le nucléole est un domaine très dynamique dont l'apparence varie en fonction de son activité. En moyenne, le nucléole d'une cellule de mammifère peut produire 10 000 ribosomes par minute (Huang, 2002). Les images obtenues par microscopie électronique à haute résolution ont montré que le nucléole contient trois régions distinctes et fortement conservées ([Figure 11](#)). Du centre vers la périphérie, le nucléole est composé de centres fibrillaires (FC : Fibrillar Center), d'une zone fibrillaire dense (DFC : Dense Fibrillar Components) et enfin d'une zone contenant des composants granulaires (GC : Granular Components) (Busch and Smetana, 1970; Hadjiolov, 1985). Le centre fibrillaire apparaît comme une région contenant des fibres claires, qui est enrichie en ARN polymérase I (Pol I), en facteurs de transcription spécifiques, en ADN topoisomérase I et en facteur UBF (Upstream Binding Factor). La zone fibrillaire dense est une région contenant des fibres très denses aux électrons, qui entoure partiellement ou complètement le centre fibrillaire. C'est dans cette région que se trouvent des facteurs de transcription et la majorité des facteurs qui prennent en charge ensuite la maturation des pré-ARNr 45S. La zone contenant des composants granulaires, la plus externe du nucléole, est enrichie en facteurs d'assemblage et en r-protéines. Cette organisation du nucléole suggère que la biogenèse des ribosomes est un processus directionnel : les pré-ARNr 45S migrent des régions fibrillaires vers les régions granulaires pour s'associer aux r-protéines et finalement vers le nucléoplasme où l'ensemble du complexe ribonocléoprotéique va subir une maturation pour former des particules pré-ribosomales (Scheer and Hock, 1999). Cependant, la structure précise et les interactions fonctionnelles entre les différentes étapes de la synthèse des particules pré-ribosomales et les sous-régions nucléolaires restent encore mal connues.

De manière concomitante à la maturation des ARNr entre le nucléole et le nucléoplasme, l'association des ARNr avec des r-protéines mais aussi d'autres facteurs pré-ribosomiques (protéines non ribosomiques et les snoRNP) qui ne se retrouveront pas dans l'architecture finale, va générer les particules pré-ribosomiques 90S. Le clivage de la région intronique entre les séquences des ARNr 18S et 5,8S (Clivage 2 (chez les vertébrés) ou A2 (chez la levure)), [Figure 13](#)) conduit au clivage du complexe pré-ribosomique 90S en deux particules pré-60S et pré-40S, correspondant aux précurseurs de la grande et de la petite sous-unités ribosomiques respectivement. Ces précurseurs sont ensuite maturés indépendamment dans le noyau avant d'être transportés dans le cytoplasme où ils subiront les dernières étapes de maturation (Henras et al., 2008). Les différentes étapes de la maturation des sous-unités ribosomiques ainsi que l'assemblage de ces sous-unités chez la levure sont très bien décrits dans l'article de Fromont-Racine *et al* (Fromont-Racine et al., 2003) et sont schématisées sur la [figure 13](#).

C.1/ La maturation des particules ribosomiques pré-40S et pré-60S dans le noyau

La particule pré-ribosomique 90S est formée dans le nucléole. Elle est constituée d'une molécule du pré-ARNr 45S chez l'être humain (Scherrer et al., 1963) et du pré-ARNr 35S chez la levure, ainsi que des ribonucléoprotéines telles que le complexe formé par la U3 snoRNA avec d'autres protéines. La caractérisation des constituants de la particule pré-ribosomique 90S a montré que sa composition est très différente de celle des sous-unités ribosomiques matures 40S et 60S : l'équipe de E. Hurt a mis en évidence l'absence des facteurs de synthèse de la sous-unité 60S, alors que les facteurs de maturation de la sous-unité 40S sont déjà présents dans la particule pré-ribosomique 90S. De nombreuses étapes de clivage et de maturation de ce pré-90S vont donner naissance à des sous-unités ribosomiques 40S et 60S.

C.1.1/ La maturation du pré-40S chez la levure

Le complexe pré-ribosomique 40S obtenu après le clivage du pré-90S est soumis à peu de changements de composition tout au long de sa maturation et il est rapidement exporté vers le cytoplasme (Panse and Johnson, 2011). Il contient beaucoup moins de protéines non ribosomiques que le complexe pré-60S (Schafer et al., 2003). Chez la levure, la plupart de ces composants sont Dim1p, Dim2p, Enp1p, Hrr25p, Nob1p, Prp43p, Rrp12p et Tsr1p, qui étaient déjà présents dans le complexe pré-ribosomique 90S. Après le clivage A2, d'autres protéines se joignent au complexe pré-40S : Ltv1p, Pfa1p/Sqs1p, Rio1p et Rio2p. Il a été montré en 2003 que Lvt1p est essentiel pour une exportation efficace de la particule pré-40S vers le cytoplasme (Huh et al., 2003), et que Rio1p et Rio2p, membres de la famille des protéines sérine-kinases, s'associent au complexe pré-40S dans le noyau et l'accompagnent vers le cytoplasme (Vanrobays et al., 2003). Des données plus récentes sur la fonction de Lvt1p chez la levure ont remis en cause son rôle dans l'exportation des complexes pré-40S. En effet, il semblerait que cette protéine est essentielle pour l'étape de maturation cytoplasmique des particules pré-40S et non pour l'exportation de ces derniers du noyau vers le cytoplasme (Fassio et al., 2010). En fait, très peu de choses sont connues concernant le mode de recrutement des protéines non ribosomiques au complexe pré-40S, à part le fait que l'association des facteurs Enp1p, Rio2p et Tsr1p à ce complexe requiert RPS19 (Leger-Silvestre et al., 2005). Récemment, il a été montré, d'une part, que les protéines Lvt1p, Enp1p et RPS3 forment un petit sous-complexe au sein du pré-40S, et d'autre part, que la phosphorylation de ce complexe par Hrr25p, l'isoforme 1 de la caséine kinase, est corrélée avec la diminution de l'affinité de ces protéines pour le complexe pré-40S. La phosphorylation de ce sous-complexe semblerait être nécessaire à l'adoption d'une structure correcte de la particule pré-40S pour le passage à travers les pores nucléaires (Schafer et al., 2006).

Enfin, de nombreuses publications ont montré l'implication de diverses protéines ribosomiques dans la maturation des particules pré-40S : RPS15p est requise pour la sortie des particules pré-40S du noyau (Bellemer et al., 2010; Leger-Silvestre et al., 2004), RPS0 et RPS14 sont essentielles pour le passage du pré-ARNr

20S au ARNr 18S mature (Ford et al., 1999; Jakovljevic et al., 2004)... Les travaux menés par différentes équipes ont permis d'établir une liste de protéines ribosomiques participant dans la maturation des sous-unités 40S (Ferreira-Cerca et al., 2005; Ferreira-Cerca et al., 2007; O'Donohue et al., 2010).

C.1.2/ La maturation du pré-60S

De nombreuses protéines non ribosomiques (≈ 70 facteurs) s'associent aux ARNr de la grande sous-unité durant les différentes étapes de maturation. Hurt et ses collaborateurs ont remarqué que le nombre des protéines non ribosomiques présentes successivement dans les particules pré-60S diminuait au cours du processus de maturation (Nissan et al., 2002). Ces protéines sont de nombreuses hélicases, méthyl-transférases et peptidyl proline isomérases. Ces différents facteurs sont requis pour la maturation normale des pré-ARNr, mais le rôle et les cibles de la majorité de ces protéines restent encore à élucider (Henras et al., 2008). Cependant, il semblerait que ces facteurs pré-ribosomiques joueraient un rôle dans la stabilisation de la structure des particules ribosomiques 60S en cours de maturation ou dans le guidage de l'association séquentielle de différents facteurs nécessaires à des étapes spécifiques de la maturation de la sous-unité 60S.

Aussitôt que le complexe 7S, constitué de l'ARNr 5S et de la protéine RPL5, a rejoint la particule pré-60S, d'autres protéines telles que Arx1, Nmd3 et Mtr2 s'associent avec la particule pré-60S naissante. Ces protéines sembleraient jouer un rôle dans l'exportation des particules pré-60S du noyau vers le cytoplasme (Nissan et al., 2002).

C.2/ L'exportation des deux particules ribosomiques pré-40S et pré-60S vers le cytoplasme et leurs maturations cytoplasmiques

Les sous-unités pré-ribosomiques sont transportées par les NPC (Nuclear Pore Complex) du noyau vers le cytoplasme, grâce à des protéines spéciales du NPC, les nucléoporines et le système RanGTPase. Les deux complexes pré-40S et pré-60S sont exportés par deux voies différentes, cependant les deux voies requièrent le même facteur d'exportation nucléaire Xpo1p (ou Crm1p) qui reconnaît le NES (Nuclear Export Sequence) porté par chaque sous-unité (Panse and Johnson, 2011).

C.2.1/ L'exportation du complexe pré-40S du noyau vers le cytoplasme

L'exportation des particules pré-40S nécessite tout comme celle des pré-60S, la protéine Crm1p et le système RanGTPase. Contrairement aux pré-60S, on ne connaît pas encore d'adaptateurs associés aux pré-40S contenant le NES. Un certain nombre de facteurs tels que Rio2p, Dim2p ou encore Ltv1p sont associés aux pré-40S; lorsqu'on inhibe Crm1p, on observe leur accumulation dans le noyau (Schafer et al., 2003; Seiser et al., 2006; Vanrobays et al., 2003).

De plus, il semblerait que quelques unes des r-protéines jouent un rôle dans ce processus d'exportation du pré-40S: la déplétion de RPS18 induit une maturation défectueuse des pré-40S et RPS15 est un déterminant essentiel pour l'exportation du complexe pré-40S (Rouquette et al., 2005). Une hypothèse sur le rôle de la protéine RPS15 dans ce processus d'exportation concerne son implication potentielle dans le maintien de la conformation du pré-40S, dans le recrutement des facteurs préribosomiques, ou encore dans la médiation de l'interaction entre le pré-40S et les protéines responsables de l'exportation nucléaire (Leger-Silvestre et al., 2004).

C.2.2/ L'exportation du complexe pré-60S du noyau vers le cytoplasme

L'exportation des particules pré-60S est un transport actif qui est dépendant de nombreux constituants du NPC, ainsi que du système RanGTAase contrôlant la direction du transport (Gleizes et al., 2001; Hurt et al., 1999; Stage-Zimmermann et al., 2000). Il a été montré que Crm1p est le contributeur majeur de ce processus : il se lie à son substrat par reconnaissance d'un signal d'exportation (NES), constitué d'une séquence riche en leucines. Cette séquence se trouve dans la protéine Nmd3p, un facteur trans-activateur associé à la particule pré-60S, qui sert d'adaptateur (Zemp and Kutay, 2007). L'étape de l'exportation des particules pré-60S requiert aussi des protéines chaperonnes, Rrp12p (Oeffinger et al., 2004) et Mtr2p (Yao et al., 2007), un autre médiateur de l'exportation nucléaire. Panse et ses collaborateurs ont montré en 2006 que la désumoylation des facteurs transactivateurs par Ulp1p, une protéine du NPC, est importante pour une exportation efficace du pré-60S (Panse et al., 2006). De même en 2010, il a été montré dans les cellules humaines et dans les oocytes de grenouille que la protéine exportine 5 (Exp5) est essentielle pour l'exportation des sous-unités 60S du noyau vers le cytoplasme, puisqu'en son absence, l'exportation des particules ribosomiques 60S est défailante (Wild et al., 2010).

C.2.3/ La maturation cytoplasmique des deux sous-unités ribosomiques

La plupart des facteurs transactivateurs qui sont associés aux particules pré-ribosomiques dans les premières étapes de la biogenèse des ribosomes sont relargués et recyclés dans le nucléole. Cependant un certain nombre de ces facteurs restent associés aux particules lorsqu'elles sont exportées dans le cytoplasme. Le relargage et le recyclage de ces facteurs, l'assemblage des dernières r-protéines aux sous-unités ribosomiques, ainsi que d'autres événements finaux de maturation des ARNr constituent les dernières étapes de la maturation cytoplasmique des sous-unités 40S et 60S.

Concernant le complexe pré-60S, les facteurs transactivateurs sont relargués dans le cytoplasme et sont ré-importés dans le noyau pour être recyclés. Par exemple, le relargage de Crm1p requiert Lsg1p, une GTPase associée à la particule tardive pré-60S. De même, le relargage de Nmd3p exige RPL10. Au contraire, d'autres facteurs tel que Tif6p (homologue de eIF6 chez les mammifères) sont recrutés afin d'éviter l'association précoce des sous-unités 60S et 40S. Cette protéine Tif6p sera relarguée lorsque les deux sous-unités seront recrutées pour traduire un ARNm (Zemp and Kutay, 2007).

La maturation cytoplasmique de la particule pré-40S consiste en deux évènements : un réarrangement structural permettant de générer une sous-unité 40S mature et un clivage endonucleolytique final du pré-ARNr en ARNr 18S mature par Nob1 (Lamanna and Karbstein, 2009; Pertschy et al., 2009). Le changement de conformation est régulé par des phases de phosphorylation de RPS3, de Ltv1 et de Enp1 (Schafer et al., 2006). Cette étape permet de libérer le sub-complexe formé par ces trois protéines de la sous-unité pré-40S ; RPS3 est ensuite déphosphorylée pour pouvoir être réintégrée dans la sous-unité 40S mature.

C.3/ L'association des ARNr et des r-protéines

La conformation des ARNr semble être très importante pour la fixation des r-protéines. En effet, un changement de celle-ci est observée lors de la fixation de chaque nouvelle protéine permettant ainsi de dévoiler de nouveaux sites de fixation pour d'autres r-protéines (Hill et al., 1990). Les r-protéines qui ne s'associent pas aux ARNr seront très rapidement dégradées par le protéasome dans le nucléoplasme (Lam et al., 2007). En effet, le traitement des cellules HeLa à l'actinomycine D, molécule chimique qui bloque l'activité transcriptionnelle de la Pol I (arrêt de la synthèse des ARNr 28S, 18S et 5,8S), a permis de déterminer la demi-vie des r-protéines : cette demi-vie varie entre 30 et 100 minutes selon les r-protéines (Warner, 1977).

Chez les procaryotes et eucaryotes, la vision classique du ribosome était qu'il n'existait qu'une copie des r-protéines dans un ribosome, excepté le cas de RPL7 et RPL12. Cependant, des données récentes viennent ébranler cette vision révélant que la composition des ribosomes en r-protéines pourrait varier selon les conditions physiologiques.

En effet, chez *E. coli*, en présence de l'antibiotique Kasugamycine, des transcrits particuliers sont traduits par des complexes ribosomiques 61S. Ces ribosomes inhabituels, fonctionnels, sont dépourvus de 6 r-protéines dans la petite sous-unité telles que RPS1, RPS2, RPS6, RPS12, RPS18, et RPS21 (Kaberina et al., 2009). Le manque de ces protéines pourrait être dû à des changements structuraux au niveau de la partie 3' de l'ARNr 16S.

Un autre cas très parlant a été décrit chez la levure. A l'issue d'évènements de duplication dans son génome, il existe des gènes paralogues codant les r-protéines. Ces paralogues ont une séquence nucléotidique similaire, cependant il a été montré que le recrutement de paralogues spécifiques est requis pour la traduction de certains messagers particuliers. Cette caractéristique semble toutefois restreinte à un petit groupe de r-protéines. Leurs études réalisées avec différentes souches de levure mutantes suggèrent qu'il existe une population hétérogène de ribosomes composés de différentes combinaisons de r-protéines paralogues, de r-protéines subissant des modifications post-traductionnelles et de différentes formes d'ARNr. Ces différents ribosomes pourraient assurer la traduction de certains ARNm spécifiques évoquant ainsi l'existence d'un « code ribosomique » (Komili et al., 2007).

La biogenèse des ribosomes constitue un processus important dans les cellules car elle est une composante importante de la machine traductionnelle, responsable de la synthèse protéique. Ainsi, le contrôle de la biogenèse des ribosomes apparaît primordial puisque des modifications quantitatives et qualitatives des ribosomes peuvent induire des bouleversements importants dans l'expression génique pouvant

avoir de graves conséquences. La régulation de la biogenèse des ribosomes par différentes voies de signalisation, par des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs vous sera présentée dans la partie suivante de mon introduction bibliographique.

PARTIE III

Ribosomes, cancers et « ribosomopathies »

Fonctions extra-ribosomiques et Pathologies

A/Ribosomes, cancers et « ribosomopathies »

La biogenèse des ribosomes est un processus qui est très finement contrôlé par différents facteurs tels que des voies de signalisation, des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs. En effet, il a été observé que lorsque ces facteurs sont anormalement exprimés, il y a une biogenèse défectueuse des ribosomes. Les données obtenues ces dernières années ont montré un lien entre des changements soit quantitatifs, soit qualitatifs des ribosomes et une augmentation des risques de développer un cancer ou des «ribosomopathies» (Ruggero and Pandolfi, 2003).

A.1/ Ribosomes et cancers

Comme il a été décrit dans la partie précédente, la biogenèse des ribosomes se déroule dans le nucléole, ce qui fait que historiquement le nombre et la taille des nucléoles servaient comme premiers marqueurs pour dépister le développement de cancers. En effet, une cellule cancéreuse a besoin d'une synthèse protéique importante afin de répondre aux besoins engendrés par sa forte prolifération, se traduisant par une augmentation de la biogenèse des ribosomes, visible par l'observation de la taille et du nombre de nucléoles dans le noyau. La biogenèse des ribosomes est sous le contrôle de voies de signalisation, de protéines codées par des proto-oncogènes et par des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces protéines sont aussi généralement impliquées dans le contrôle de l'entrée et de la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Montanaro et al., 2011). En conséquence, les dysfonctionnements de ces régulateurs en amont de la biogenèse des ribosomes pourraient être responsables non seulement d'un défaut de synthèse de ribosomes, mais aussi de l'altération des mécanismes contrôlant la prolifération cellulaire, de la progression des cellules dans le cycle cellulaire et de la mort cellulaire.

A.1.1/ La voie de signalisation PI3/AKT/mTOR

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, qui est très conservée entre différentes espèces au cours de l'évolution, régule le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, la synthèse des protéines et le métabolisme, en réponse aux signaux présents dans l'environnement cellulaire tels que les facteurs de croissance. Ces derniers peuvent être les facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGF : Insulin-like Growth Factor), les facteurs de croissance épidermiques et endothélio-vasculaires (VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor), ou encore des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF : Platelet-Derived Growth Factor). Ils se lient à leurs récepteurs TKR (Tyrosine Kinase Receptor) qui ont une activité tyrosine kinase et les activent. Une fois que ces récepteurs localisés soit à la surface cellulaire, soit au niveau de l'enveloppe nucléaire, sont activés, ils induisent une cascade de signaux intracellulaires *via* la phosphorylation des protéines PI3K (PhosphoInositol-3-Kinase) et AKT (Serine/threonine protein kinase). La forme phosphorylée de la protéine AKT va à son tour activer, entre autre, la voie de signalisation mTOR, qui induit ensuite la biogenèse des ribosomes (Azim et al., 2010).

mTOR est une protéine à activité sérine/thréonine kinase qui est un composant des complexes mTORC1 et mTORC2 dans la cellule. Ici, nous allons nous intéresser uniquement au complexe mTORC1 (mTOR Complexe 1), du fait de son rôle important dans la régulation de la biogenèse des ribosomes. mTORC1 est un complexe hétéro-trimérique composé d'une sous-unité catalytique, mTOR, d'une protéine régulatrice de l'activité de mTOR, connue sous le nom de Raptor, et d'une sous-unité mLST8 (Mammalian Lethal with Sec13 Protein 8), mieux connue sous la nom de G β L, qui participe dans la stabilisation de l'interaction entre mTOR et Raptor (Kim et al., 2002; Kim et al., 2003). Plus récemment, deux nouveaux constituants de ce complexe ont été identifiés, il s'agit de PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa) et FKBP38 (FK506 Binding Protein 38) (Bai et al., 2007; Sancak et al., 2007) ([Figure 14](#)).

Les cibles identifiées de mTORC1 sont la protéine kinase p70S6K1, protéine responsable de la phosphorylation de la protéine ribosomique S6, et le facteur

d'initiation de la traduction 4E-BP1, qui module la traduction cap-dépendante (Jefferies et al., 1997). Le complexe mTORC1 phosphoryle la protéine kinase p70S6K1, qui active à son tour les facteurs TIF-IA (Transcription Initiation Factor IA) et UBF (Upstream Binding Factor), deux protéines essentielles pour l'activité transcriptionnelle de la Pol I. En effet, Hannan et ses collaborateurs ont montré d'une part que l'inactivation de la voie mTOR par la rapamycine induisait une inhibition de la transcription des gènes d'ARNr dans les cellules NIH3T3 en cours de prolifération et dans les cellules du muscle cardiaque non-proliférantes (Hannan et al., 2003). D'autre part, Mayer et ses collaborateurs ont observé que l'expression exogène de *mTOR* ou de *p70S6K1* permet de rétablir la transcription normale des gènes d'ARNr (Mayer et al., 2004).

L'autre cible de mTORC1 est le facteur 4E-BP1 qui séquestre le facteur eIF-4E, facteur essentiel pour la phase d'initiation de la traduction des messagers, dans les conditions où la synthèse protéique n'est pas requise. Lorsque la voie de signalisation mTOR est activée, mTORC1 phosphoryle directement le facteur 4E-BP1 permettant ainsi sa dissociation avec le facteur eIF-4E, qui se retrouve libre dans le cytoplasme, et qui peut alors initier la traduction des ARNm contenant une région 5' UTR particulière, tels des messagers de protéines participant dans la prolifération cellulaire : la Cycline D1 et la protéine c-Myc. De plus, il a été montré que l'augmentation du taux de la cycline D par le complexe mTORC1 conduisait à une synthèse plus importante des ARNr dans les cellules hypertrophiées du muscle squelettique (Nader et al., 2005).

D'autres expériences menées chez la levure ont montré que l'inhibition de la voie TOR par la rapamycine induisait une répression de l'expression des gènes de r-protéines (Preiss et al., 2003) ([Figure 15](#)). La transcription des gènes de r-protéines chez la levure est sous le contrôle de deux facteurs, SFP1 (Split Finger Protein 1) et FHL1 (Fork Head-Like 1) et dans les conditions normales, le facteur SFP1 est activé par la voie TOR et se lie au promoteur des gènes de r-protéines permettant ainsi leur transcription. Dans ces mêmes conditions, TOR maintient le co-represseur CRF1 (CoRepressor with FHL1) du facteur FHL1 dans le cytoplasme et permet la migration

de FHL1 dans le noyau, induisant ainsi la transcription des gènes de r-protéines (Martin et al., 2004).

La voie TOR contrôle aussi la transcription par la Pol III en modulant d'une part son activité et d'autre part, le facteur d'initiation de la transcription TFIIB permettant en conséquence la transcription de l'ARNr 5S (Mayer and Grummt, 2006) ([Figure 15](#)). Des études menées dans des cellules de mammifères ont permis de faire les mêmes observations : l'inhibition de mTOR atténue l'activité transcriptionnelle de la Pol III (White, 2005) et cette répression résulte d'une baisse des interactions entre les différents facteurs de transcription TFIIB et TFIIC, avec les gènes de l'ARNr 5S (Mayer and Grummt, 2006).

Par sa capacité à contrôler l'activité des trois ARN Polymérase, la régulation fine de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est essentielle pour le maintien d'une prolifération normale des cellules. Ainsi, une stimulation aberrante de cette voie, par *v-erbA* (Gonin-Giraud et al., 2008) ou par les mutations activant soit la sous-unité catalytique de PI3K, soit la protéine AKT pourrait induire une biogenèse des ribosomes défectueuse favorisant en conséquence le développement de certains cancers tels que les cancers de la prostate, du sein, des poumons, des mélanome...D'autre part, des résultats semblables ont été observés lors d'une suppression de la fonction biologique de PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), un suppresseur de tumeur en amont de la voie de signalisation mTOR ([Figure 14](#)). En effet, PTEN est une protéine phosphatase qui fonctionne en tant que régulateur négatif de cette voie de signalisation dont l'action est de neutraliser l'activité kinase de la protéine PI3K. C'est un suppresseur de tumeur car les mutations conduisant à une protéine PTEN non fonctionnelles ont été observées chez de nombreux cancers. Les mutations de *PTEN* ont été trouvées dans une série de tumeurs. Ainsi, les mutations du gène *PTEN* conduisant à une suppression de l'activité de ce gène induisent une activation constitutive de la voie de signalisation en aval AKT/mTOR et en conséquence, une biogenèse aberrante des ribosomes, associée à une prolifération anormale des cellules.

A.1.2/ Les proto-oncogènes

A.1.2.1/ Le proto-oncogène *c-myc*

Le gène *c-myc* code un facteur de transcription, une protéine nucléaire, dont la sur-expression pourrait induire le développement de nombreux cancers (Dang et al., 2006; Grandori et al., 2000), tels que les leucémies hématologiques humaines et des tumeurs solides (Vita and Henriksson, 2006). Des expériences ont montré que la sur-expression *c-myc* pouvait induire une augmentation de l'expression de la cycline *Cdk11*, qui est requise pour une progression mitotique efficace de la phase G2 à la phase M (Ruggero, 2009). De ce fait, une sur-expression de ce proto-oncogène est très néfaste et pourrait être à l'origine de différents cancers comme celui de la prostate (Zafarana et al., 2012), ou les carcinomes colorectaux (Myant and Sansom, 2011).

De nombreuses observations chez les vertébrés suggèrent que c-Myc régule la biogenèse des ribosomes et en conséquence la traduction des ARNm *via* le contrôle de la transcription des gènes d'ARNr (Grandori et al., 2005) et des r-protéines (Kim et al., 2000), ainsi que celle des gènes codant des facteurs impliqués dans la maturation des ARNr, dans l'exportation des sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme (Schlosser et al., 2003; Zeller et al., 2001) et dans l'initiation de la traduction des ARNm.

Régulation de la transcription des gènes d'ARNr par *c-myc*

Des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence la fixation de c-Myc au niveau de la région promotrice des clusters de gènes codant les ARNr 18S, 5,8S et 28S en activité (Arabi et al., 2005). La fixation de c-Myc est corrélée avec la présence accrue du facteur TRRAP (Transformation/Transcription domain Associated-Protein), protéine ayant une activité acétyl-transférase. TRRAP est responsable de l'augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 des nucléosomes en amont de la région promotrice des gènes d'ARNr, permettant ainsi l'ouverture de la région chromatinienne où se trouvent les

gènes des ARNr. De plus, c-Myc recrute des co-facteurs de la Pol I tels que les facteurs UBF et SL1 qui sont essentiels pour initier l'activité transcriptionnelle de cette polymérase au niveau des gènes d'ARNr. Ainsi, c-Myc régule la transcription des clusters des gènes d'ARNr, d'une part en remodelant la structure chromatinienne et d'autre part, en interagissant avec les co-facteurs qui sont requis pour le recrutement de la Pol I.

c-Myc régule aussi la transcription par la Pol III des gènes d'ARNr 5S, qui se trouve dans des régions chromosomiques hors nucléoles, en interagissant directement avec le facteur de transcription TFIIB (Gomez-Roman et al., 2003).

Régulation de la transcription des gènes de r-protéines et des co-facteurs par *c-myc*

Les expériences de suppression de l'expression de *c-myc* dans le modèle murin d'ostéosarcomes ont montré une corrélation entre le taux de c-Myc et celui des transcrits de r-protéines ; en effet, la suppression de *c-myc* s'accompagne d'une réduction de l'expression de nombreux gènes de r-protéines (Wu et al., 2008). Au contraire, il a été montré que c-Myc peut induire une augmentation du taux des r-protéines dans des lignées de neuroblastomes humains (Boon et al., 2001). Ces observations montrent que c-Myc régule ainsi la transcription des gènes de r-protéines *via* la transcription dépendante de la Pol II . Par ce même biais, c-Myc coordonne aussi la transcription des gènes codant des protéines requises pour la maturation des particules pré-ARNr et des protéines jouant un rôle dans le transport des sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme : la protéine nucléolaire NOP56, BOP1 (Block Of Proliferation 1), la fibrillarine (FBL), la dyskérine (DKC1) et les plus importantes, la nucléoline (NCL) et la nucléophosmine (NPM1).

Ainsi, le proto-oncogène *c-myc* est capable de contrôler la biogenèse des ribosomes à différents niveaux, ce qui lui confère une capacité à initier et à maintenir la transformation cellulaire. Ainsi, une mutation conduisant à une sur-expression de *c-myc* dans une cellule normale pourrait induire une augmentation de

la biogenèse des ribosomes. Ce processus, en association avec d'autres mécanismes d'action de *c-myc*, favoriserait une prolifération excessive des cellules et le processus de transformation cellulaire.

A.1.2.2/ La protéine nucléophosmine

La protéine nucléophosmine (NPM), connue sous différents noms, B23, ou la numatrine ou NO38, est impliquée dans de nombreuses tumeurs humaines (Colombo et al., 2011) : en effet, l'augmentation de l'expression de la nucléophosmine est souvent associée à différents types de tumeurs solides, alors que l'inactivation de sa fonction est caractéristique d'un sous-groupe de pathologies hématologiques. Le gène *NPM1* codant la nucléophosmine est muté dans un tiers des cas de leucémies myéloïdes aiguës (AML : Acute Myeloid Lymphoma) chez les adultes (Colombo et al., 2006), dans certains cas de lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCL : Anaplastic Large Cell Lymphoma) (Morris et al., 1994), dans les syndromes myélodysplasiques (MDS : MyeloDysplastic Syndrome), et dans les leucémies promyélocyaires aiguës (Redner et al., 1996)...

La nucléophosmine est une protéine exprimée de manière ubiquitaire qui appartient à la famille des protéines histones chaperonnes nucléophosmines. La NPM est majoritairement présente dans la zone granuleuse du nucléole (Wang et al., 1993) et elle est capable de se lier à l'ARN. Par cette liaison, elle participe à la fois à la maturation des ARNr (Savkur and Olson, 1998) et à l'assemblage des sous-unités pré-ribosomiques. Plus récemment, il a été montré que la NPM se lie à la région intergénique ITS2 du pré-ARNr 38S permettant ainsi la maturation de l'ARNr 28S. De plus, une proportion de la NPM transite de manière permanente entre le noyau et le cytoplasme, ce qui pourrait lui conférer une fonction dans l'exportation des sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme.

Chez le modèle murin *Em-Myc*, il a été montré qu'une expression haploinsuffisante de *NPM* d'une part, induisait une accélération significative vers le développement des lymphomes et d'autre part, pourrait augmenter la probabilité de

ces souris d'avoir des tumeurs myéloïdes malignes (Grisendi et al., 2005). Ces résultats sembleraient affecter une fonction de suppresseur de tumeur à la nucléophosmine.

A.1.3/ Les suppresseurs de tumeurs

A.1.3.1/ La protéine p14Arf

p14Arf est une protéine suppresseur de tumeur codée par le gène *arf* dont l'expression pourrait être induite par une série de signaux de stress tels que les signaux d'hyper-prolifération cellulaire provenant de la sur-expression du proto-oncogène *ras* ou encore celle de *c-myc*. L'analyse de différentes cellules tumorales a montré que le gène *arf* est très fréquemment muté ou a subi un processus de mise en silence (Lowe and Sherr, 2003).

Des expériences très élégantes de suppression de l'expression de *arf* dans le modèle murin Eμ-Myc ont mis en évidence une accélération du développement des lymphomes chez ces animaux. Ceci est dû à une inactivation de p53 en inhibant la liaison avec ses co-activateurs et sa dégradation par le protéasome. Ce modèle animal présente d'une part une sur-expression de *c-myc*, et d'autre part une mutation ponctuelle C305F, qui remplace une cystéine par un phénylalanine, en position 305 de la protéine Mdm2, provoquant une impossibilité de fixation de p14Arf au niveau du motif en doigt de zinc de Mdm2 (Macias et al., 2010). D'autres expériences ont montré que p14Arf est capable de ralentir la biogenèse des ribosomes en ubiquitinant et en induisant la dégradation de la nucléophosmine, une protéine essentielle pour la maturation de l'ARNr 28S (A.1.2.2) (Rizos et al., 2006). De plus, il a été montré que lorsque p14Arf est sur-exprimé, son partenaire UBF se trouve sous sa forme hypophosphorylée, non compatible avec son recrutement par le complexe transcriptionnel polymérase I (Ayrault et al., 2006). En conséquence, la perte de l'expression de p14Arf pourrait être responsable de l'augmentation de la biogenèse des ribosomes et donc favoriser la transformation cellulaire.

A.1.3.2/ La protéine RB

Le suppresseur de tumeur Rb (Rétinoblastome) existe sous deux formes dans les cellules, une forme active non phosphorylée et une forme inactive, phosphorylée ([Figure 14](#)). Des expériences ont montré que la protéine Rb régule la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire : sa forme inactive phosphorylée favorise la biogenèse des ribosomes. La forme active (non phosphorylée) de Rb inhibe la synthèse des ARNr en séquestrant le facteur UBF (Ciarmatori et al., 2001) et la transcription par la Pol III en se liant au facteur TFIIB (Felton-Edkins et al., 2003; White et al., 1996). Dans les conditions physiologiques, lorsque les cellules sortent de la phase G₀ et entrent dans la phase G1 du cycle cellulaire, une phosphorylation progressive de la protéine Rb a lieu, induisant en conséquence une augmentation de la synthèse des ARNr 45S, et en conséquence de la biogenèse des ribosomes, nécessaire à une synthèse accrue des protéines requise pour la division cellulaire. Dans les cancers humains, des mutations du gène *Rb*, conduisant soit à une inactivation de la protéine Rb, soit à une hyper-phosphorylation de la protéine Rb, annulent ou réduisent très fortement le contrôle négatif de la protéine Rb sur la biogenèse des ribosomes (Montanaro et al., 2008).

A.1.3.3/ La protéine p53

p53 est une protéine codée par *TP53* (Tumor Protein 53) qui est, dans les conditions physiologiques normales, maintenue à un taux assez faible dans la cellule. Il a été répertorié plus de 30 000 mutations somatiques de p53 dans divers cancers depuis ces 20 dernières années (Soussi, 2011) et dans 50% des cancers chez l'être humain, une mutation de *TP53* a été détectée (Soussi and Wiman, 2007). La régulation de son taux est, entre autre, sous le contrôle de la protéine Mdm2 (Mouse Double Minute 2). Cette dernière possède une activité enzymatique d'ubiquitinylation-ligase E2 qui est responsable de l'ubiquitinylation de p53 et de sa dégradation. De plus, le domaine N-terminal de Mdm2 se lie au domaine de transactivation de p53 et inhibe ainsi le recrutement de ses co-activateurs. Des données récentes ont montré que Mdm2 peut se lier à certaines protéines

ribosomiques telles que RPL11 (Lohrum et al., 2003), RPL5 (Dai and Lu, 2004), RPL23 (Dai et al., 2004), RPS7 (Duan et al.), RPL26 (Ofir-Rosenfeld et al., 2008) et RPS3 (Yadavilli et al., 2009). Dans des conditions de stress ribosomique, les formes libres de ces r-protéines sont délocalisées du nucléole vers le nucléoplasme et sont alors associées à la protéine Mdm2, induisant ainsi la stabilité et l'activation de p53.

Un modèle cellulaire présentant une mutation ponctuelle du gène *mdm2* a été développé, dont la cystéine en position 305 (au niveau du motif en doigt de zinc) a été remplacée par une phénylalanine (C305F). Cette forme mutée est ainsi incapable de s'associer à des r-protéines, et ubiquitinyler de manière constitutive la protéine p53. Dans ce modèle, il a été montré que la réponse de p53 vis-à-vis des dommages à l'ADN est intacte alors que celle au stress ribosomique est défectueuse à cause de la mutation C305F au niveau du motif en doigt de zinc qui rend impossible la fixation des protéines RPL11 et RPL5 sur la protéine Mdm2 (Lindstrom et al., 2007). En conséquence, ces mutants Mdm2 sont insensibles à la régulation du taux de p53 par les r-protéines et maintiennent un état d'inactivation permanente de p53. *In vivo*, Macias et ses collaborateurs ont créé un modèle génétique murin portant la même mutation à l'état homozygote, *Mdm2*^{C305F/C305F} (Macias et al., 2010), qui ne présentent pas de différences phénotypiques avec les souris sans mutation, dans les conditions normales. Lorsque ces souris sont soumises à des traitements chimiques qui ciblent spécifiquement le stress ribosomique comme l'actinomycine D, on observe une défaillance de la réponse cellulaire, *i.e.*, une diminution de la réponse p53 et un défaut d'induction de l'arrêt du cycle cellulaire. Pour mieux comprendre la relation entre le contrôle de la réponse au stress ribosomique et le développement de cancers, un autre modèle murin dérivé de *Mdm2*^{C305F/C305F} a été développé au sein du même groupe. Ce modèle présente un fond de mutation homozygote *Mdm2*^{C305F/C305F}, mais associé en plus à une sur-expression de *c-myc*: c'est le modèle murin *Em-Myc/Mdm2*^{C305F/C305F}. Ces souris développent très rapidement des lymphomes et meurent très jeunes. L'analyse des splénocytes provenant de ces souris montrent une forte induction de l'expression de *c-myc* *via* la protéine RPL11 dans le noyau et dans le cytoplasme. Par contre, aucune interaction entre RPL11 et Mdm2 n'a été observée. De plus, la réponse de p53 face au processus de transformation induit par *c-myc* est

défectueuse (Dai et al., 2007a). Ces données montrent clairement que l'intégrité de la voie de signalisation r-protéine-Mdm2-p53 est essentielle pour empêcher le développement des lymphomes induite par le proto-oncogène *c-myc in vivo*.

L'article publié par Thierry Soussi en 2011 répertorie toutes les mutations de p53 observées, ainsi que leurs conséquences dans différents cancers. Ainsi, il a été montré qu'une accumulation de p53 inhibe la transcription dépendante de Pol I en séquestrant le facteur SL1 qui est essentiel pour le recrutement de la Pol I sur la région promotrice des gènes d'ARNr. Au contraire, la forme inactive de p53 n'est plus capable de séquestrer le facteur SL1 et induit en conséquence une transcription excessive des gènes d'ARNr. Ce mécanisme pourrait favoriser ainsi une augmentation de la biogenèse des ribosomes et une prolifération cellulaire incontrôlée (Zhai and Comai, 2000).

A.2/ Les « ribosomopathies »

Les maladies associées à un défaut de la biogenèse des ribosomes composent une classe de pathologies rares, présentant des phénotypes cliniques hétérogènes. Ces défauts peuvent être dus à des mutations des gènes codant les r-protéines, c'est le cas de l'anémie de Diamond-Blackfan ou du syndrome 5-q, ou à des mutations des gènes de protéines participant à la maturation des ARNr, à l'assemblage des sous-unités pré-ribosomiques ainsi qu'à l'exportation des sous-unités ribosomiques dans le cytoplasme (le syndrome de Shwachman-Diamond, la Dyskératose congénitale, l'hypoplasie « cartilage-cheveux » ou encore le syndrome de Treacher Collins).

A.2.1/ L'anémie de Diamond-Blackfan

L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA : Diamond-Blackfan Anemia) a été décrite pour la première fois en 1936 par H.W. Josephs et caractérisée deux ans plus tard, en 1938 par L. K. Diamond et K. D. Blackfan (Diamond and Blackfan, 1938).

Cette maladie se caractérise par une anémie due à une diminution (présence de moins de 5%) voire absence sélective des précurseurs érythrocytaires, une prolifération faible des cellules érythrocytaires, une augmentation de la sensibilité des progéniteurs érythrocytaires à l'apoptose, une macrocytose et une réticulocytopenie (Da Costa et al., 2010).

L'incidence de cette maladie est estimée à 7 cas / million de naissances vivantes. Les patients atteints de cette pathologie présentent un taux élevé d'adénosine désaminase dans les globules rouges et des anomalies physiques telles que des malformations plus ou moins sévères au niveau de la face, des extrémités des membres, de la sphère urogénitale et du cœur (Chen et al., 2005; Leblanc et al., 2003; Willig et al., 2000). De plus, ces patients présentent un risque plus important face à des hémopathies malignes et certaines tumeurs solides (Lipton et al., 2001).

Les mutations hétérozygotes dans des gènes de r-protéines ont été identifiées chez environ 70% des patients atteints. Actuellement, il existe une base de données relatant les mutations observées dans la DBA (Boria et al., 2010). Les mutations du gène *RPS19* sont les plus fréquemment observées dans la DBA. Ces mutations touchent la région promotrice, les séquences introniques, et l'ensemble de la séquence codante d'un seul allèle du gène *RPS19*. L'équipe de P-E. Gleizes ont montré pour la première fois le lien entre une haploinsuffisance en r-protéine, et en conséquence, un défaut de la biogenèse des ribosomes, et la DBA (Choesmel et al., 2007; Choesmel et al., 2008; Leger-Silvestre et al., 2005).

Gazda et ses collaborateurs ont identifiés d'autres mutations impliquées dans la DBA qui affectent les gènes *RPL5* et *RPL11*. Les mutations du gène *RPL11* ont été observées dans 5% des patients. Les patients ayant des mutations de *RPS5* montrent des anomalies physiques importantes telles que fentes labiales et palatines. Actuellement, on compte 14 gènes de r-protéines mutés dans la DBA ([Tableau 2](#)) : *RPS19*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS7*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPL36*, *RPS27a*, *RPS15* (Aguissatou et al., 2009), *RPS26*, *RPS10* (Doherty et al., 2010), *RPS27* et *RPL26* (Gazda et al., 2012). 70% des patients atteints ont un gène muté dans une protéine ribosomique. Nous notons que ces gènes codent des r-protéines à la fois de la petite

et de la grande sous-unités ribosomiques, ce qui conforte l'hypothèse d'un lien entre la DBA et la biogenèse ou la fonction des ribosomes (Aguissa-Toure et al., 2009).

Les deux premiers gènes mutés au cours de la DBA sont ceux de *RPS19* et *RPS24*. Ces mutations induisent une maturation défectueuse de l'ARNr 18S, qui entraîne en conséquence une diminution du taux de synthèse des sous-unités 40S. L'étude du rôle de RPS19 dans la biogenèse des ribosomes chez *S. cerevisiae* a mis en évidence sa participation dans le clivage des pré-ARNr au niveau du site ITS1 au cours de la maturation des ARNr (Leger-Silvestre et al., 2005). De plus, l'interruption de la synthèse de RPS19 induit la formation de particules pré-40S anormales qui s'accumulent dans le noyau et qui sont rapidement dégradées en absence de synthèse de l'ARNr 18S. Concernant la mutation du gène *RPS24*, l'équipe de P. E. Gleizes a montré chez les mammifères qu'elle est associée à un défaut d'élimination du 5' ETS, présent initialement sur le pré-ARNr 45S (Choesmel et al., 2008). Les mutations observées chez les patients présentant une DBA, dans les autres gènes de r-protéines peuvent jouer un rôle dans les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes (Figure 17) ; plus spécifiquement les mutations des gènes *RPL35A*, *RPL5* et *RPL11* induisent une maturation retardée des ARNr 5,8S et 28S (Farrar et al., 2008; Gazda et al., 2008).

A.2.2/ Le syndrome 5q-

Le syndrome 5q- a été relaté pour la première fois en 1974 par H. Van Den Berghe suite à une étude menée sur 3 patients qui présentaient une anémie réfractaire et une délétion interstitielle chromosomique sur le bras long du chromosome 5 (Van den Berghe et al., 1974). Le syndrome 5q- est une forme particulière des syndromes myélodysplasiques (MDS : Myelodysplastic syndrome) correspondant à un groupe hétérogène de défauts de la moelle osseuse, caractérisés par une hématopoïèse inefficace. Cette pathologie est caractérisée par une anémie macrocytaire, un taux de plaquettes normal ou mais le plus souvent élevé, une

prépondérance de mégacaryocytes monolobulés, et un risque faible de développer une leucémie myéloïde aiguë (Sato et al., 2004).

Une région chromosomique déletée sur le chromosome 5 a été identifiée en 1994 comme étant responsable du syndrome 5q- : il s'agit d'une région d'environ 1,5 Mb se trouvant entre le 5q31 et le 5q32 (Boulwood et al., 1994; Boulwood et al., 2002). Cette région déletée contient une proportion importante de gènes qui s'expriment normalement dans les cellules hématopoïétiques CD34+. En conséquence, les anomalies chimico-biologiques observés dans le syndrome 5q- pourraient être dus à une haploinsuffisance d'expression d'un ou de plusieurs de ces gènes (Pellagatti et al., 2008).

En 2008, l'implication de l'haploinsuffisance d'expression de *RPS14* dans les défauts d'érythropoïèse du syndrome 5q- a été démontrée par des expériences de shRNA dirigés contre *RPS14* dans les progéniteurs hématopoïétiques humains CD34+. Les résultats montrent une perturbation significative de la différenciation des érythrocytes. L'expérience inverse, *i.e.*, une sur-expression de *RPS14* dans des cellules hématopoïétiques CD34+ prélevées chez des patients atteints du syndrome 5q- a permis la restauration de leurs caractéristiques initiales, c'est-à-dire, une différenciation normale. De plus, une accumulation des particules pré-ARNr 30S a été observée à la fois dans les cellules CD34+ de patients présentant un syndrome 5q- et dans des cellules dont l'expression de *RPS14* a été réprimée. En conséquence, il existe un défaut de synthèse des sous-unités ribosomiques 40S dans ces cellules (Ebert et al., 2008).

Des études récentes sur des modèles murins ont permis d'identifier d'une part, le gène *RPS14* et 7 autres gènes dans la région 5q31-5q32, et d'autre part une dérégulation de la voie de signalisation p53 dans le syndrome 5q- (Barlow et al., ; Ebert et al., 2008). Le gène *RPS14* code la r-protéine S14, qui se lie directement à l'ARNr 18S et qui est essentielle à l'assemblage des sous-complexes qui constituent l'ARNr 40S mature. Des études de déplétions d'homologues de la protéine ribosomique S14 humaine réalisées chez *S. cerevisiae* (*rp59*) et chez les bactéries (*RPS11*) ont montré un défaut d'assemblage des ribosomes et une accumulation des

sous-unités ribosomiques immatures dans les cellules (Larkin et al., 1987; Moritz et al., 1990).

De plus, les études de microarray réalisées chez les patients atteints du syndrome 5q- et d'autres MDS ont montré que le gène *RPS14* est un des gènes les plus sous-exprimés (1,46 fois) dans le syndrome 5q- (Boulwood et al., 2007). Des études plus récentes ont également montré une diminution de l'expression d'autres gènes de r-protéines tels que *RPS23*, *RPL28*, *RPL31* dans cette pathologie (Pellagatti et al., 2008).

D'autre part, l'utilisation d'un modèle murin présentant les caractéristiques cliniques du syndrome 5q- a permis de relier les mécanismes dépendants de la voie de signalisation p53 avec une haploinsuffisance de *RPS14* (Barlow et al., 2010).

Une des hypothèses proposées pour expliquer ces observations est le mécanisme induit par le stress ribosomique. Comme il a été décrit dans le paragraphe dédié à la protéine p53, le taux et l'activation de p53 sont régulés par la protéine MDM2. Dans le syndrome 5q-, la perturbation de la biogenèse des ribosomes due à un déficit de l'expression de *RPS14* pourrait induire un relarguage des protéines ribosomiques de la grande sous-unité 60S dans le nucléoplasme. Certaines de ces r-protéines telles que RPL11, RPL5, RPL23... se lieraient alors à MDM2, inhibant ainsi sa régulation négative sur p53 ([Figure 18](#)), ayant pour conséquence, une augmentation du taux et de l'activité de p53.

En effet, il a été montré que ces souris expriment un taux très élevé de p53 et un niveau important d'apoptose des cellules de la moelle osseuse, sous-entendant ainsi que l'augmentation de p53 serait responsable de cette mort cellulaire accrue (Barlow et al., 2010). Suite à ces résultats, Pellagatti et ses collaborateurs ont montré que l'expression de 10 gènes impliqués dans la voie de signalisation de p53 était fortement affectée chez les patients du syndrome 5q- : *fas*, *cd82*, *wig1*, *casp3*, *sesn3*, *tnfrsf10b (dr5)*, *mdm4*, *bax*, *ddb2* et *bid*. Neuf de ces gènes présentent un taux plus élevé chez les patients présentant le syndrome 5q-, alors qu'une diminution a été observée pour *mdm*, cette protéine étant un régulateur négatif de l'activité de p53. Les gènes *fas*, *dr5*, *bid*, *bax* et *wig1* sont des effecteurs du processus d'apoptose en

aval de p53, le gène *cd82* est impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse et du processus de métastase, et les gènes *ddb2* et *sesn3* activent la réparation de l'ADN et la prévention aux dommages à l'ADN (Pellagatti et al., 2010) .

Ces résultats permettraient d'expliquer l'observation d'une augmentation de l'apoptose de certains progéniteurs érythrocytaires de la moelle osseuse.

A.2.3/ Le syndrome de Shwachman-Diamond

Le syndrome Shwachman-Diamond (SDS) a été décrit pour la première fois en 1964 par Shwachman et ses collaborateurs en se basant sur l'étude de 5 enfants hospitalisés pour une fibrose kystique (Shwachman et al., 1964). Le SDS est une pathologie autosomale récessive qui présente une incidence estimée à 1 cas pour 50000 naissances. Ce syndrome est caractérisé par une insuffisance pancréatique concernant la partie exocrine, des défauts de la moelle osseuse, telle qu'une hématopoïèse inefficace et des anomalies du squelette (Ganapathi and Shimamura, 2008). Les patients atteints du SDS montrent un risque important pour le développement de la myélodysplasie et des transformations malignes.

En 2003, Boocock et ses collaborateurs ont identifié le gène dont la mutation est responsable de ce syndrome : il s'agit du gène *SBDS* (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome) (Boocock et al., 2003). Approximativement, 90% des patients de ce syndrome présentent des mutations bialléliques du gène *SBDS*, dont la majorité est due à une conversion génique entre le gène *SBDS* et son pseudogène adjacent *SBDSP*. Actuellement, la fonction exacte de la protéine SBDS n'a pas encore été déterminée, cependant on suppose son implication dans la biogenèse des ribosomes *via* sa participation dans une ou des étapes de la maturation tardive des sous-unités 60S, puisqu'elle a été co-immunoprécipitée avec la particule pré-60S (Ganapathi et al., 2007). Dans les cellules mutées pour le gène *SBDS*, une expression anormale de multiples gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes et une diminution de l'expression de certains gènes de r-protéines (RPS9, RPS20, RPL6, RPL15, RPL22, RPL23, et RPL29) ont été observées (Rujkijyanont et al., 2009).

En 2007, le groupe de A. J. Warren a montré que l'homologue du gène *SBDS* chez la levure, le gène *Sdo1*, joue un rôle déterminant dans la maturation de la sous-unité ribosomique 60S. La protéine Sdo1 est essentielle pour le relargage et le recyclage du facteur Tif6 (homologue de eIF6 chez les mammifères). Cette étape est nécessaire à la maturation tardive de la sous-unité 60S et permet l'assemblage de cette sous-unité avec la sous-unité 40S, et en conséquence, l'initiation de la traduction (Menne et al., 2007). Quelques années plus tard, en 2011, ce même groupe a utilisé une approche de co-immunoprécipitation pour démontrer l'implication de la protéine SBDS dans le processus de l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques 40S et 60S dans le cytoplasme. SBDS coopère avec le facteur d'élongation de la traduction EFL1 (GTPase Elongation Factor-like1), une GTPase qui participe dans le relargage du facteur eIF6, permettant ainsi l'assemblage des deux sous-unités, nécessaire à l'activation de la traduction des transcrits par les ribosomes (Wong et al., 2011).

A.2.4/ La dyskératose congénitale

Le premier cas de dyskératose congénitale (DC) a été décrit en 1910 par Zinsser. Cette maladie connue aussi sous le nom de syndrome de Zinsser-Cole-Engman est héréditaire, et se caractérise généralement par des anomalies de pigmentation de la peau, une dystrophie des ongles et des leucoplasies. D'autres signes cliniques sont retrouvés au niveau de tous les organes, mais plus particulièrement la moelle osseuse. L'incidence estimée de ce syndrome est d'un cas sur un million de naissance avec un ratio homme : femme de 3 pour 1. Les patients atteints de cette maladie montrent une pré-disposition importante au développement de leucémies, de tumeurs solides et de fibroses pulmonaires (Narla and Ebert, 2011). Les principales causes de la mort des patients sont dues à des défauts de la moelle osseuse (entre 60% à 70% des cas), des maladies pulmonaires (entre 10% à 15% des cas) et des tumeurs (10% des cas) (Dokal, 2011).

Trois modes de transmission de ce syndrome ont été identifiés : la DC récessive liée au chromosome X (OMIM : 305000) qui est la forme majoritairement observée ;

la forme autosomale dominante de la DC (OMIM : 127550) ; et la forme autosomale récessive de la DC (OMIM : 224230). Depuis 1998, 8 gènes mutés dans ce syndrome ont été identifiés : *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOPI0*, *NHP2*, *TIN2*, *C16orf57* et *TCAB1* (Dokal, 2011).

Les mutations du gène *DKC1*, responsables de la majorité des cas de la dyskératose congénitale, sont liées au chromosome X. Cette forme de DC est celle qui montre les phénotypes les plus sévères comparée aux autres formes de DC. Le gène *DKC1* se localise en position Xq28 et est fortement conservé au cours de l'évolution. Il code la protéine dyskérine, qui joue à la fois un rôle important dans la pseudo-uridylation des ARNr au cours de la biogenèse des ribosomes, mais aussi dans la stabilisation du composant ARN du complexe télomérase (Montanaro et al., 2011).

La forme autosomale dominante de la DC est due à des mutations hétérozygotes des gènes *TERC*, *TERT* et *TNF2*. Les gènes *TERC* et *TERT* codent les deux composants principaux du complexe ribonucléoprotéine télomérase : *TERT* (TElomerase Reverse Transcriptase) constitue le composant catalytique qui ajoute des séquences répétées TTAGGG à l'extrémité 3' de l'ADN au cours de la réplication ; et *TERC* agit en tant que protéine de stabilisation de la structure du complexe. Le gène *TNF2* code la protéine *TIN2*, un composant du complexe Shelterin qui détermine la structure de l'extrémité télomérique, qui est impliqué dans la génération des boucles T et qui contrôle la synthèse de l'ADN télomérique par la télomérase.

Cinq autres gènes ont été identifiés dans la forme autosomale récessive de la DC : *NOPI0*, *NHP2*, *TCAB1*, *C16orf57* et *TERT*. Chez les patients atteints de cette forme de DC, on observe une réduction de la longueur des télomères, suggérant que la perturbation du complexe télomérique seul pourrait induire une hématopoïèse défectueuse (Marrone et al., 2007).

Grâce à l'identification des gènes impliqués dans les différentes formes de DC, on pourrait penser que les télomères jouent un rôle important dans cette « ribosomopathie », et qu'ils pourraient apporter une contribution supplémentaire à celle du défaut de la biogenèse des ribosomes, qui n'est affectée que dans la forme liée à l'X.

A.2.5/ L'hypoplasie « cartilage-cheveux »

L'hypoplasie « cartilage-cheveux » (CHH), connue aussi sous le nom de chondrodysplasie métaphysaire de McKusick a été relatée pour la première fois en 1965 par McKusick et ses collaborateurs (McKusick et al., 1965). C'est une maladie héréditaire autosomale récessive qui est caractérisée par un nanisme reconnaissable dès la naissance, une hypoplasie des cheveux, un dysfonctionnement immunitaire, une anémie et une prédisposition élevée aux tumeurs, spécialement aux lymphomes non-Hodgkin et aux carcinomes des cellules basales. Cette maladie affecte surtout la population finlandaise bien que les premiers cas ont été identifiés dans la population des Amish.

Chez différentes familles d'Amish, la CHH se présente sous la forme de nanisme avec des membres courts causés par une dysplasie du squelette. L'incidence observée dans la population Amish est estimée à 1 naissance sur 1300 alors qu'elle est d'1 naissance sur 20000 chez les Finlandais.

En 2001, Ridanpää et ses collaborateurs ont identifié des mutations dans les régions non traduites du gène *RMRP* comme la cause principale de la CHH (Ridanpää et al., 2001). Le gène *RMRP* code un composant ARN du complexe de maturation des ARN mitochondriaux (RNase MRP), qui est considéré comme une snoRNA. Une des fonctions principales de ce complexe est son implication dans le clivage des particules pré-ARNr permettant la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 5,8S. De plus, l'analyse transcriptomique dans les cellules présentant des mutations du gène *RMRP* réalisée par Thiel et ses collaborateurs en 2005 a permis de mettre en évidence un taux élevé de messagers codant la cycline B2 (Thiel et al., 2005). Cette dernière est connue pour son rôle dans l'instabilité chromosomique du fuseau mitotique, ce qui suggère une autre explication possible pour le dysfonctionnement de la moelle osseuse observée chez les patients.

A.2.6/ Le syndrome de Treacher Collins

La première description des caractéristiques du syndrome de Treacher Collins a été faite par l'ophtalmologiste Treacher Collins en 1900. Cette pathologie autosomale dominante correspond à un trouble congénital du développement cranio-facial caractérisé par une dysplasie oto-mandibulaire bilatérale et symétrique, associée à diverses anomalies de la tête et du cou. L'incidence de cette maladie est estimée à 1 naissance sur 50 000. En 1996, des mutations dans le gène *TCOF1* (5q32-5q33.1) ont été identifiées comme responsables de ce syndrome. Le gène *TCOF1* code une protéine appelée Treacle (Group, 1996), qui est une protéine nucléolaire. Des études par immunofluorescence ont permis de montrer que Treacle colocalise avec le facteur UBF et l'ARN Pol I dans le nucléole. De plus, Treacle est un des constituants des complexes pré-ribosomiques. D'autres données obtenues plus tard montrent que Treacle est également essentielle pour la transcription des ARNr et qu'elle jouerait aussi un rôle dans la méthylation des ARNr (Valdez et al., 2004). Autres que les mutations de *TCOF1*, des mutations sur les gènes *POLR1C* (6q21.1) et *POLR1D* (13q12.2) qui codent les sous-unités des ARN Pol I et III, ont été observées chez l'être humain. Ces dernières données confortent l'idée qu'une biogenèse défectueuse des ribosomes est responsable des anomalies du syndrome Treacher Collins.

Les pathologies décrites ci-dessus sont la preuve que les mutations des gènes de r-protéines ou de facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes pourraient causer des maladies avec des phénotypes bien particuliers, restreints à certains types cellulaires en particulier les cellules hématopoïétiques, bien que leur expression soit ubiquitaire.

Une question émerge à la vue des caractéristiques cliniques de l'anémie de Diamond-Blackfan et du syndrome 5q- : comment une mutation dans les gènes de r-protéines pourrait-elle conduire à des défauts aussi particuliers ? Trois hypothèses

ont été proposées pour expliquer ces observations : 1/ l'haploinsuffisance d'une r-protéine qui conduit à un défaut de la biogenèse des ribosomes et à une accumulation d'autres r-protéines libres, dont certaines peuvent se lier à Mdm2 et induire ainsi une augmentation du taux et de l'activité de p53. Ce processus conduirait ainsi à un arrêt du cycle cellulaire et à une apoptose dépendants de p53, qui de manière ultime provoquerait une anémie dans la lignée érythrocytaire (Da Costa et al., 2010; Fumagalli et al., 2009; McGowan et al., 2008); 2/ la maturation défectueuse des sous-unités ribosomiques pourrait retarder la traduction des gènes de globines, induisant alors une accumulation de l'hème libre, qui pourrait provoquer une apoptose spécifique des érythrocytes et par conséquent une anémie (Keel et al., 2008); 3/ une accumulation des précurseurs ribosomiques et une traduction aberrante de transcrits par des ribosomes défectueux pourraient être responsables des caractéristiques de ces deux pathologies (Blazquez-Domingo et al., 2005).

B/Fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques et pathologies

Outre leur implication dans les ribosomes, certaines r-protéines présentent dans la cellule différentes fonctions appelées fonctions extra-ribosomiques. En effet, la découverte de différents motifs dans leur structure secondaire tels que le motif hélice-tour-hélice, le motif en doigt de zinc, ou encore le motif en fermeture éclair à leucine (Chan et al., 1994), permettant leur fixation sur les acides nucléiques (ADN ou ARN) a conduit la communauté scientifique à imaginer d'autres fonctions que celle du ribosome assurées par ces protéines.

Deux hypothèses concernant les premières fonctions des r-protéines ont été émises. Une hypothèse suggère l'existence d'un ribosome primordial, appelé Ur-

ribosome, qui ne contiendrait que l'ARNr et qui serait capable d'assurer, à lui seul, la synthèse des protéines (Wool, 1996). Les expériences montrant que le centre catalytique du ribosome est assuré par les molécules d'ARNr, soutiennent cette hypothèse. Les r-protéines auraient été alors recrutées plus tard, au cours de l'évolution, pour maintenir les ARNr dans leur configuration optimale pour leur fonction catalytique, afin d'augmenter la vitesse et l'efficacité de la traduction des transcrits. Ces r-protéines présenteraient donc des fonctions bien définies avant de s'associer aux sous-unités ribosomiques. Une autre hypothèse est que les r-protéines font partie initialement des éléments constituant des ribosomes, et que ces protéines ont acquis plus tardivement des fonctions non associées aux ribosomes. Ces deux hypothèses ne sont pas pour autant exclusives ; on pourrait imaginer qu'il existe un groupe initial de r-protéines qui étaient dès le début associées aux ARNr pour former des sous-unités ribosomiques et que d'autres r-protéines aient été recrutées au cours de l'évolution afin de stabiliser les structures d'ARNr au sein du ribosome (Wool, 1996).

B.1/ Les fonctions extra-ribosomiques des r-protéines

Le concept des fonctions extra-ribosomiques des r-protéines a émergé en 1974 après des observations faites chez le bactériophage Q β . Ce dernier produit un polypeptide qui est capable de se lier à des facteurs de traduction EFTu, EFTs et à la r-protéine S1 chez *E. coli* pour former une ARN répliqueuse, nécessaire à la répliqueuse de son génome (Blumenthal and Carmichael, 1979). A partir de cette observation, une hypothèse concernant une fonction non-ribosomique de RPS1 a été émise : RPS1 pourrait se lier à des sites spécifiques du génome du bactériophage Q β .

D'autres études menées plus tard chez le bactériophage λ , puis chez *S. cerevisiae*, chez *C. elegans*, et enfin chez l'être humain ont montré respectivement que les r-protéines RPS10, RPL30, RPL12 et RPS13 ont différentes fonctions en dehors du ribosome, et que ces fonctions extra-ribosomiques sont bien diversifiées : pour citer quelques exemples, RPS10 est un membre du complexe NUS qui participe

à la terminaison de la transcription (Friedman et al., 1981), RPL30 (*S.cerevisiae*) (Eng and Warner, 1991), RPL12 (*C.elegans*) (Mitrovich and Anderson, 2000) et RPS13 (*H. sapiens sapiens*) (Malygin et al., 2007) inhibent l'épissage de leur propre transcrit.

La première liste établissant les différentes fonctions extra-ribosomiques de 29 r-protéines de différentes espèces a été publiée en 1996 par I.G. Wool (Wool, 1996). Depuis cette date, de nombreuses équipes de recherche ont continué à identifier et à étudier les différentes fonctions extra-ribosomiques d'autres r-protéines et en 2009, Warner et McIntosh ont publié une nouvelle liste résumant les différentes fonctions extra-ribosomiques identifiées jusqu'à ce jour ([Tableau 3](#)) (Warner and McIntosh, 2009).

B.1.1/ R-protéines : régulateurs de la transcription et de la traduction

Certaines r-protéines sont capables de réguler la balance entre la synthèse des ARNr et la synthèse d'un grand nombre de protéines *via* leur fonction extra-ribosomique.

Chez *E. coli*, l'opéron S10 code onze r-protéines différentes dont RPL4. Cette dernière pourrait réguler la traduction de l'opéron auquel elle appartient en se fixant sur la région 5' UTR du messenger synthétisé à partir de l'opéron S10. Cette fixation induit une inhibition de la traduction de la totalité des gènes contenus dans cet opéron. D'autre part, il a été montré que RPL4 pouvait atténuer la transcription de l'opéron S10 (Zengel and Lindahl, 1994). Ces régulations permettent en cas de défauts de synthèse d'ARNr, d'inhiber la synthèse des r-protéines ribosomiques afin de ne pas perdre inutilement les ressources énergétiques de la cellule, la biogenèse des ribosomes étant le processus cellulaire le plus consommateur d'énergie. En 2009, M. S. Lindström a établi une liste des r-protéines présentant des fonctions extra-ribosomiques dans le contrôle de la transcription et de la traduction de différents gènes, y compris les gènes codant les r-protéines ([Tableau 4](#)).

Des études de la structure secondaire des r-protéines ont montré que certaines r-protéines possèdent des domaines KH (K homology), comme c'est le cas de RPS3, leur permettant de se lier à des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN. La protéine RPS3 a été identifiée en tant que sous-unité du complexe p65 NFκB dont son absence affecte négativement la capacité de NFκB à contrôler la transcription de ses gènes cibles (Wan et al., 2007).

Le second exemple concerne la protéine RPL11 : cette r-protéine interagit avec l'oncoprotéine c-Myc au niveau de son domaine Myc-box II, ce qui empêche l'interaction de TRRAP avec c-Myc. Le complexe c-Myc-RPL11 inhibe ainsi l'acétylation des histones présentes au niveau des régions promotrices des gènes cibles de *c-myc*, normalement réalisée par TRRAP, et induit en conséquence, une répression de l'expression de ces gènes dont *RPL11* fait partie (Dai et al., 2007a). De plus, il a été montré que RPL11 régule à la fois la transcription et la traduction de *c-myc*, puisque la diminution du taux de RPL11 induit une augmentation à la fois du taux de transcrits et de protéines c-Myc (Dai et al., 2007b). Ces observations montrent que *c-myc* et *RPL11* se régulent mutuellement afin d'éviter une biogenèse des ribosomes aberrante qui pourrait conduire à une prolifération anormale des cellules.

Un troisième exemple concerne la protéine RPL22 : des études chez *D. melanogaster* ont montré qu'elle se lie à l'histone H1 et ces deux protéines co-localisent au niveau des régions de l'hétérochromatine. La sur-expression de *RPL22* ou de l'histone *H1* induit une suppression de la transcription d'un certain nombre de gènes, alors que la déplétion de RPL22 conduit au contraire à une régulation positive de la transcription de ces gènes (Ni et al., 2006).

D'autres exemples montrent que des lésions de l'ADN induisent une fixation de la protéine RPL26 sur la région 5' UTR des transcrits de *TP53*. Cette fixation permet une traduction plus efficace des ARNm de *TP53* par les polyribosomes grâce à une meilleure affinité de reconnaissance du transcrit par les ribosomes (Chen et al., 2012).

Un autre exemple concerne la protéine RPL13a : cette protéine agit en tant qu'inhibiteur de la traduction des messagers du gène *CP*, qui code une enzyme ferroxidase connue sous le nom de céruloplasmine, suite à la réponse induite par l'interféron γ (Mazumder et al., 2003).

De plus, de nombreuses études menées chez différentes espèces montrent un rétro-contrôle de la traduction de certaines r-protéines sur leur propre transcrit : c'est le cas de RPL30, RPS14, et RPS28 chez la levure, de RPL12 chez le nématode, et de RPS13 et RPL7 chez l'être humain. Les protéines RPL30 (Eng and Warner, 1991) et RPS14 (Fewell and Woolford, 1999) inhibent l'épissage de leur propre transcrit, alors que RPS28 stimule la déadénylation et la dégradation de son propre messenger (Badis et al., 2004). Chez *C. elegans*, RPL12 et peut-être d'autres r-protéines utilisent aussi la régulation du processus d'épissage pour contrôler la synthèse de leur propre messenger (Mitrovich and Anderson, 2000). On observe les mêmes mécanismes chez l'être humain avec les protéines RPS13 (Malygin et al., 2007) et RPL7 (Neumann et al., 1995).

B.1.2/ R-protéines : la prolifération, la différenciation et la mort cellulaires

Des études menées dans différents modèles cellulaires ou animaux, ont montré que certaines r-protéines pouvaient moduler la prolifération normale des cellules. Les exemples cités dans ce paragraphe ne sont pas exhaustifs.

Dans des souris où une délétion du gène *RPS6* peut être induite par le système Cre/Lox, des mesures du taux de la prolifération cellulaire et de la taille des cellules ont été réalisées après une hépatectomie partielle. Les résultats montrent que la déplétion de *RPS6* induite par le système Cre/Lox après l'hépatocetomie inhibe la prolifération cellulaire, alors que la croissance des hépatocytes ne varie pas. Il semblerait que la déplétion en *RPS6* entraînerait un blocage de la traduction des transcrits de la *cycline E*, essentielle pour la réponse proliférative (Volarevic et al., 2000).

D'autres expériences de délétion des deux allèles du gène *RPS6* ont été réalisées dans des lymphocytes T chez la souris par le système Cre/Lox. L'inhibition totale de l'expression du gène *RPS6* altère le développement des lymphocytes T. Cependant, lorsqu'on supprime l'expression du gène *TP53*, le développement de ces cellules T reste normal. Ceci suggère que la délétion du gène *RPS6* provoque une réponse induite par la protéine p53 altérant le développement des cellules T. L'inhibition conditionnelle d'un seul allèle du gène *RPS6* n'altère ni le développement, ni la taille des lymphocytes T restés dans le thymus, mais affecte le nombre et la survie des cellules T matures dans les organes périphériques tels que la rate et les nodules lymphoïdes.

Des observations obtenues chez des souris déficientes en *RPL29* semblent montrer que cette protéine jouerait un rôle dans la régulation de la différenciation et de la prolifération : en effet, les souris déficientes en *RPL29* sont viables, cependant, elles ont un poids plus faible à la naissance que les souris normales et leur taux de viabilité après la naissance est réduit suite à des défauts de croissances osseuses (Kirn-Safran et al., 2007). De plus, Lui et ses collaborateurs ont montré d'une part qu'une sur-expression de *RPL29* a été observée dans les carcinomes colorectaux humains, et que d'autre part, l'inhibition de l'expression de *RPL29* dans des cellules humaines de cancers colorectaux induisait une différenciation cellulaire *via* une activation des voies de signalisation p53 et p21 (Liu et al., 2006). Ces derniers résultats montrent clairement que l'expression excessive de *RPL29* pourrait contribuer à une prolifération aberrante des cellules, conduisant ainsi à un développement de tumeurs.

Une autre r-protéine, L22, jouerait un rôle dans l'hématopoïèse en régulant la sélection des lymphocytes T $\alpha\beta$ *via* la protéine p53. L22 n'est pas nécessaire à l'appareil de traduction puisque sa délétion totale n'est pas létale chez la souris, bien qu'il existe une baisse des leucocytes dans le sang périphérique. Cependant, une baisse de la lignée $\alpha\beta$ des lymphocytes a été observée, contrairement à la lignée $\gamma\delta$. En effet, l'absence de L22 bloque la différenciation des précurseurs $\alpha\beta$ au niveau du

point de contrôle de la sélection β et active la synthèse de la protéine p53 afin d'induire l'apoptose de ces cellules (Anderson et al., 2007).

Un autre exemple concerne la protéine RPS3a dont l'augmentation de son expression est corrélée positivement avec la prolifération et la croissance cellulaires. En effet, la sur-expression de *RPS3a* dans les cellules NIH 3T3 induirait la transformation de ces cellules et la formation de tumeurs chez les souris « nude ». RPS3a pourrait ainsi jouer un rôle dans l'inhibition du processus de mort cellulaire programmée et serait également capable d'augmenter la synthèse de protéines anti-apoptotiques, telle que Bcl 2 (Ruggero and Pandolfi, 2003).

Il a été montré *in vitro* que la protéine RPS29 pouvait induire l'apoptose des cellules provenant de cancers du poumon à petites cellules. Son action consiste, d'une part, à inhiber l'expression des gènes *Bcl-2/Bcl-XL*, codant des protéines anti-apoptotiques, et du gène *survivin*. D'autre part, RPS29 pourrait augmenter l'expression du gène pro-apoptotique *Bax*, et activer la protéine p53 (Khanna et al., 2003). Ces mécanismes se font *via* deux voies différentes aboutissant toutes deux à l'activation de la caspase effectrice 3. La première implique la famille des facteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) qui conduit à l'activation de la caspase activatrice 8 et la seconde provoque une libération du cytochrome c par les mitochondries.

D'autres r-protéines ont plus un rôle dans le processus d'apoptose telles que RPL13a (Chen and Ioannou, 1999), RPS27L (He and Sun, 2007; Li et al., 2007), ou encore RPL7 (Neumann et al., 1995).

B.2/ Pathologies associées aux fonctions extra-ribosomiques

B.2.1/ Les fonctions extra-ribosomiques et les cancers

Dans certaines pathologies humaines, une diminution ou une augmentation de l'expression d'une seule r-protéine pourrait engendrer des défauts sans même que l'appareil traductionnel soit affecté. Des observations effectuées dans les carcinomes

des seins, de la prostate, du col utérin, de l'œsophage et du foie ont montré une corrélation entre le développement de ces cancers avec l'augmentation du taux d'une r-protéine individuelle ou d'un groupe de r-protéines, cependant il n'a pas encore été démontré clairement que le taux élevé de ces r-protéines soit la cause du processus de transformation ([Tableau 5](#)).

Des études menées sur les carcinomes du sein ont montré dans un tiers des cas une sur-expression du gène *erbB-2* chez les patients et cette observation est souvent associée à un mauvais pronostic de survie. Dans l'objectif de comprendre comment la sur-expression de *erbB-2* pourrait induire une transformation des cellules mammaires, Henry et ses collaborateurs ont analysé dans diverses lignées de carcinomes du sein des changements d'expression génique associée à la sur-expression de *erbB-2* (Henry et al., 1993). Les résultats obtenus montrent un taux important de transcrits codant la protéine RPL19, variant de 1 à 64 fois selon les types de lignées, MCF-7 et SK-BR-3 respectivement, par rapport aux cellules non-transformées. Des études de localisation du gène *RPL19* ont montré que ce gène se trouve dans la même région chromosomique que le gène *erbB-2*, sur le bras long du chromosome 17 (Davies and Fried, 1995). Ce nouveau résultat suggérerait que ces deux gènes pourraient être transcrits ensemble, expliquant l'augmentation des transcrits de *RPL19* dans les cellules sur-exprimant *erbB-2*.

D'autre part, le groupe de Wang a montré une sur-expression de *RPL15* dans différentes lignées cellulaires dérivées de cancers gastriques. Le taux élevé de RPL15 pourrait favoriser la croissance cellulaire et donc la transformation. Au contraire, une inhibition de l'expression de *RPL15* induirait d'une part une suppression de la croissance des cellules SGC7901, dérivées de cancers gastriques et d'autre part une diminution de la tumorigénicité chez les souris « nude » (Wang et al., 2006). D'autres expériences réalisées par Wu et ses collaborateurs ont observé que la diminution de l'expression de *RPL6* inhibe la prolifération et la progression dans le cycle cellulaire des lignées de cancers gastriques humains *via* la réduction du taux des cyclines E (Wu et al., 2011).

Dans certains cancers colorectaux, ce n'est pas la variation de l'expression d'une seule r-protéine qui a été observée. En effet, on remarque à la fois une diminution du taux d'un groupe de r-protéines (RPSA, RPS8, RPS12, RPS18, RPS24, RPL13a, RPL18, RPL28, RPL32 et RPL35a) et une augmentation du taux de RPL7 et RPS11 (Kasai et al., 2003). Il semblerait que RPS11 pourrait inhiber l'apoptose dans ces cellules cancéreuses.

La tumeur de Wilms ou encore connue sous le nom de néphroblastome représente plus de 90% des tumeurs chez l'enfant. Cette tumeur se développe à partir des cellules souches embryonnaires du rein et l'incidence est estimée à 1 cas sur 10000. Cette pathologie est liée à des altérations génétiques sur le chromosome 11 : 11p13 - 11p15 (Dowdy et al., 1991). Des travaux publiés par l'équipe de I. G. Wool en 1996 ont montré que l'expression d'un gène nommé *QM* dans les cellules dérivées de la tumeur de Wilms supprime le potentiel tumorigène de ces cellules. La protéine *QM*, qui pouvait être un candidat de suppresseur de tumeur de Wilms, a été identifiée plus tard comme étant la protéine RPL10 chez le rat (Chan et al., 1996). L'homologie de séquences en acides aminés entre la protéine RPL10 de rat et celle de l'être humain est de 100%. Il existe un homologue de RPL10 chez le poulet, appelé Jif-1 (Jun Interacting Factors 1), dont le pourcentage d'homologie avec RPL10 est de 94%. Il a été montré que Jif-1 est capable de se lier à Jun, un facteur de transcription qui se fixe à l'ADN sous la forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec JunB et JunD, et les membres de la famille Fos. La fixation de Jif-1 sur Jun l'empêche ainsi de se lier l'ADN et inhibe donc la transcription des gènes cibles de Jun (Chan et al., 1996). Il est en conséquence envisageable que RPL10 soit capable de se lier à Jun dans les cellules humaines supprimant ainsi l'expression des gènes cibles de ce dernier, ce qui pourrait empêcher le processus transformant. RPL10 pourrait donc avoir une fonction de suppresseur de tumeur. Des années plus tard, le gène *WT1* (Wilms tumor 1) a été identifié chez l'être humain comme gène suppresseur de tumeur de Wilms. Actuellement, seul *WT1* est reconnu comme le gène suppresseur de tumeur de Wilms et sa dérégulation est souvent associée à des transformations cellulaires (cancer du poumon) car WT1 contrôle, entre autre, la transition épithélio-mésenchymateuse, première étape de l'établissement de métastases.

Ces exemples de cancers associés à l'expression de r-protéines spécifiques montrent que ce ne sont pas toujours les mêmes r-protéines qui sont surexprimées dans les processus de transformation, qu'il est possible de trouver aussi une sous-expression de certaines r-protéines dans un certain nombre de cancers, et finalement que l'expression des r-protéines pourraient varier selon les différents stades de progression tumorale.

B.2.2/ Les fonctions extra-ribosomiques et autres pathologies

Mise à part les cancers, des variations de l'expression de certains gènes codant les r-protéines ont été supposées impliquer dans différentes pathologies, ces gènes étaient localisés au niveau de régions chromosomiques critiques associées à ces pathologies.

Le syndrome de Noonan est une pathologie décrite pour la première fois en 1963 par J. Noonan. C'est une maladie héréditaire, autosomale dominante qui est caractérisée par un aspect particulier des traits du visage, des malformations du cœur, une petite taille et parfois un déficit intellectuel et un retard d'acquisition du langage. Son incidence est estimée de 1 sur 1000 à 1 sur 2500 naissances (Ion et al., 2000). Ce syndrome est associé à une région chromosomique qui se trouve sur le chromosome 12 entre les marqueurs D12S84 et D12S1341. Cette région chromosomique contient de nombreux gènes et parmi eux, il y a le gène *RPL6*. Les études de localisation du gène *RPL6* sur le génome humain ont montré que ce gène se trouvait à la position 12q24.1, exactement à l'intérieur du locus associé au syndrome de Noonan (Kenmochi et al., 2000). Cependant, à ce jour, le rôle exact de *RPL6* dans le syndrome de Noonan reste encore à déterminer.

L'anémie de Diamond-Blackfan décrite précédemment montre que dans la majorité des cas, c'est la mutation du gène *RPS19* qui en est la cause. En dehors de sa participation dans la biogenèse des ribosomes, *RPS19* pourrait jouer d'autres fonctions dans la DBA. En effet, il a été montré *in vitro* que *RPS19* interagissait directement avec la protéine PIM-1. Cette dernière est une protéine sérine-thréonine

kinase qui s'exprime dans toutes les cellules de l'organisme et dont l'expression dans les cellules érythropoïétiques pourrait être induite, en plus de l'expression ubiquitaire, par divers facteurs de croissance comme l'érythropoïétine. Dans cette même étude, il a été montré que PIM-1 pouvait phosphoryler RPS19 à la fois dans le nucléole et dans le ribosome mature 80S, et dans ce dernier cas, influencer le processus de la traduction (Chiocchetti et al., 2005). Dans la DBA, les mutations observées sur un des deux allèles du gène *RPS19* pourraient alors induire une interaction défectueuse entre RPS19 mutée et PIM-1 et cette défaillance pourrait expliquer certaines caractéristiques cliniques observées chez les patients de la DBA.

Des études plus récentes menées par le groupe de Dahl sur cette interaction et ses effets ont vu le jour en 2010 : un modèle animal murin contenant la double mutation (*RPS19*^{+/-} / *pim*^{-/-}) a été créé. Ces souris montrent une croissance normale par rapport aux souris contrôle, cependant elles ont un taux plus élevé de cellules blanches et rouges dans la circulation périphérique. L'analyse des cellules provenant de leur moelle osseuse montre d'une part une augmentation du taux de c-Myc, ainsi que des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1, et d'autre part une diminution du taux des protéines pro-apoptotiques Bak, Caspase 3 et p21. Ces résultats suggèrent qu'une haploinsuffisance de *RPS19* associée à une suppression de *PIM-1* favoriserait la croissance cellulaire *via* la dérégulation de c-Myc et une synthèse excessive des protéines anti-apoptotiques (Frojmark et al., 2010).

L'ensemble des études menées pour comprendre les mécanismes impliquant RPS19 dans l'anémie Diamond-Blackfan permet d'émettre l'hypothèse suivante : la mutation d'un allèle de *RPS19* pourrait induire une défaillance dans la biogenèse des ribosomes, conduisant ainsi à un stress ribosomique. L'augmentation de la stabilisation de p53 *via* l'inhibition de Mdm2 par différentes r-protéines entraîne en conséquence une apoptose accrue des progéniteurs érythrocytaires, qui à long terme induit une anémie. D'autre part, les protéines RPS19 mutées pourraient avoir des difficultés pour interagir avec la protéine PIM-1 et ne seraient donc pas phosphorylées. Ceci mime le cas où il y a suppression de PIM-1 : on observe alors une prolifération importante des cellules des lignées blanche et rouge, ce qui

pourrait expliquer une prédisposition plus importante au développement de cancers chez les patients de la DBA.

Chapitre II

Résultats

Le contexte scientifique

Les recherches menées dans notre laboratoire s'intéresse aux bases moléculaires de l'auto-renouvellement et à leurs altérations au cours du processus leucémogène induit par l'oncogène *v-erbA*.

Comme il a été décrit dans le chapitre précédent, l'oncogène *v-erbA* est capable à lui-seul d'induire la transformation cellulaire des progéniteurs érythrocytaires T2EC en bloquant leur programme de différenciation au stade CFU-E. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'oncogène *v-erbA* impliqués dans le processus transformant, une étude d'identification de ses gènes cibles a été réalisée au sein de l'équipe par les techniques SAGE (Serial Analysis Gene Expression) et de RT-qPCR (Polymerase Chain Reaction) (Bresson et al., 2007).

Les résultats de cette étude ont montré que *v-erbA* modulait transcriptionnellement l'expression de certains gènes qui pourraient être impliqués dans la transformation cellulaire. Ces gènes sont classés en quatre catégories en fonction de leur rôle dans la cellule : 1/La structure de la chromatine ; 2/La régulation de la transcription ; 3/ La synthèse protéique ; et 4/ La dégradation protéique.

Parmi les gènes cibles de *v-erbA* présentant des fonctions dans la synthèse protéique, quatre gènes, au moins, codant les r-protéines ont leur expression réprimée sous l'effet de *v-erbA* : *RPS3*, *RPS3a*, *RPS9* et *RPL13* (Figure 19). Tous les gènes des r-protéines n'ont pas pu être analysés, mais parmi ces gènes, certains ne voient pas leur expression varier sous l'effet de *v-erbA*.

Ce résultat suggère ainsi que *v-erbA* pourrait moduler les processus de traduction, en modifiant quantitativement ou qualitativement les ribosomes, et/ou en changeant les fonctions extra-ribosomiques des r-protéines.

Objectif de la thèse

Sur la base de ces données, j'ai cherché au cours de ma thèse à déterminer si *v-erbA* induisait aussi la variation du taux des r-protéines et plus spécifiquement dans la fraction des ribosomes. Autrement dit si la composition des ribosomes en r-protéines était modifiée sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*.

Etant donné que les expériences de SAGE et de RT-qPCR ont montré que le taux de transcrits des gènes *RPS3*, *RPS3a*, *RPS9* et *RPL13* était réprimé sous l'effet de *v-erbA*, j'ai souhaité initialement utiliser une approche gène à gène pour analyser le taux de ces protéines dans la fraction totale. Malheureusement, seuls 2 anticorps, dirigés contre les protéines RPS3 et RPS3a, étaient disponibles et fonctionnels chez le poulet. J'ai donc pu exploiter cette approche uniquement pour l'analyse du taux de RPS3 et RPS3a. D'autre part, j'ai développé une approche protéomique plus globale basée sur la technique 2D-DIGE (Two-Dimensional Difference in Gel Electrophoresis), en collaboration avec le Pr. Jean-Jacques Madjar. Cette approche a permis d'analyser à une plus grande échelle, les variations de la majorité des r-protéines associées aux ribosomes sous l'effet de *v-erbA*.

Organisation des résultats

Ce second chapitre consacré aux résultats est sous-divisé en quatre parties : je commencerai par décrire les résultats obtenus grâce à l'approche gène à gène sur le taux des protéines RPS3 et RPS3a. Afin d'utiliser une approche globale pour analyser la composition des ribosomes en protéines chez *Gallus gallus*, nous avons mené initialement une étude permettant l'identification des r-protéine chez cette espèce. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée aux résultats de ce travail. Ensuite, je présenterai en détail les données recueillies par l'approche globale ainsi que les études poursuivies pour mettre en évidence une composition variable des ribosomes en protéines ribosomiques. Dans cette même partie, j'exposerai l'analyse de la fonction biologique de la protéine RPL11. Et enfin, la dernière partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude des messagers spécifiques traduits par les ribosomes à composition particulière en r-protéines. L'ensemble des matériels et méthodes est décrit en détail à la fin de ce chapitre.

PARTIE I

Approche gène à gène : Analyse du taux des protéines RPS3 et RPS3a

A/ Généralités sur les protéines RPS3 et RPS3a

Les r-protéines RPS3 et RPS3a font partie des protéines de la petite sous-unité ribosomique 40S. Ces protéines sont basiques comme la plupart des r-protéines. Chez *Gallus gallus*, les protéines RPS3 et RPS3a sont constituées respectivement de 244 aa (acides aminés) et de 264 aa, et sont répertoriées dans la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) sous les numéros d'accèsion NP_001026007.1 pour RPS3 et NP_001075886.1 pour RPS3a.

L'approche gène à gène utilisée ici pour analyser le taux des protéines RPS3 et RPS3a est basée sur la technique de western blot, en utilisant des anticorps dirigés contre ces deux r-protéines. Lorsque j'ai débuté ces études, il n'existait pas d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces r-protéines de poulet. Cependant, les séquences des r-protéines sont très bien conservées au cours de l'évolution, comme le montre l'alignement des séquences de RPS3 et de RPS3a chez *Gallus gallus* avec celles d'*Homo sapiens* et de *Mus musculus* ([Figure 20](#)). Nous avons ainsi pu utiliser des anticorps dirigés contre ces 2 protéines humaines ou murines, qui étaient déjà commercialisés.

B/ Résultats

Les fractions de protéines totales provenant de 5 (pour la protéine RPS3) ou de 6 (pour la protéine RPS3a) expériences indépendantes ont été analysées par western blot en utilisant les anticorps dirigés soit contre la protéine RPS3, soit contre la protéine RPS3a. Les bandes correspondantes aux protéines RPS3 et RPS3a ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J. Nous avons choisi la protéine GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) en tant que témoin de charge pour chacun de nos dépôts.

Les résultats obtenus ont montré que les taux des protéines RPS3 et RPS3a dans les T2EC exprimant *v-erbA* sauvage ne variaient pas par rapport à celui des T2EC

exprimant la forme mutée non transformante de *v-erbA* ([Figure 21](#)). En effet, pour la protéine RPS3, différents ratios de cette r-protéine, provenant d'expériences différentes, entre les T2EC-*v-erbA* et T2EC-*S61G* ont été analysés statistiquement avec le test T de Student bilatéral (H_0 : Il n'y a pas de différence significative entre les T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G*). Les résultats de cette analyse ont montré clairement que les différences du taux de la protéine RPS3 entre les deux conditions ne sont pas significatives, puisque la *p* value obtenue est de 0,955.

Concernant la protéine RPS3a ([Figure 22](#)), les résultats du test statistique T de Student bilatéral réalisé sur les ratios provenant de 6 expériences indépendantes, ont aussi montré qu'il n'y a pas de variations significatives entre les T2EC-*v-erbA* et les T2EC-*S61G*: la *p* value obtenue est de 0,527.

L'analyse des variations du taux des protéines RPS3 et RPS3a dans la fraction totale a aussi montré que pour la moitié des expériences, le ratio de ces protéines entre les T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G* est légèrement supérieur à 1, et pour l'autre moitié, il est faiblement inférieur à 1. Ces données indiquent donc des variations inter-expériences assez importantes. Il est par conséquent nécessaire de répéter un nombre suffisant de fois l'expérience afin d'extraire une information fiable.

Ces résultats montrent que la répression par *v-erbA* de l'expression des gènes *RPS3* et *RPS3a*, au niveau des transcrits, n'a pas de conséquence visible sur l'expression protéique de RPS3 et RPS3a. Il existe donc une décorrélation entre le transcriptome et le protéome pour ces deux protéines : en effet, il avait été observé une répression du taux de transcrits de RPS3 et de RPS3a de 1,35 et 1,45 fois, respectivement, alors qu'aucune variation protéique n'est observée. Ces données suggèrent ainsi une régulation traductionnelle de l'expression de ces deux gènes sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*. L'ensemble de ces données suggère qu'il est important de regarder au niveau protéomique car il y a peu de corrélation entre la transcriptomique et la protéomique (Foss et al., 2007; Ghazalpour et al., 2011).

PARTIE II

Identification des protéines ribosomiques chez *Gallus gallus*

Dans l'objectif d'utiliser une approche globale pour analyser des variations du taux des r-protéines dans la fraction associée aux ribosomes par la 2D-DIGE, nous avons dans un premier temps cherché à identifier les r-protéines chez *Gallus gallus*. Lorsque nous avons initié cette étude, les bases de données concernant les r-protéines chez le poulet étaient incomplètes et peu de r-protéines chez cette espèce étaient caractérisées. Nous avons donc établi une cartographie des r-protéines de poulet par électrophorèse bidimensionnelle associée à de la spectrométrie de masse. Cette approche a permis d'identifier les r-protéines ayant un point isoélectrique supérieur à 8,6. Cette analyse a été également complétée par une autre approche, le Tandem Mass Tag, permettant ainsi d'analyser la majorité des r-protéines (Thompson et al., 2003).

A/ Identification des r-protéines par électrophorèse bidimensionnelle associée à de la spectrométrie de masse

La première étape de ce travail a consisté à mettre au point un protocole permettant de purifier les ribosomes et d'extraire les r-protéines contenues dans ces ribosomes. Avec l'aide précieuse du Pr. Jean-Jacques Madjar, qui était responsable de la plateforme d'analyse protéique du CGϕMC, nous avons mis au point deux protocoles permettant d'une part d'extraire la majorité des r-protéines à partir des ribosomes purifiés, et d'autre part de séparer, d'analyser et de cartographier les r-protéines présentant un point isoélectrique supérieur à 8,6. Ces deux protocoles vous sont décrits en détail dans l'article qui suit. Nous avons également utilisé ces protocoles pour analyser les r-protéines provenant d'échantillons de foie de rat, échantillons fournis par l'équipe du Dr. Jean-Jacques Diaz, et d'échantillons de cellules HeLa, afin de comparer la position des spots des r-protéines entre ces trois

espèces. Dans les paragraphes suivant, je vous énoncerai uniquement les points importants de cette étude.

A.1/ Purification des ribosomes et extraction des r-protéines

Plusieurs protocoles permettant de purifier les ribosomes et d'extraire les r-protéines ont été publiés depuis les années 70 : en 1971, la première extraction partielle des r-protéines de foie de rat a été réalisée par Reboud *et al* (Reboud et al., 1971), puis un an plus tard, E. Kaltschmidt & H. G. Wittmann ont testé plusieurs techniques d'extraction de r-protéines chez *E. coli* (Kaltschmidt and Wittmann, 1972).

De notre côté, nous avons mis au point un protocole ([Figure 23](#)) basé sur une lyse douce des cellules, c'est-à-dire que le tampon de lyse ne détruit que la membrane cytoplasmique et l'enveloppe nucléaire externe des cellules, afin de ne pas mélanger le contenu des ribosomes nucléaires avec celui du cytosol. De plus, en utilisant un tampon de lyse contenant 25 mM de KCl et 5 mM de MgCl₂, nous nous sommes placés dans la situation la moins stringente, *i.e*, d'une part, les deux sous-unités ribosomiques restent accrochées l'une à l'autre tout au long de la purification, et d'autre part, les liaisons dites « faibles » entre les différents éléments associés aux ribosomes sont maintenues. D'autre part, dans ce protocole, nous avons éliminé les mitochondries car le génome mitochondrial code des r-protéines mitochondriales que nous ne souhaitons pas garder dans notre étude. Les fractions cytoplasmiques dépourvues de mitochondries ont été ensuite déposées sur un coussin de saccharose à 1 M et ont subi une étape d'ultracentrifugation permettant ainsi de purifier les ribosomes 80S et les sous-unités ribosomiques 60S et 40S. Les r-protéines sont alors extraites de ces ribosomes purifiés avec de l'acide acétique en présence de l'acétate de magnésium. Les r-protéines sont ensuite dialysées contre de l'acide acétique 1 M pour éliminer les sels minéraux (acétate de magnésium). Avant d'être analysées par électrophorèse bidimensionnelle, elles sont réduites au DTE (1,4 dithioerythritol) et alkylées avec de l'iodoacétamide.

A.2/ Séparation des r-protéines par électrophorèse bidimensionnelle

Pour séparer les r-protéines, nous avons utilisé dans cette étude un système d'électrophorèse bidimensionnelle dérivé de celui mis au point par le Pr. Jean-Jacques Madjar en 1979 (Madjar et al., 1979). Cette approche permet d'analyser uniquement les r-protéines basiques, ayant un point isoélectrique supérieur à 8,6.

Les r-protéines ont été séparées en première dimension dans des tubes de verre de 13,5 cm contenant 12 cm de gel de polyacrylamide à 4% (37,5 :1, acrylamide : N,N' méthylènebisacrylamide), 0,2 M de Tris-Borique à pH 8,6, 8 M d'urée, 10 mM d'EDTA, 1 µL/mL de TEMED (N,N,N',N'-tetraméthylethylènediamine), et 3 µL/mL d'APS (Amonium PerSulfate). La séparation des r-protéines est réalisée dans un gel à pH constant, en deux étapes : tout d'abord, elles sont mises en présence d'un champ électrique de 25 V pendant 2 h, puis le champ électrique évolue vers 100 V jusqu'à l'accumulation de 1500 Vh. Cette première dimension permet ainsi de séparer les r-protéines en fonction de leur charge, et non de leur point isoélectrique : plus une protéine est chargée positivement à pH 8,6 (pH du gel de polyacrylamide), plus elle va migrer loin dans le gel.

Une fois que la première dimension est terminée, les r-protéines sont séparées en deuxième dimension en fonction de leur poids moléculaire selon le protocole mis au point par Laemmli avec quelques modifications (Laemmli, 1970). Les r-protéines sont séparées dans un gel de polyacrylamide à 14% (37,5 :1, acrylamide : N,N' méthylènebisacrylamide) contenant 0,375 M de Tris-HCl à pH 8,8 sans SDS, 1 µL/mL de TEMED et 2 µL/mL d'APS à 10%. La séparation est effectuée en deux étapes : une étape permettant la concentration des protéines à 3 W/gel pendant 20 min, suivie d'une étape de séparation à 6 W/gel jusqu'à l'obtention de 1200 Vh.

Les gels contenant les r-protéines sont ensuite colorés soit au bleu de Coomassie, soit au nitrate d'argent selon le protocole de T. Rabilloud avec quelques petites modifications (Rabilloud, 1999). Les spots contenant les r-protéines sont

isolés et envoyés à l'équipe du Dr. Jean-Charles Sanchez (Genève) pour une identification par spectrométrie de masse.

A.3/ Identification des r-protéines par spectrométrie de masse

Pour les r-protéines de l'être humain et du rat, les données obtenues en spectrométrie de masse ont été directement comparées avec celles contenues dans les bases de données Swiss-Prot/trEMBL. Pour les r-protéines de poulet, une comparaison directe était impossible car il y avait très peu d'informations sur les r-protéines de poulet dans les bases de données. Il nous a donc fallu les comparer avec des données de l'être humain, du rat et d'autres Chordés.

Nous avons ainsi identifié 60 r-protéines ribosomiques humaines, 69 r-protéines de rat et 58 r-protéines de poulet. Parmi les protéines identifiées chez le poulet, 34 d'entre elles appartiennent à la grande sous-unité ribosomique 60S et 24 à la petite sous-unité ribosomique 40S.

B/ Identification des r-protéines par Tandem Mass Tag Spectrométrie

Afin de compléter nos données obtenues sur les r-protéines par électrophorèse bidimensionnelle associée à de la spectrométrie de masse, nous avons utilisé une autre approche, appelée Tandem Mass Tag. En effet, la première approche nous a permis d'identifier une majorité des r-protéines, cependant on ne voit sur nos gels que des r-protéines ayant un point isoélectrique supérieur à 8,6. Toutes les autres r-protéines, c'est-à-dire, celles ayant un point isoélectrique inférieur à 8,6 ne sont donc pas identifiables par cette approche.

Le Tandem Mass Tag utilisé dans cette étude consiste à marquer des protéines ribosomiques provenant des trois espèces avec trois tags possédant des groupements d'ion-rapporteur qui diffèrent les uns des autres d'une seule unité de « masse/charge » (m/z) ([Figure 24](#)). Ces protéines sont ensuite rassemblées et sont clivées par la trypsine, ce qui permet de libérer des peptides liés aux groupements d'ion-rapporteur propres à chaque espèce (m/z : 126,2 pour le poulet ; m/z : 127,2 pour l'être humain ; et m/z : 128,2 pour le rat). Ces peptides sont ensuite identifiés et quantifiés par spectrométrie de masse.

Cette approche de Triplex Tandem Mass tag a permis l'identification de 68 r-protéines humaines, dont 15 qui n'ont pas été observées par électrophorèse bidimensionnelle. De la même manière, 69 r-protéines de rat ont été identifiées, dont 7 spécifiquement avec cette technique. Chez le poulet, seules 32 r-protéines ont été identifiées, 9 parmi celles-ci n'ayant pas été visualisées avec la première approche.

C/ Nombre de r-protéines identifiées

Ces deux approches ont permis d'identifier au total 74, 76 et 67 r-protéines respectivement chez l'être humain, le rat et le poulet. Concernant les r-protéines de poulet, 32 parmi les 67 identifiées n'étaient pas encore répertoriées dans les bases de données.

Les données de cette étude ont permis de compléter les bases de données (Swiss 2D-Page) des r-protéines chez *Gallus gallus*. De plus, la cartographie des r-protéines obtenue en électrophorèse bidimensionnelle montre une très forte conservation des r-protéines entre ces trois espèces, en tout cas concernant leur profil de migration selon leur charge et leur masse moléculaire.

Article 1

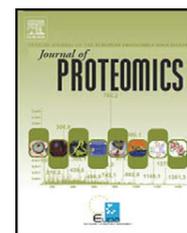
Publié le 01 Février 2011 dans Journal of proteomics. 2011 Feb 1 ;74(2) :167-85.

Identification of human, rat and chicken ribosomal proteins by a combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry

Anh Thu Nguyen-Lefebvre^a, Sandrine Gonin-Girauda, Alexander Scherl^b, Patrizia Arboit^b, Laure Granger^a, Jean-Charles Sanchez^b, Jean-Jacques Diaz^a, Olivier Gandrillon^a, Jean-Jacques Madjar^a

a : Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Lyon 1, Villeurbanne, CNRS, UMR5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, France

b : Biomedical Proteomics Research Group, Department of Structural Biology and Bioinformatics, University Medical Centre, University of Geneva, 1211 Geneva 4, Switzerland

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/jprot

Identification of human, rat and chicken ribosomal proteins by a combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry

Anh Thu Nguyen-Lefebvre^a, Sandrine Gonin-Giraud^a, Alexander Scherl^b,
Patrizia Arboit^b, Laure Granger^a, Jean-Charles Sanchez^b, Jean-Jacques Diaz^a,
Olivier Gandrillon^{a,*}, Jean-Jacques Madjar^a

^aUniversité de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Lyon 1, Villeurbanne, CNRS, UMR5534,
Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, France

^bBiomedical Proteomics Research Group, Department of Structural Biology and Bioinformatics, University Medical Centre,
University of Geneva, 1211 Geneva 4, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2010

Accepted 20 October 2010

Keywords:

Two-dimensional polyacrylamide
gel electrophoresis

Mass spectrometry

Ribosomal proteins

Human

Rat

Chicken

ABSTRACT

To identify the exact spot position of human, rat and chicken ribosomal proteins (RP) separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE), a 2-DE system was designed to separate RP with a $pI > 8.6$ according to their charge in the first dimension and to their molecular mass in the second dimension. Individual proteins were excised from the gels and identified by mass spectrometry after digestion by trypsin. In addition, a mixture of purified RP from these three species was also analyzed by tandem mass tag spectrometry. By combining those two methods 74 RP from human, 76 from rat and 67 from chicken were identified according to the nomenclature initially defined for rat liver RP and by using the Swiss-Prot/trEMBL databases. Whereas human and rat RP were well described, most of RP from chicken were not characterized in databases, since 35 out of 67 chicken RP identified in this study were not listed yet. We propose here the first comprehensive description of chicken RP and their comparison to those from human and rat.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Ribosomes are large ribonucleoprotein complexes that provide an accurate structure for mRNA translation and protein synthesis. They were first described in 1955 as dense particles or granules in the cytoplasm of eukaryotic cells observed by electron microscopy [1]. The eukaryotic ribosome contains four ribosomal RNA (rRNA) and about 80 ribosomal proteins (RP) [2]. This complex exhibits a molecular mass of about 4 MDa and a sedimentation coefficient of 80S. The ribosome is composed of two subunits that are evolutionary conserved throughout the

living world, a small subunit which is involved in decoding of the mRNA and a large subunit that harbours the peptidyl transferase center buried in the rRNA [3]. In eukaryotes, the 40S small subunit is composed of only one 18S rRNA of 1,900 nucleotides and about 30 RP, whereas the 60S large subunit contains three rRNA (5S, 5.8S and 28S) of 120, 160 and 4,700 nucleotides respectively, and about 50 RP. Eukaryotic RP, like prokaryotic RP, exhibit small molecular masses (from 3.4 kDa to 47.7 kDa) and most of them are extremely basic [4]. Their relationship to each other as well as to the rRNA was unambiguously described when the atomic architecture of

* Corresponding author.

E-mail address: olivier.gandrillon@univ-lyon1.fr (O. Gandrillon).

the prokaryotic ribosome was revealed by X-ray crystallography [5 and original references herein].

In the seventies, eukaryotic RP have been extensively analyzed using different kinds of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis systems (2-DE). In these systems, RP were numbered according to their electrophoretic mobility in both dimensions and different nomenclatures were thus proposed rendering these analyses difficult to exploit between different laboratories. Following a protocol initially designed for prokaryotic ribosomal proteins [6], Sherton and Wool proposed the first nomenclature for rat liver RP after separation of the small and large ribosomal subunits. Briefly after extraction, RP were separated according to their electric charge in the first dimension at pH 8.6 in an 8% polyacrylamide gel, then in the second dimension at pH 4.5 in an 18% polyacrylamide gel, both gels containing urea. Based on the nomenclature initially defined for rat liver RP in this electrophoretic system [7], a uniform nomenclature for mammalian RP was then proposed [8] according to the similarities in 2-DE migration of RP originating from different species. In addition, after cloning and sequencing of the first cDNA of mouse RP mRNA [9], databases were filled up with a considerable amount of new RP cDNA sequences of a large number of species. Due to the highly conserved sequences of RP, the nomenclature originally adopted for mammalian RP was thus extended to other eukaryotic species. However, at present the validation by mass spectrometry of the identity of RP associated to their names deposited in databases and separated in previously published 2-DE gels is still missing. Furthermore the fact that there is no 2-DE gels available that could be easily set up in many laboratories to separate RP remains a strong limitation for the analyses of ribosomal protein composition.

We report here the validated spot position of human, rat and chicken RP by 2-DE, according to the name of RP deposited in the databases. For this, we designed a 2-DE system in which basic RP were separated according to their charge at pH 8.6 in the first dimension and to their molecular mass in the second dimension in a slab gel, the composition of which is derived from that originally described by Laemmli [10] that is widely used in most laboratories. Proteins extracted from the gels were identified by mass spectrometry for all three species. To complete this identification, purified RP were also analyzed in a quantitative manner using the isobaric tagging technology [11] (TMT) allowing to identify a few more RP, mainly the so called acidic ones, i.e. those with a $pI < 8.6$.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

HeLa cells were grown at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM from Gibco/Life Technology, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS from Biowest, Nuaille, France), 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 1 µg/mL amphotericin B (both from Gibco/Life Technology) as already described [12].

Human and rat dermal fibroblasts (HDF and RDF respectively) were obtained from CELLnTEC Advanced Cell System (Bern, Switzerland) and were grown according to the manufacturer's

protocol at 37 °C with 5% CO₂ in the CnT-05 fibroblast medium (CELLnTEC Advanced Cell System).

Transforming growth factor alpha and beta (TGF- α and TGF- β)-induced erythrocytic cells (T2EC) were generated from SPAFAS white leghorn chickens (PA12 line from INRA, Tours, France) as described [13]. Cells were expanded at 37 °C with 5% CO₂ in culture medium (minimum essential medium alpha (α -MEM from Gibco/Life Technology), 10% FBS, 10⁻³ M HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl) ethanesulfonic acid), 10⁻⁴ M 2-mercaptoethanol, 10⁻⁶ M dexamethasone (all from Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA), 5 ng/mL human TGF- α (Active Bioscience, Hamburg, Germany), 1 ng/mL human TGF- β -1 (PeproTech INC, Rocky Hill, NJ, USA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (both from Gibco/Life Technology)).

CEF were generated from SPAFAS white leghorn chickens (LD1 line from INRA, Tours, France). Cells were grown at 37 °C with 5% CO₂, as previously described [14], in medium 199 with Earl's salts, supplemented with 10% tryptose phosphate broth (TPB from Difco, Detroit, MI, USA), 5% FBS, 1% normal chicken serum (NCS), 0.1% sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 µg/mL amphotericin B (all from Gibco/Life Technology).

2.2. Cell fractionation and ribosome purification

10⁷ HeLa cells were washed twice with cold Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS from Gibco/Life Technology) kept at 4 °C. Cells were scraped off the culture dishes in preheated D-PBS, trypsin (0.25% w/v) at 37 °C. Cells in suspension were washed once with D-PBS kept at 4 °C and then centrifuged at 370×g for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed and cells were resuspended and kept for 10 min at 4 °C in 300 µL of lysis buffer made of 0.5% IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich), 250 mM sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM 1,4-dithioerythritol (DTE from Sigma-Aldrich), protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma-Aldrich). Cell lysate was centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C to spin down the nuclei. Post-nuclear supernatant was centrifuged at 12,000×g for 10 min at 4 °C to spin down the mitochondria. Post-mitochondrial supernatant was layered on 1 mL of a 1 M sucrose cushion made in 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 50 mM Tris-HCl pH 7.4 in a thick-wall polycarbonate centrifuge tube, and centrifuged for 2 h at 305,000×g at 4 °C in a Beckman Coulter-Optima™MAX-XP Ultracentrifuge (Brea, CA, USA). Ribosome pellet was rinsed twice with distilled water at 4 °C and resuspended in 300 µL of 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 2 mM DTE. Concentration of ribosomes was determined by measuring the absorbance at 260 nm with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Fibroblast ribosomes from human, rat and chicken were obtained as described previously for HeLa cells but with lysis buffer made in 125 mM sucrose instead of 250 mM.

Ribosomes from T2EC grown in suspension were obtained as described for fibroblasts without the trypsinization step. By those cell fractionation procedures, ribosomes from cultured cells were purified as a mixture of cytoplasmic free and membrane-bound ribosomes.

By contrast, rat liver ribosomes were prepared according to another method, the Ramsey and Steele protocol [15], allowing separation and purification of cytoplasmic free and membrane-bound ribosome from non-starved rats [16].

2.3. Preparation of ribosomal proteins for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry

Total polyribosomal proteins were extracted by the acetic acid procedure in the presence of magnesium as already described [17,18]. Acetic acid containing proteins were pooled in Maxi GeBAflex-tube, 6,000–8,000 cut off (GeBA Gene-Bio-Application, Kfar-Hanglid, Israel) and extensively dialyzed against 1 M acetic

acid. After lyophilization, proteins were solubilized and reduced in 6 M guanidine hydrochloride (Sigma-Aldrich), 0.5 M Tris-HCl pH 8.5 and 10 mM DTE at a concentration of 1 to 10 mg/mL, for 30 min at room temperature under nitrogen. Proteins were then alkylated by 40 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich) made in 6 M guanidine hydrochloride and 0.5 M Tris-HCl pH 8.5 for 90 min at room temperature under nitrogen. Proteins were then dialyzed once again against 1 M acetic acid and lyophilized [18].

2.4. Protein analysis by 2-DE

After lyophilization, proteins were solubilized in the sample buffer (20 mM Tris-boric acid pH 8.3, 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) and 8 M urea (all from Sigma-Aldrich)).

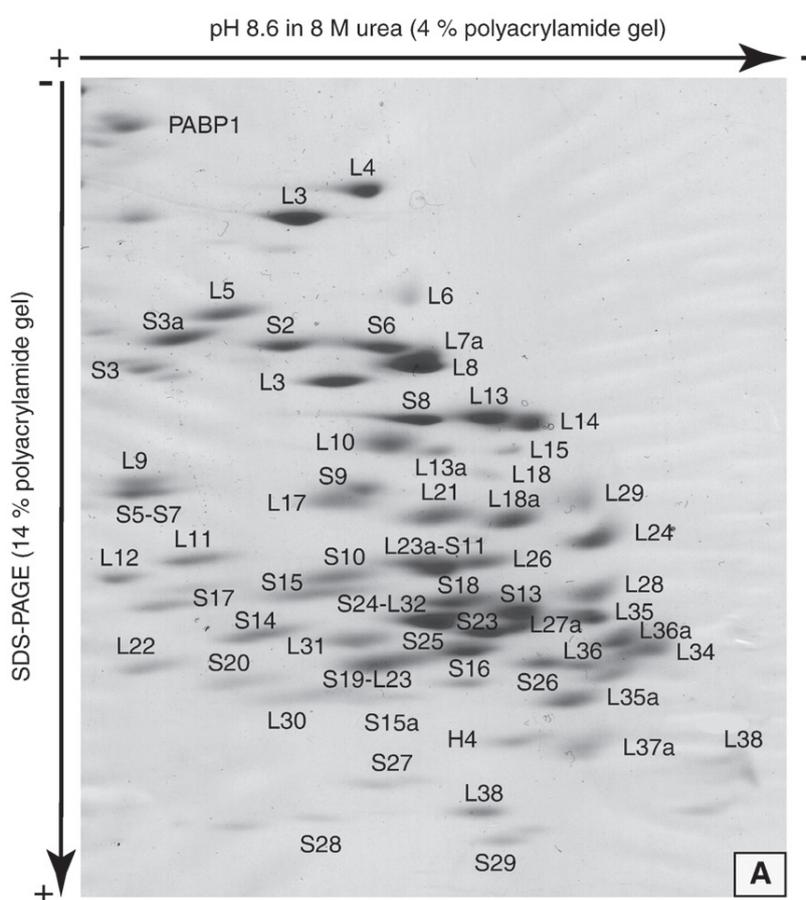


Fig. 1 – Analysis of total ribosomal proteins (TP80S) from HeLa cells (A), rat liver (B) and chicken T2EC (C) by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. TP80S were extracted from an amount of ribosomes corresponding to 5 OD measured at 260 nm. The first dimension was carried out from anode to cathode at pH 8.6 in 8 M urea, while the second dimension was achieved in the presence of SDS in a 14% polyacrylamide slab gel. Proteins were numbered after identification by mass spectrometry, the numbers being preceded by «S» for small and «L» for large subunit. PABP1 was identified in all RP preparations and labelled in the upper left corners of all slab gels. (A) Among HeLa cells RP, histone H4 is indicated by an arrow (see text). (B) Ribosomal proteins from rat liver free ribosomes. In the conditions used for ribosome purification, RPS6 is almost fully phosphorylated and migrates above and to the right of RPS2. The streak between the spots labelled S6 and L8 correspond very likely to intermediate forms of RPS6 phosphorylation. The two spots containing RPS15a are indicated by arrows. Spot position of RPS27a, not visible in this particular gel, is indicated by an open circle. (C) Chicken T2EC RP: spot positions of RPS28, RPS29 and RPL36a, not visible in this particular gel, are indicated by open circles and those of RPS15a are indicated by arrows. Spot positions of nucleolin and eEF-1 are indicated in the upper left corner of the figure. The spot labelled 59 to the upper left of RPS30 could not be identified by mass spectrometry.

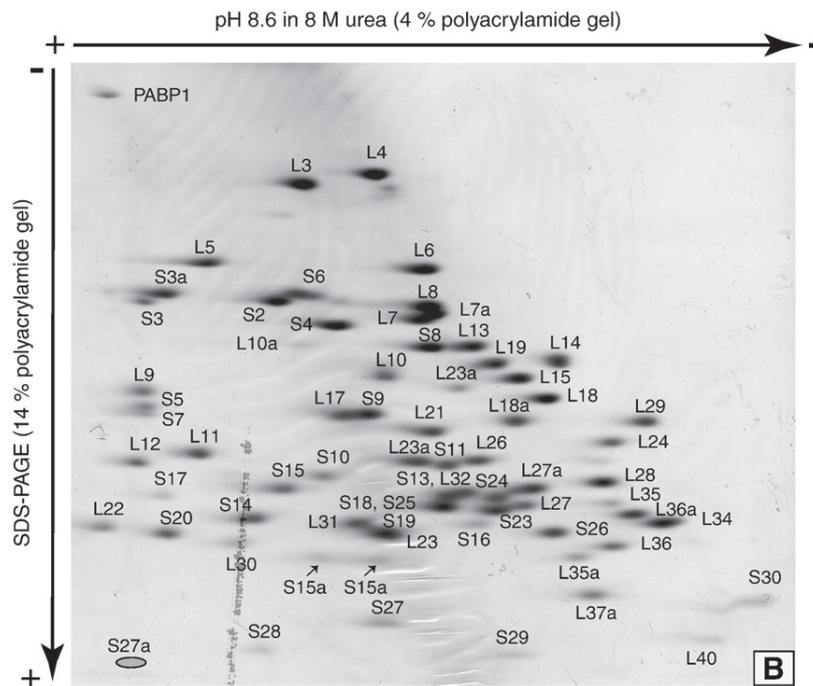


Fig. 1 (continued).

2.4.1. First dimension

Proteins were separated in polyacrylamide gels cast in 1.5 mm inside diameter glass tubes according to their electric charge. Twelve centimeter long gels made of 4% polyacrylamide (37.5:1 acrylamide: N-N'-methylenebisacrylamide, from Euromedex, Mundolsheim, France) containing 0.2 M Tris-boric acid pH 8.6, 8 M urea, and 10 mM EDTA were polymerized by adding 1 μ L/mL N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) and 3 μ L/mL of 10% ammonium persulfate (APS) (both from Sigma-Aldrich). Protein separation was achieved in two steps, first 2 h at 25 V, then 100 V up to 1,500 Vh. The upper anode buffer was adjusted to pH 8.3 and the lower cathode buffer to 8.6, both made of 60 mM Tris-boric acid and 3 mM EDTA. At the end of the first dimension, gels were extracted from the glass tubes and equilibrated for 5 min in 0.625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS from Euromedex) and 0.002% bromophenol blue (Sigma-Aldrich).

2.4.2. Second dimension

Proteins were separated in slab gels according to their molecular mass. The slab gel apparatus was a Bio-Rad PROTEAN® II xi (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The procedure we used was that of Laemmli with minor modifications [10]. 1.5 mm thick gels made of 14% polyacrylamide (37.5:1 acrylamide: N-N'-methylenebisacrylamide, from Euromedex) containing 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 without SDS were polymerized by adding 1 μ L/mL TEMED and 2 μ L/mL of 10% APS (both from Sigma-Aldrich). Protein separation was achieved in two steps, 3 W/gel for 20 min, then 6 W/gel up to 1200 Vh. Only the upper buffer (25 mM Tris and 192 mM glycine) contained 0.1% SDS. Proteins were stained either by silver (see later) or by

0.1% Coomassie brilliant blue R 250 (Sigma) in 50% methanol and 10% acetic acid in distilled water. Destaining of the slab gel was achieved in 30% methanol and 10% acetic acid. For silver staining, the procedure we used was that of Rabilloud with minor modifications [19]. Proteins were fixed overnight in 50% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid in distilled water before staining with 0.2% (v/v) silver nitrate (Fluka Analytical, Buchs, Switzerland). Proteins were revealed with 3% (w/v) sodium carbonate, 0.05% (v/v) formaldehyde and 0.0004% (w/v) anhydrous sodium thiosulfate (all from Sigma-Aldrich).

2.5. In-gel protein digestion

Pieces of gel containing proteins of interest were cut out with a razor blade and washed for 30 min with 100 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate and 30% acetonitrile (ACN). Gel pieces were then dried for 30 min in a Hetovac vacuum centrifuge (HETO, Allerod, Denmark). Dried pieces of gel were rehydrated for 45 min at 4 $^{\circ}$ C in 5–20 μ L of a solution of 50 mM ammonium bicarbonate containing sequencing grade trypsin at 6.25 ng/ μ L (Promega, Madison, WI, USA). After overnight incubation at 37 $^{\circ}$ C, gel pieces were dried in high vacuum centrifuge before being rehydrated by the addition of 20 μ L of H₂O and finally dried again. Elution of the peptides was performed with 20 μ L of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) for 20 min at room temperature with occasional shaking. The TFA solution containing the peptides was transferred to a polypropylene tube. A second elution of the peptides was performed with 20 μ L of 0.1% TFA in 50% ACN for 20 min at room temperature with occasional shaking. The second TFA solution was pooled with the first one. The volume of the pooled extracts was reduced to

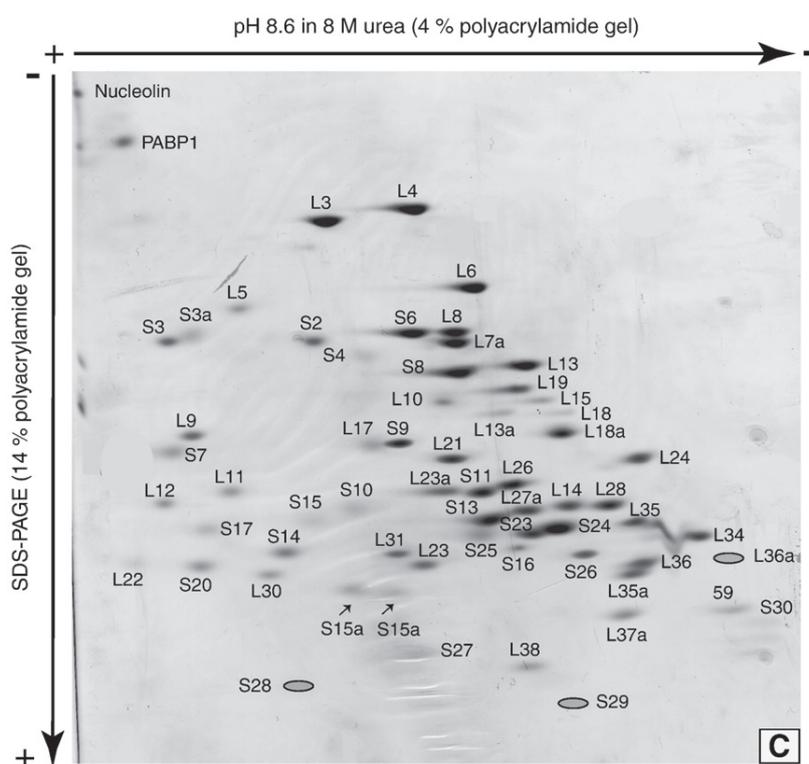


Fig. 1 (continued).

1–2 μL by evaporation under vacuum. Controls of extraction (blanks) were performed using pieces of gels devoid of proteins.

2.6. Liquid digestion and tandem mass tag (TMT) labelling

50 μg of lyophilized ribosomal proteins from all three species were separately resuspended in 100 μL of 100 mM tetraethylammonium buffer (TEAB) adjusted to pH 8.0 with diluted HCl. To 100 μL of this solution, 1 μL of 1% SDS and 2 μL of 50 mM Tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) were added. The reduction was carried out at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. 1 μg of sequencing grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was added and the digestion was performed overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$. Next, TMT labelling was achieved for 1 h, after the addition of 40.3 μL of TMT duplex reagent in CH_3CN (i.e., 0.83 mg, 2.42×10^{-6} mol). RP of chicken embryo, human and rat dermal fibroblasts were labelled with triplex TMT with reporter-ion at $m/z=126.2$, $m/z=127.2$, and $m/z=128.2$ respectively. Then, 8 μL of hydroxylamine 5% was added in each tube for reaction during 15 min. The differentially TMT-labelled samples were pooled in a new tube and the resulting mixture was dried. The sample was desalted with a vidac C18 ultramicrospin column (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), dried, and re-dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{FA}$ 96.9/3/0.1 before LC-ESI-MS/MS analysis.

2.7. Mass spectrometry (MS)

MALDI-TOF/TOF MS analysis was performed with a 4800 Proteomics Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems,

Framingham, MA, USA) according to the tuning procedures suggested by the manufacturer. About 0.5 μL of sample was spotted on the MALDI target plate, dried, and re-dissolved in 0.5 μL of matrix solution (5 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 50%/50% with 10 mM NH_4PO_4). The laser fluence was set 5% above the threshold for MS and 15% above the threshold for MS/MS. MS spectra were acquired from 850 to 4,000 m/z units. Tandem mass spectra were acquired from $m/z=50$ to the precursor m/z ratio. The 20 most abundant peptides from each MS spectrum were selected for tandem mass spectrometry. Nitrogen was used in the collision cell, at a pressure of 5×10^{-7} Torr.

LC-ESI-MS/MS was performed on a LTQ Orbitrap XL from Thermo Electron (San Jose, CA, USA) equipped with a NanoAcquity system from Waters. Peptides were trapped on a home-made 5 μm 200 \AA Magic C18 AQ (Michrom) 0.1 \times 20 mm pre-column and separated on a home-made 5 μm 100 \AA Magic C18 AQ (Michrom) 0.75 \times 150 mm column with a gravity-pulled emitter. The analytical separation was run for 65 min using a gradient of $\text{H}_2\text{O}/\text{FA}$ 99.9%/0.1% (solvent A) and $\text{CH}_3\text{CN}/\text{FA}$ 99.9%/0.1% (solvent B). The gradient was run as follows: 0–1 min 95% A and 5% B, then to 65% A and 35% B at 55 min, and 20% A and 80% B at 65 min at a flow rate of 220 nL/min. For MS survey scans, the orbitrap (OT) resolution was set to 60,000 and the ion population was set to $5 \times \text{E}5$ with an m/z window from 400 to 2,000. For protein identification only (from 2-DE spots), up to five precursor ions were selected for collision-induced dissociation (CID) in the linear trap quadrupole (LTQ). For this, the ion population was set to 1×10^4 (isolation width of 2 m/z). The normalized collision energies were set to 35% for CID. For

Table 1 – Identification of human ribosomal proteins by 2-DE/mass spectrometry and by TMT spectrometry. Ribosomal proteins present in Swiss-Prot/trEMBL are listed in the first three columns, those identified by 2-DE/mass spectrometry in the 4th column and those identified by TMT spectrometry in the last column.

Swiss-Prot/trEMBL			2-DE/mass spectrometry	TMT/spectrometry
Protein name	Molecular mass	Swiss-Prot/trEMBL Accession number		
60S acidic ribosomal protein P0	34.274 kDa	P05388		60S acidic ribosomal protein P0
60S acidic ribosomal protein P1	11.514 kDa	P05386		60S acidic ribosomal protein P1
60S acidic ribosomal protein P2	11.665 kDa	P05387		60S acidic ribosomal protein P2
60S ribosomal protein L3	46.109 kDa	P39023	60S ribosomal protein L3	60S ribosomal protein L3
60S ribosomal protein L4	47.697 kDa	P36578	60S ribosomal protein L4	60S ribosomal protein L4
60S ribosomal protein L5	34.363 kDa	P46777	60S ribosomal protein L5	60S ribosomal protein L5
60S ribosomal protein L6	32.728 kDa	Q02878	60S ribosomal protein L6	60S ribosomal protein L6
60S ribosomal protein L7	29.226 kDa	P18124		60S ribosomal protein L7
60S ribosomal protein L7a	29.996 kDa	P62424	60S ribosomal protein L7a	60S ribosomal protein L7a
60S ribosomal protein L8	28.025 kDa	P62917	60S ribosomal protein L8	60S ribosomal protein L8
60S ribosomal protein L9	21.863 kDa	P32969	60S ribosomal protein L9	60S ribosomal protein L9
60S ribosomal protein L10	24.604 kDa	P27635	60S ribosomal protein L10	60S ribosomal protein L10
60S ribosomal protein L10a	24.831 kDa	P62906		60S ribosomal protein L10a
60S ribosomal protein L11	20.252 kDa	P62913	60S ribosomal protein L11	60S ribosomal protein L11
60S ribosomal protein L12	17.819 kDa	P30050	60S ribosomal protein L12	60S ribosomal protein L12
60S ribosomal protein L13	24.261 kDa	P26373	60S ribosomal protein L13	60S ribosomal protein L13
60S ribosomal protein L13a	23.577 kDa	P40429	60S ribosomal protein L13a	60S ribosomal protein L13a
60S ribosomal protein L14	23.432 kDa	P50914	60S ribosomal protein L14	60S ribosomal protein L14
60S ribosomal protein L15	24.146 kDa	P61313	60S ribosomal protein L15	60S ribosomal protein L15
60S ribosomal protein L17	21.397 kDa	P18621	60S ribosomal protein L17	60S ribosomal protein L17
60S ribosomal protein L18	21.634 kDa	Q07020	60S ribosomal protein L18	60S ribosomal protein L18
60S ribosomal protein L18a	20.762 kDa	Q02543	60S ribosomal protein L18a	60S ribosomal protein L18a
60S ribosomal protein L19	23.466 kDa	P84098		60S ribosomal protein L19
60S ribosomal protein L21	18.565 kDa	P46778	60S ribosomal protein L21	
60S ribosomal protein L22	14.787 kDa	P35268		60S ribosomal protein L22
60S ribosomal protein L23	14.865 kDa	P62829		60S ribosomal protein L23
60S ribosomal protein L23a	17.695 kDa	P62750	60S ribosomal protein L23a	60S ribosomal protein L23a
60S ribosomal protein L24	17.779 kDa	P83731	60S ribosomal protein L24	60S ribosomal protein L24
60S ribosomal protein L26	17.258 kDa	P61254	60S ribosomal protein L26	60S ribosomal protein L26
60S ribosomal protein L27	15.798 kDa	P61353		60S ribosomal protein L27
60S ribosomal protein L27a	16.561 kDa	P46776	60S ribosomal protein L27a	60S ribosomal protein L27a
60S ribosomal protein L28	15.748 kDa	P46779	60S ribosomal protein L28	60S ribosomal protein L28
60S ribosomal protein L29	17.752 kDa	P47914	60S ribosomal protein L29	
60S ribosomal protein L30	12.784 kDa	P62888	60S ribosomal protein L30	60S ribosomal protein L30
60S ribosomal protein L31	14.463 kDa	P62899	60S ribosomal protein L31	60S ribosomal protein L31
60S ribosomal protein L32	15.860 kDa	P62910	60S ribosomal protein L32	60S ribosomal protein L32
60S ribosomal protein L34	13.293 kDa	P49207	60S ribosomal protein L34	60S ribosomal protein L34
60S ribosomal protein L35	14.551 kDa	P42766	60S ribosomal protein L35	60S ribosomal protein L35
60S ribosomal protein L35a	12.538 kDa	P18077		60S ribosomal protein L35a
60S ribosomal protein L36	12.254 kDa	Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36	60S ribosomal protein L36
60S ribosomal protein L36a	12.441 kDa	P83881	60S ribosomal protein L36a	60S ribosomal protein L36a
60S ribosomal protein L37	11.078 kDa	P61927		
60S ribosomal protein L37a	10.275 kDa	P61513	60S ribosomal protein L37a	60S ribosomal protein L37a
60S ribosomal protein L38	8.218 kDa	P63173	60S ribosomal protein L38	
60S ribosomal protein L39	6.407 kDa	P62891		
60S ribosomal protein L40	6.181 kDa	P62987		
60S ribosomal protein L41	3.456 kDa	P62945		
40S ribosomal protein SA	32.854 kDa	P08865		40S ribosomal protein SA
40S ribosomal protein S2	31.324 kDa	P15880	40S ribosomal protein S2	40S ribosomal protein S2
40S ribosomal protein S3	26.688 kDa	P23396	40S ribosomal protein S3	40S ribosomal protein S3
40S ribosomal protein S3a	29.945 kDa	P61247	40S ribosomal protein S3a	40S ribosomal protein S3a
40S ribosomal protein S4, X isoform	29.598 kDa	P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	40S ribosomal protein S4, X isoform
40S ribosomal protein S5	22.876 kDa	P46782	40S ribosomal protein S5	
40S ribosomal protein S6	28.681 kDa	P62753	40S ribosomal protein S6	40S ribosomal protein S6
40S ribosomal protein S7	22.127 kDa	P62081	40S ribosomal protein S7	40S ribosomal protein S7
40S ribosomal protein S8	24.205 kDa	P62241	40S ribosomal protein S8	40S ribosomal protein S8
40S ribosomal protein S9	22.591 kDa	P46781	40S ribosomal protein S9	40S ribosomal protein S9
40S ribosomal protein S10	18.898 kDa	P46783	40S ribosomal protein S10	40S ribosomal protein S10
40S ribosomal protein S11	18.431 kDa	P62280	40S ribosomal protein S11	40S ribosomal protein S11

Table 1 (continued)

Protein name	Swiss-Prot/trEMBL		2-DE/mass spectrometry	TMT/spectrometry
	Molecular mass	Swiss-Prot/trEMBL Accession number		
40S ribosomal protein S12	14.515 kDa	P25398		40S ribosomal protein S12
40S ribosomal protein S13	17.222 kDa	P62277	40S ribosomal protein S13	40S ribosomal protein S13
40S ribosomal protein S14	16.273 kDa	P62263	40S ribosomal protein S14	40S ribosomal protein S14
40S ribosomal protein S15	17.040 kDa	P62841	40S ribosomal protein S15	40S ribosomal protein S15
40S ribosomal protein S15a	14.840 kDa	P62244	40S ribosomal protein S15a	40S ribosomal protein S15a
40S ribosomal protein S16	16.445 kDa	P62249	40S ribosomal protein S16	40S ribosomal protein S16
40S ribosomal protein S17	15.550 kDa	P08708	40S ribosomal protein S17	40S ribosomal protein S17
40S ribosomal protein S18	17.719 kDa	P62269	40S ribosomal protein S18	40S ribosomal protein S18
40S ribosomal protein S19	16.060 kDa	P39019	40S ribosomal protein S19	40S ribosomal protein S19
40S ribosomal protein S20	13.373 kDa	P60866	40S ribosomal protein S20	40S ribosomal protein S20
40S ribosomal protein S21	9.111 kDa	P63220		40S ribosomal protein S21
40S ribosomal protein S23	15.808 kDa	P62266	40S ribosomal protein S23	40S ribosomal protein S23
40S ribosomal protein S24	15.423 kDa	P62847	40S ribosomal protein S24	40S ribosomal protein S24
40S ribosomal protein S25	13.742 kDa	P62851	40S ribosomal protein S25	40S ribosomal protein S25
40S ribosomal protein S26	13.015 kDa	P62854	40S ribosomal protein S26	
40S ribosomal protein S27	9.461 kDa	P42677	40S ribosomal protein S27	40S ribosomal protein S27
40S ribosomal protein S27a	9.418 kDa	P62979		40S ribosomal protein S27a
40S ribosomal protein S28	7.841 kDa	P62857	40S ribosomal protein S28	40S ribosomal protein S28
40S ribosomal protein S29	6.677 kDa	P62273	40S ribosomal protein S29	
40S ribosomal protein S30	6.648 kDa	P62861		

protein identification and relative protein quantification (from liquid digests), up to 3 precursors were selected for both collision-induced dissociation in the LTQ and high-energy C-trap dissociation (HCD) with analysis in the orbitrap. For MS/MS in the LTQ, the ion population was set to 1×10^4 (isolation width of 2 m/z) while for MS/MS detection in the OT, it was set to 2×10^5 (isolation width of 4 m/z), with a resolution of 7,500, first mass at $m/z = 100$, and a maximum injection time of 750 ms. The normalized collision energies were set to 35% for CID and 60% for HCD.

2.8. Protein identification

Peak lists were generated from raw orbitrap data using the embedded software from the instrument manufacturer (extract_MSN.exe). The monoisotopic masses of the selected precursor ions were corrected using an in-house written Perl script [20]. Peak lists were generated from raw MALDI data using the instrument's manufacturer embedded software "peak to mascot". The peaklist files were searched against the Swiss-Prot/trEMBL database (release 15.10 of 03-Nov-2009) using Mascot (Matrix Sciences, London, UK). Human (98,529 sequences), rat (17,011 sequences) and other chordata (39,073 sequences) taxonomy was specified for database searching. For Orbitrap data, the parent ion tolerance was set to 10 ppm and the fragment ion tolerance to 0.6 Da. For MALDI data, the parent ion tolerance was set to 400 ppm and the fragment ion tolerance to 600 ppm. Variable amino acid modifications were oxidized methionine. Trypsin was selected as the enzyme, with one potential missed cleavage, and the normal cleavage mode was used. The mascot search was validated using Scaffold 2.06 (Proteome Software, Portland, OR). Only proteins

matching with two different peptides with a minimum probability score of 95% were considered identified.

2.9. Relative protein quantification (TMT)

Peak lists were generated from raw data using the embedded software from the instrument manufacturer (extract_MSN.exe). After peaklist generation, the CID and HCD spectra were merged for simultaneous identification and quantification [21] (http://www.expasy.org/tools/HCD_CID_merger.html). The monoisotopic masses of the selected precursor ions were corrected using an in-house written Perl script [20]. The corrected .mgf files were searched against the Swiss-Prot/trEMBL database (Release 15.10 of 03-Nov-2009) using Phenyx (GeneBio, Geneva, Switzerland). *Homo sapiens* (98,529 sequences), rat (17,011 sequences) and other chordata (39,073 sequences) taxonomy was specified for database searching. The parent ion tolerance was set to 10 ppm. Variable amino acid modifications were oxidized methionine. All cysteines were considered alkylated, and TMT label was considered present on all N-terminus peptides and lysine side chains. Trypsin was selected as the enzyme, with one potential missed cleavage, and the normal cleavage mode was used. Only one search round was used. The peptide p value was $1 E^{-2}$ for LTQ-OT data. False-positive ratios were estimated using a reverse decoy database [22]. All datasets were searched once in the forward and once in the reverse database. Separate searches were used to keep the database size constant. Peptide scores were then set up to maintain the false-positive peptide ratio below 1%. This method resulted in a slight overestimation of the false-positive ratio [22]. For all analyses, only proteins matching two different peptide sequences were kept.

Table 2 – Identification of rat ribosomal proteins by 2-DE/mass spectrometry and by TMT spectrometry. Ribosomal proteins present in Swiss-Prot/trEMBL are listed in the first three columns, those identified by 2-DE/mass spectrometry in the 4th column and those identified by TMT spectrometry in the last column.

Swiss-Prot/trEMBL			2-DE/mass spectrometry	TMT/spectrometry
Protein name	Molecular mass	Swiss-Prot/trEMBL Accession number		
60S acidic ribosomal protein P0	34.215 kDa	P19945		60S acidic ribosomal protein P0
60S acidic ribosomal protein P1	11.498 kDa	P19944		60S acidic ribosomal protein P1
60S acidic ribosomal protein P2	11.692 kDa	P02401		60S acidic ribosomal protein P2
60S ribosomal protein L3	46.136 kDa	P21531	60S ribosomal protein L3	60S ribosomal protein L3
60S ribosomal protein L4	47.257 kDa	P50878	60S ribosomal protein L4	60S ribosomal protein L4
60S ribosomal protein L5	34.459 kDa	P09895	60S ribosomal protein L5	60S ribosomal protein L5
60S ribosomal protein L6	33.562 kDa	P21533	60S ribosomal protein L6	60S ribosomal protein L6
60S ribosomal protein L7	30.329 kDa	P05426	60S ribosomal protein L7	
60S ribosomal protein L7a	29.996 kDa	P62425	60S ribosomal protein L7a	60S ribosomal protein L7a
60S ribosomal protein L8	28.025 kDa	P62919	60S ribosomal protein L8	60S ribosomal protein L8
60S ribosomal protein L9	21.893 kDa	P17077	60S ribosomal protein L9	60S ribosomal protein L9
60S ribosomal protein L10	24.604 kDa	Q6PDV7	60S ribosomal protein L10	60S ribosomal protein L10
60S ribosomal protein L10a	24.831 kDa	P62907	60S ribosomal protein L10a	60S ribosomal protein L10a
60S ribosomal protein L11	20.252 kDa	P62914	60S ribosomal protein L11	60S ribosomal protein L11
60S ribosomal protein L12	17.846 kDa	P23358	60S ribosomal protein L12	
60S ribosomal protein L13	24.309 kDa	P41123	60S ribosomal protein L13	60S ribosomal protein L13
60S ribosomal protein L13a	23.476 kDa	P35427	60S ribosomal protein L13a	60S ribosomal protein L13a
60S ribosomal protein L14	23.339 kDa	Q63507	60S ribosomal protein L14	60S ribosomal protein L14
60S ribosomal protein L15	24.146 kDa	P61314	60S ribosomal protein L15	60S ribosomal protein L15
60S ribosomal protein L17	21.397 kDa	P24049	60S ribosomal protein L17	60S ribosomal protein L17
60S ribosomal protein L18	21.659 kDa	P12001	60S ribosomal protein L18	60S ribosomal protein L18
60S ribosomal protein L18a	20.732 kDa	P62718	60S ribosomal protein L18a	60S ribosomal protein L18a
60S ribosomal protein L19	23.466 kDa	P84100	60S ribosomal protein L19	60S ribosomal protein L19
60S ribosomal protein L21	18.466 kDa	P20280	60S ribosomal protein L21	60S ribosomal protein L21
60S ribosomal protein L22	14.789 kDa	P47198	60S ribosomal protein L22	60S ribosomal protein L22
60S ribosomal protein L23	14.865 kDa	P62832	60S ribosomal protein L23	60S ribosomal protein L23
60S ribosomal protein L23a	17.695 kDa	P62752	60S ribosomal protein L23a	60S ribosomal protein L23a
60S ribosomal protein L24	17.779 kDa	P83732	60S ribosomal protein L24	60S ribosomal protein L24
60S ribosomal protein L26	17.277 kDa	P12749	60S ribosomal protein L26	60S ribosomal protein L26
60S ribosomal protein L27	15.798 kDa	P61354	60S ribosomal protein L27	60S ribosomal protein L27
60S ribosomal protein L27a	16.618 kDa	P18445	60S ribosomal protein L27a	60S ribosomal protein L27a
60S ribosomal protein L28	15.849 kDa	P17702	60S ribosomal protein L28	60S ribosomal protein L28
60S ribosomal protein L29	17.326 kDa	P25886	60S ribosomal protein L29	
60S ribosomal protein L30	12.784 kDa	P62890	60S ribosomal protein L30	60S ribosomal protein L30
60S ribosomal protein L31	14.463 kDa	P62902	60S ribosomal protein L31	60S ribosomal protein L31
60S ribosomal protein L32	15.860 kDa	P62912	60S ribosomal protein L32	60S ribosomal protein L32
60S ribosomal protein L34	13.507 kDa	P11250	60S ribosomal protein L34	60S ribosomal protein L34
60S ribosomal protein L35	14.553 kDa	P17078	60S ribosomal protein L35	60S ribosomal protein L35
60S ribosomal protein L35a	12.554 kDa	P04646	60S ribosomal protein L35a	60S ribosomal protein L35a
60S ribosomal protein L36	12.268 kDa	P39032	60S ribosomal protein L36	60S ribosomal protein L36
60S ribosomal protein L36a	12.441 kDa	P83883	60S ribosomal protein L36a	60S ribosomal protein L36a
60S ribosomal protein L37	11.078 kDa	P61928		
60S ribosomal protein L37a	10.275 kDa	P61515	60S ribosomal protein L37a	60S ribosomal protein L37a
60S ribosomal protein L38	8.218 kDa	P63174		60S ribosomal protein L38
60S ribosomal protein L39	6.407 kDa	P62893		
60S ribosomal protein L40	14.728 kDa	P62986	60S ribosomal protein L40	
60S ribosomal protein L41	3.456 kDa	P62948		
40S ribosomal protein SA	32.824 kDa	P38983		40S ribosomal protein SA
40S ribosomal protein S2	31.231 kDa	P27952	40S ribosomal protein S2	40S ribosomal protein S2
40S ribosomal protein S3	26.674 kDa	P62909	40S ribosomal protein S3	40S ribosomal protein S3
40S ribosomal protein S3a	29.945 kDa	P49242	40S ribosomal protein S3a	40S ribosomal protein S3a
40S ribosomal protein S4 (homologous to human S4 X isoform)	29.598 kDa	P62703	40S ribosomal protein S4	40S ribosomal protein S4
40S ribosomal protein S5	22.878 kDa	P24050	40S ribosomal protein S5	
40S ribosomal protein S6	28.681 kDa	P62755	40S ribosomal protein S6	40S ribosomal protein S6
40S ribosomal protein S7	22.127 kDa	P62083	40S ribosomal protein S7	40S ribosomal protein S7
40S ribosomal protein S8	24.205 kDa	P62243	40S ribosomal protein S8	40S ribosomal protein S8
40S ribosomal protein S9	22.591 kDa	P29314	40S ribosomal protein S9	40S ribosomal protein S9
40S ribosomal protein S10	18.916 kDa	P63326	40S ribosomal protein S10	40S ribosomal protein S10
40S ribosomal protein S11	18.431 kDa	P62282	40S ribosomal protein S11	40S ribosomal protein S11

Table 2 (continued)

Protein name	Swiss-Prot/trEMBL		2-DE/mass spectrometry	TMT/spectrometry
	Molecular mass	Swiss-Prot/trEMBL Accession number		
40S ribosomal protein S12	14.525 kDa	P63324		40S ribosomal protein S12
40S ribosomal protein S13	17.222 kDa	P62278	40S ribosomal protein S13	40S ribosomal protein S13
40S ribosomal protein S14	16.259 kDa	P13471	40S ribosomal protein S14	40S ribosomal protein S14
40S ribosomal protein S15	17.040 kDa	P62845	40S ribosomal protein S15	40S ribosomal protein S15
40S ribosomal protein S15a	14.84 kDa	P62246	40S ribosomal protein S15a	40S ribosomal protein S15a
40S ribosomal protein S16	16.445 kDa	P62250	40S ribosomal protein S16	40S ribosomal protein S16
40S ribosomal protein S17	15.510 kDa	P04644	40S ribosomal protein S17	40S ribosomal protein S17
40S ribosomal protein S18	17.719 kDa	P62271	40S ribosomal protein S18	40S ribosomal protein S18
40S ribosomal protein S19	16.085 kDa	P17074	40S ribosomal protein S19	40S ribosomal protein S19
40S ribosomal protein S20	13.373 kDa	P60868	40S ribosomal protein S20	40S ribosomal protein S20
40S ribosomal protein S21	9.127 kDa	P05765		40S ribosomal protein S21
40S ribosomal protein S23	15.808 kDa	P62268	40S ribosomal protein S23	40S ribosomal protein S23
40S ribosomal protein S24	15.423 kDa	P62850	40S ribosomal protein S24	40S ribosomal protein S24
40S ribosomal protein S25	13.742 kDa	P62853	40S ribosomal protein S25	40S ribosomal protein S25
40S ribosomal protein S26	13.015 kDa	P62856	40S ribosomal protein S26	
40S ribosomal protein S27	9.461 kDa	Q71TY3	40S ribosomal protein S27	40S ribosomal protein S27
40S ribosomal protein S27a	9.404 kDa	P62982	40S ribosomal protein S27a	40S ribosomal protein S27a
40S ribosomal protein S28	7.841 kDa	P62859	40S ribosomal protein S28	40S ribosomal protein S28
40S ribosomal protein S29	6.677 kDa	P62275	40S ribosomal protein S29	
40S ribosomal protein S30	6.648 kDa	P62864	40S ribosomal protein S30	40S ribosomal protein S30

Reporter-ion abundance for each matched peptide was directly extracted from the LTQ-OT peak lists using the dedicated Phenyx export.

3. Results

3.1. Identification of ribosomal proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry

We used a 2-DE system in which RP were separated according to their electric charge at pH 8.6 in a 4% polyacrylamide gel containing 8 M urea in the first dimension, and to their molecular mass in the presence of SDS in a 14% polyacrylamide gel in the second dimension. RP were extracted from an amount of HeLa, rat liver or chicken T2EC ribosomes corresponding to 5 OD, measured at 260 nm. They were reduced and alkylated before separation. Proteins were visualized either by Coomassie brilliant blue or by silver staining. The 2D-maps obtained for human, rat and chicken RP are shown in Fig. 1. At first glance, spot position of RP separated by 2-DE appear very similar from one species to another. Nevertheless, RP of different origin showed subtle differences in migration. Spots were cut out of the gels and identified by mass spectrometry. For human and rat, peaklist files were directly searched against the Swiss-Prot/trEMBL human and rat databases. For chicken, direct comparison was not possible because most of the chicken RP were not characterized in databases. Therefore chicken peaklist files were searched against the Swiss-Prot/trEMBL databases of human, rat and other chordata taxonomy.

Sixty human RP were resolved and identified as well as two other proteins, PABP1 (poly(A)-binding protein 1) and histone H4 (Fig. 1A). Thirty-three of them were attributed to the 60S subunit and twenty-seven to the 40S subunit (Tables 1 and 5).

Sixty-nine rat liver RP and PABP1 were resolved and identified in the same conditions (Fig. 1B), forty of them belonging to the large subunit and twenty-nine to the small one (Tables 2 and 5). Following the strategy described previously, fifty-eight RP, PABP1, nucleolin and eEF-1 α 1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) were identified in the chicken ribosome (Fig. 1C), thirty-four of which belong to the large subunit and twenty-four to the small one (Tables 3 and 5).

3.2. Identification of ribosomal proteins by tandem mass tag spectrometry

To complete the 2-DE analyses, RP from the three species were also identified by tandem mass spectrometry directly coupled to liquid chromatography (LC-MS/MS). For relative protein quantification between different species, the peptides were labelled using isobaric tags (tandem mass tags or TMT). This method allows the simultaneous identification and the relative quantification in tandem mass spectrometry mode. Purified, reduced and alkylated human, rat dermal fibroblasts and chicken embryo fibroblasts RP were extracted from 5 OD measured at 260 nm. They were first digested by trypsin separately and the released peptides were labelled with a set of three structurally identical tags. These tags are composed of a primary amine reactive group and an isotopic reporter group linked by an isotopic balancer group for the normalization of the total mass of the tags. The reporter group serves for quantification since it is cleaved during collision-induced dissociation to yield a characteristic isotope fragment. Tags are reactive toward free amino-terminus peptides and epsilon-amino functions of lysine residues. Human, rat and chicken RP were labelled respectively with three tags that have a specific reporter-ion that appears at $m/z=128.2$, $m/z=127.2$, and $m/z=126.2$ as described in the Materials and methods. Starting from the same RP samples with the same labelling method, another analysis by LC-MS/MS spectrometry was carried out.

Table 3 – Identification of chicken ribosomal proteins by 2-DE/mass spectrometry and by TMT spectrometry. Ribosomal proteins present in Swiss-Prot/trEMBL are listed in the first three columns, those identified by 2-DE/mass spectrometry in the 4th, 5th and 6th columns and those identified by TMT spectrometry in the last three columns.

Swiss-Prot/trEMBL			2-DE/mass spectrometry			TMT/spectrometry		
Protein name	Molecular mass	Swiss-Prot/trEMBL Accession number	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL Accession number	Species used for identification	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL Accession number	Species used for identification
60S acidic ribosomal protein P0	34.286 kDa	P47826	60S acidic ribosomal protein P0		<i>Gallus gallus</i>	60S acidic ribosomal protein P0	P47826	<i>Gallus gallus</i>
60S acidic ribosomal protein P1	11.477 kDa	P18660	60S acidic ribosomal protein P1			60S acidic ribosomal protein P1	P18660	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein L1 (L10a)	20.798 kDa	Q6EE62				Ribosomal protein L1 (L10a)	Q6EE62	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L5	34.091 kDa	P22451	60S ribosomal protein L5	P22451	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L5	P22451	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L6	33.923 kDa	Q8UWG7	60S ribosomal protein L6	Q8UWG7	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L6	Q8UWG7	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L7	28.780 kDa	Q5ZJ56				60S ribosomal protein L7	Q5ZJ56	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L7a	30.000 kDa	P32429	60S ribosomal protein L7a	P32429	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L7a	P32429	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L10	23.987 kDa	Q08200	60S ribosomal protein L10	Q08200	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L10	Q08200	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L13	24.396 kDa	P41125	60S ribosomal protein L13	P41125	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L13	P41125	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein L14	15.478 kDa	Q98TF9	Ribosomal protein L14	Q98TF9	<i>Gallus gallus</i>			
60S ribosomal protein L15	19.305 kDa	P51417	60S ribosomal protein L15	P51417	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L15	P51417	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein L17	18.110 kDa	Q6EE61	Ribosomal protein L17	Q6EE61	<i>Gallus gallus</i>	Ribosomal protein L17	Q6EE61	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein L18	18.849 kDa	Q6EE60	Ribosomal protein L18	Q6EE60	<i>Gallus gallus</i>	Ribosomal protein L18	Q6EE60	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein L19	20.767 kDa	Q6EE39	Ribosomal protein L19	Q6EE39	<i>Gallus gallus</i>	Ribosomal protein L19	Q6EE39	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L22	14.729 kDa	Q98TF8	60S ribosomal protein L22	Q98TF8	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L22	Q98TF8	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L26	15.165 kDa	P47832	60S ribosomal protein L26	P61254	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L26	P47832	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L27	15.798 kDa	P61355				60S ribosomal protein L27	P61355	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L30	12.814 kDa	P67883	60S ribosomal protein L30	P67883	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L30	P67883	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L35	14.551 kDa	Q98TF7	60S ribosomal protein L35	Q6DDB6	<i>Xenopus tropicalis</i>	60S ribosomal protein L35	Q98TF7	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L36	12.296 kDa	Q98TF6	60S ribosomal protein L36	Q98TF6	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L36	Q98TF6	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L37a	10.247 kDa	P32046	60S ribosomal protein L37a	P32046	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L37a	P32046	<i>Gallus gallus</i>
60S ribosomal protein L39	6.379 kDa	Q98TF5						
60S ribosomal protein L40	6.181 kDa	P62985						
40S ribosomal protein SA	33.021 kDa	P50890	Putative uncharacterized protein (S3)		<i>Gallus gallus</i>	40S ribosomal protein SA	P50890	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein S3	23.219 kDa	Q6EE58				Ribosomal protein S3	Q6EE58	<i>Gallus gallus</i>
40S ribosomal protein S4	29.595 kDa	P47836	40S ribosomal protein S4	P47836	<i>Gallus gallus</i>	40S ribosomal protein S4	P47836	<i>Gallus gallus</i>
40S ribosomal protein S6	28.654 kDa	P47838	Ribosomal protein S6	Q9PTD6	<i>Gallus gallus</i>	Ribosomal protein S6	P47838	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein S8	21.842 kDa	Q6EE57	Ribosomal protein S8	Q6EE57	<i>Gallus gallus</i>	Ribosomal protein S8	Q6EE57	<i>Gallus gallus</i>
Ribosomal protein S11	18.347 kDa	Q98TH5	Ribosomal protein S11	Q98TH5	<i>Gallus gallus</i>	Ribosomal protein S11	Q98TH5	<i>Gallus gallus</i>
40S ribosomal protein S12	14.545 kDa	P84175				40S ribosomal protein S12	P84175	<i>Gallus gallus</i>
40S ribosomal protein S13	17.222 kDa	Q6ITC7	40S ribosomal protein S13	Q6ITC7	<i>Gallus gallus</i>	40S ribosomal protein S13	Q6ITC7	<i>Gallus gallus</i>
40S ribosomal protein S15	17.040 kDa	P62846				40S ribosomal protein S15	P62846	<i>Gallus gallus</i>
40S ribosomal protein S17	15.538 kDa	P08636	40S ribosomal protein S17	P08636	<i>Gallus gallus</i>	40S ribosomal protein S17	P08636	<i>Gallus gallus</i>

40S ribosomal protein S27a	9.432 kDa	P79781							
60S ribosomal protein L3		P21531	<i>Rattus norvegicus</i>	40S ribosomal protein S27a	P79781	<i>Gallus gallus</i>			
60S ribosomal protein L4		Q6EE59	<i>Gallus gallus</i>	60S ribosomal protein L4	Q6EE59	<i>Gallus gallus</i>			
60S ribosomal protein L8		Q6PBF0	<i>Xenopus tropicalis</i>						
60S ribosomal protein L9		P17077	<i>Rattus norvegicus</i>						
Putative uncharacterized protein (L11)		Q5Z156	<i>Gallus gallus</i>						
60S ribosomal protein L12		P30050	<i>Homo sapiens</i>						
Putative uncharacterized protein (L13a)		Q28HK3	<i>Xenopus tropicalis</i>						
60S ribosomal protein L18a		Q02543	<i>Homo sapiens</i>						
60S ribosomal protein L21		P46778	<i>Homo sapiens</i>						
60S ribosomal protein L23		P62829	<i>Homo sapiens</i>						
60S ribosomal protein L23a		P62750	<i>Homo sapiens</i>						
60S ribosomal protein L24		P83731	<i>Homo sapiens</i>						
60S ribosomal protein L27a		P46776	<i>Homo sapiens</i>						
Putative uncharacterized protein (L28)		Q5F346	<i>Gallus gallus</i>						
60S ribosomal protein L31		P62899	<i>Homo sapiens</i>						
60S ribosomal protein L34		P49207	<i>Homo sapiens</i>						
Ribosomal protein L35a		Q6DDB6	<i>Xenopus tropicalis</i>						
60S ribosomal protein L38		P63174	<i>Rattus norvegicus</i>						
Ribosomal protein S2		Q6IPX5	<i>Homo sapiens</i>						
40S ribosomal protein S3a-A		Q801S3	<i>Xenopus laevis</i>						
40S ribosomal protein S7		P62083	<i>Rattus norvegicus</i>						
40S ribosomal protein S9		P46781	<i>Homo sapiens</i>						
Rps10-prov protein		Q7SZU3	<i>Xenopus laevis</i>						
Putative uncharacterized protein (S14)		Q5ZHW8	<i>Gallus gallus</i>						
40S ribosomal protein S15a		P62246	<i>Rattus norvegicus</i>						
Ribosomal protein S16		A2Q0T2	<i>Solea senegalensis</i>						
40S ribosomal protein S20		P60866	<i>Homo sapiens</i>						
40S ribosomal protein S23		P62266	<i>Homo sapiens</i>						
40S ribosomal protein S24		P62847	<i>Homo sapiens</i>						
40S ribosomal protein S25		Q6PBI5	<i>Dario rerio</i>						
Putative uncharacterized protein (S26)		Q5ZM66	<i>Gallus gallus</i>						
40S ribosomal protein S27		Q71TY3	<i>Rattus norvegicus</i>						
40S ribosomal protein S28		P62859	<i>Rattus norvegicus</i>						
40S ribosomal protein S29		P62275	<i>Rattus norvegicus</i>						
40S ribosomal protein S30		P62864	<i>Rattus norvegicus</i>						

Table 4 – Non-ribosomal proteins identified by TMT spectrometry among human, rat and chicken ribosomal proteins. In the upper part of the table are listed proteins identified in all three species. Below the line are listed other proteins identified in only one or two of the three species.

Human		Rat		Chicken	
Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	P63102	14-3-3 protein zeta/delta	Q5ZKC9	14-3-3 protein zeta/delta
P62191	26S protease regulatory subunit 4	P62193	26S protease regulatory subunit 4	Q90732	26S protease regulatory subunit 4
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Q5ZL72	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	P06761	78 kDa glucose-regulated protein	Q90593	78 kDa glucose-regulated protein
P60709	Actin, cytoplasmic 1	P60711	Actin, cytoplasmic 1	P60706	Actin, cytoplasmic 1
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	Q63396	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	Q5ZK63	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15
P07355	Annexin A2	Q07936	Annexin A2	P17785	Annexin A2
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Q5ZLC5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
P35606	Coatomer subunit beta'	O35142	Coatomer subunit beta'	Q5ZIA5	Coatomer subunit beta
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	Q641Y0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	P48440	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	P62630	Elongation factor 1-alpha 1	Q5ZKM2	Elongation factor 1-alpha
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	P68101	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	Q5ZLX2	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Q641X8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Q5ZLA5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
O15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	Q6P9U8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	Q5ZLE6	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H
O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	A0JPM9	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	Q5ZKA4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J
P06396	Gelsolin	Q68FP1	Gelsolin	O93510	Gelsolin
P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P63245	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P63247	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	P11501	Heat shock protein HSP 90-alpha
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	Q04619	Heat shock cognate protein HSP 90-beta
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q5ZIQ3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	Q5RJR8	Leucine-rich repeat-containing protein 59	Q5F334	Leucine-rich repeat-containing protein 59
P35579	Myosin-9	Q62812	Myosin-9	P14105	Myosin-9
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	P62961	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Q06066	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
P19338	Nucleolin	P13383	Nucleolin	P15771	Nucleolin
P06748	Nucleophosmin	P13084	Nucleophosmin	P16039	Nucleophosmin
P35232	Prohibitin	P67779	Prohibitin	P84173	Prohibitin
Q99623	Prohibitin-2	Q5XIH7	Prohibitin-2	Q5ZMN3	Prohibitin-2
P25786	Proteasome subunit alpha type-1	P18420	Proteasome subunit alpha type-1	O42265	Proteasome subunit alpha type-1
O14818	Proteasome subunit alpha type-7	P48004	Proteasome subunit alpha type-7	O13268	Proteasome subunit alpha type-7
P07237	Protein disulfide-isomerase	P04785	Protein disulfide-isomerase	P09102	Protein disulfide-isomerase
Q15019	Septin-2	Q91Y81	Septin-2	Q5ZMH1	Septin-2
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	P28480	T-complex protein 1 subunit alpha	Q5ZMG9	T-complex protein 1 subunit alpha
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	Q7TPB1	T-complex protein 1 subunit delta	Q5ZMG3	T-complex protein 1 subunit delta
Q00341	Vigilin	Q9Z1A6	Vigilin	P81021	Vigilin
P35580	Myosin-10	Q6AYD3	Proliferation-associated 2G4	Q789A6	Nonmuscle myosin heavy chain
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	B0K031	RCG30479, isoform CRA_b	O73885	Heat shock cognate 71 kDa protein
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	Q9JLTO	Myosin-10	Q5ZII1	Putative uncharacterized protein
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P05197	Elongation factor 2	Q5ZMU9	Putative uncharacterized protein/Valosin containing protein
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Q62667	Major vault protein	Q90705	Elongation factor 2
Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	Q6EE31	T-complex protein 1 subunit theta

Table 4 (continued)

Human		Rat		Chicken	
Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	Q66X93	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q5ZJZ2	Putative uncharacterized protein
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	B2RYU2	RCG45615, isoform CRA_a	P24032	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle minor isoform
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	P13832	Myosin regulatory light chain RLC-A	Q90XD9	Transcriptional coactivator p100
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	P46462	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Q8UVX3	ATP synthase subunit alpha
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	Q64560	Tripeptidyl-peptidase 2	Q5ZL53	Putative uncharacterized protein
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q6P502	T-complex protein 1 subunit gamma	Q5ZHW8	Putative uncharacterized protein
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	Q6AXS5	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	Q5ZMB8	Putative uncharacterized protein
O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	P38650	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Q5F3L2	Putative uncharacterized protein
Q14764	Major vault protein	Q9EPH8	Polyadenylate-binding protein 1	Q5F346	Putative uncharacterized protein
P16989	DNA-binding protein A	P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Q5ZIT7	Putative uncharacterized protein
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Q62764	DNA-binding protein A	Q5F418	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	B2RZD4	RCG28883, isoform CRA_b	Q90631	Kinectin
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	Q63347	26S protease regulatory subunit 7	Q9DDH7	ATP synthase alpha subunit
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	Q9QZX1	Nucleolin-related protein NRP	Q5ZJK8	T-complex protein 1 subunit eta
P60660	Myosin light polypeptide 6	Q4G061	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	Q5F428	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L
P29144	Tripeptidyl-peptidase 2	P60901	Proteasome subunit alpha type-6	P02607	Myosin light polypeptide 6
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	P07153	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	Q9PST8	Polyubiquitin
P35998	26S protease regulatory subunit 7	B2GUY3	Pabpc4 protein	Q5XNV3	Cytoplasmic activation-proliferation-associated protein 1
Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	Q4FZT9	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	P00548	Pyruvate kinase muscle isozyme
Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	A9ZSZ9	RNA granule protein 105	Q5ZJ86	Putative uncharacterized protein
P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A	Q5PPJ7	Psm1 protein	Q5ZMS3	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3
Q14444	Caprin-1	Q3MIB2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Q07718	ES/130
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	Q9JHW0	Proteasome subunit beta type-7	Q5ZKX2	Putative uncharacterized protein
Q9Y262	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	Q5XIM9	T-complex protein 1 subunit beta	Q5F424	Putative uncharacterized protein
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Q3MHS9	Chaperonin containing Tcp1, subunit 6A (Zeta 1)	Q5ZJQ5	Putative uncharacterized protein
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	P02793	Ferritin light chain 1	P98157	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1
P49721	Proteasome subunit beta type-2	Q498D2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	P51913	Alpha-enolase
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Q64119	Myosin light polypeptide 6	Q5ZI56	Putative uncharacterized protein
Q99700	Ataxin-2	B2RYX0	Naca protein	Q90VX2	ATP synthase subunit alpha
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Q63569	26S protease regulatory subunit 6A	Q5ZLA7	Putative uncharacterized protein
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	P28073	Proteasome subunit beta type-6	P00340	L-lactate dehydrogenase A chain
P62988	Ubiquitin	P11980	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Q5ZLH7	Putative uncharacterized protein
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Q68FR9	Elongation factor 1-delta	Q5ZHU4	Putative uncharacterized protein
P07437	Tubulin beta chain	B4F7C9	Stt3a protein	P09244	Tubulin beta-7 chain

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Human		Rat		Chicken	
Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name
P04350	Tubulin beta-4 chain	P21670	Proteasome subunit alpha type-4	P00356	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q32PW9	Psmc6 protein	Q5ZLU4	Putative uncharacterized protein
Q9UBQ5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	P62198	26S protease regulatory subunit 8	Q5ZM05	Putative uncharacterized protein
O75955	Flotillin-1	B0BN93	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q5F456	Putative uncharacterized protein
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	B0BNA7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Q90WU3	ATP-dependent RNA helicase DDX1
P14868	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	Q6P9U7	L-lactate dehydrogenase	Q9YQG1	Elongation factor 1-beta
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Q5EBB0	Similar to 14-3-3 protein sigma	Q5ZHY1	Putative uncharacterized protein
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	P35213	14-3-3 protein beta/alpha	Q90650	Rous sarcoma virus transcription enhancer factor II
Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	P12075	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Q5ZJX9	Proteasome subunit alpha type
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	P35434	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	P09206	Tubulin beta-3 chain
Q9NZM1	Myoferlin	P34064	Proteasome subunit alpha type-5	Q5ZMF6	Putative uncharacterized protein
Q9Y3I0	UPF0027 protein C22orf28	Q32PX2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	Q5ZM80	Putative uncharacterized protein
Q99613	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Q5XIM7	Lysyl-tRNA synthetase	P40220	Cellular retinoic acid-binding protein 1
Q8IYT4	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	P40307	Proteasome subunit beta type-2	Q5ZJ54	T-complex protein 1 subunit zeta
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Q6MG17	Flotillin 1	Q5ZJS9	Proteasome subunit beta type
O76094	Signal recognition particle 72 kDa protein	B5DFB6	Atxn2 protein	Q5ZKM9	Putative uncharacterized protein
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	P30009	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Q90ZK7	Putative FK506-binding protein
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	Q0QEU1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q9W744	DEAD-box RNA helicase
Q86UP2	Kinectin	Q7TP47	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	Q2PBA1	RNase L inhibitor
Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	A9CMB7	Aspartyl-tRNA synthetase	Q5ZMD9	Putative uncharacterized protein
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	Q8K5B7	Neuron-specific class III beta-tubulin	P0C1H3	Histone H2B 1/2/3/4/6
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	B4F7C2	RCG45085 Tubulin, beta 4	P19336	Protein CYR61
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	P12244	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase
P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	Q6AYT3	UPF0027 protein C22orf28 homolog	Q5ZLW7	Putative uncharacterized protein
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	P29457	Serpin H1	Q5F411	Putative uncharacterized protein
P36957	Dihydrodipicolyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	B5DF03	Fkbp3 protein	P84169	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13
Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Q5XH20	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Q2MHD5	Cytoplasmic dynein
P62333	26S protease regulatory subunit 10B	Q62785	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	Q5ZL48	Putative uncharacterized protein
P43686	26S protease regulatory subunit 6B	Q1JU68	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	P34065	Proteasome subunit beta type-5
P78371	T-complex protein 1 subunit beta	Q6IMF3	Keratin, type II cytoskeletal 1	Q5ZIM5	Methionine aminopeptidase 1

Table 4 (continued)

Human		Rat		Chicken	
Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name
O75569	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	B0BND9	Srp72 protein	Q5F354	Putative uncharacterized protein
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	P49432	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Q6EE32	Calreticulin
P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	P07583	Beta-galactoside-binding lectin
P28072	Proteasome subunit beta type-6	P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Q5F3V2	Putative uncharacterized protein
P62195	26S protease regulatory subunit 8	Q6AYK8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	Q5ZM58	Putative uncharacterized protein
O15371	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	O08730	Glycogenin-1	P02552	Tubulin alpha-1 chain
P27816	Microtubule-associated protein 4	Q00438	Polypyrimidine tract-binding protein 1	Q6JLB2	Proteasome subunit beta type
Q9Y2L5	Protein TRS85 homolog	Q4V8C7	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	Q9DEQ6	Eukaryote initiation factor 2 beta
O43402	Neighbor of COX4	B5DEL9	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	Q5ZL57	Coatomer subunit delta
P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	B6DTP5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	Q5ZM42	Putative uncharacterized protein
P48741	Putative heat shock 70 kDa protein 7	Q63570	26S protease regulatory subunit 6B	O42283	Heat shock protein 10
P62633	Cellular nucleic acid-binding protein	P62966	Cellular retinoic acid-binding protein 1	Q5F3C5	Putative uncharacterized protein
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Q5ZMC8	Putative uncharacterized protein
Q9UNL2	Translocon-associated protein subunit gamma	Q5FVL2	Neighbor of COX4	Q5ZJ27	Protein Hook homolog 1
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	Q6AYH5	Dynactin subunit 2	P24367	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	Q63555	SP120	Q5ZIY4	Ribosome maturation protein SBDS
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	Q6TXE9	LRRGT00050	Q5ZKP8	Lysyl-tRNA synthetase
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	Q9JIJ7	DEAD-box protein 1	Q09121	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
Q16181	Septin-7	A0JPK2	Proteasome subunit alpha type	P02612	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle major isoform
Q99436	Proteasome subunit beta type-7	Q6QI16	LRRGT00192	Q5ZIQ4	Enolase
Q13162	Peroxiredoxin-4	Q9Z0V5	Peroxiredoxin-4	Q9I8D6	T-complex protein 1 subunit delta
Q9Y4G6	Talin-2	Q63716	Peroxiredoxin-1	Q5ZI14	Putative uncharacterized protein
Q6P1L8	39S ribosomal protein L14, mitochondrial	Q9ES72	Protein CYR61	Q8JFP1	Eukaryotic initiation factor 4A-II
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	Q6PCT9	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6	P08267	Ferritin heavy chain
O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	Q68FQ0	T-complex protein 1 subunit epsilon	Q5F3T3	Putative uncharacterized protein
		Q5U2S7	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	Q5ZJ35	Putative uncharacterized protein
		Q6P6G9	Hnrpa1 protein	Q5ZIE3	Putative uncharacterized protein
		Q9Z1W6	Protein LYRIC	Q805C1	Glycogen synthase
		P61621	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	Q5F419	Putative uncharacterized protein
		Q6AYZ1	Tubulin alpha-1C chain	Q90706	CLE7
		Q00715	Histone H2B type 1	P47807	Myosin-Ia

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Human		Rat		Chicken	
Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name	Swiss-Prot/trEMBL	Protein name
		Q8K4F9	Fragile-X mental retardation related protein 2	P85000	Trypsin inhibitor CITI-1
		Q66H80	Coatomer subunit delta	Q800K9	Surfeit locus protein 4
		Q5PQK2	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (Human)	Q5F3T4	Putative uncharacterized protein
		Q5PPJ6	Leucyl-tRNA synthetase	Q5ZK94	Putative uncharacterized protein
		Q6AY21	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	Q5ZIE2	Putative uncharacterized protein
		Q7TP50	Ab2-255		
		Q9ESY8	Stau1 protein		
		P34067	Proteasome subunit beta type-4		
		Q3B8P5	Psm8 protein		
		Q6TMG5	NF-kappa-B essential modulator		
		B0BN96	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3		
		ou P81795			
		Q64122	Myosin regulatory light polypeptide 9		
		P69897	Tubulin beta-5 chain		
		Q566E4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R		
		Q32PZ7	Srp72 protein		
		B5DEP6	Putative uncharacterized protein		
		Q08013	Translocon-associated protein subunit gamma		
		Q9ESH1	26S proteasome subunit S5a		
		P62634	Cellular nucleic acid-binding protein		
		Q6P685	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (Beta)		
		Q9JIL3	Interleukin enhancer-binding factor 3		
		Q0QEP3	ATP synthase subunit beta		
		Q9WVCO	Septin-7		
		P10960	Sulfated glycoprotein 1		
		Q6P3V8	Eukaryotic translation initiation factor 4A1		
		Q6IG01	Keratin, type II cytoskeletal 1b		
		Q01205	Dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial		
		B2RYW7	RCG26543, isoform CRA_b		
		Q4V8E2	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14		
		Q6VV72	Eukaryotic translation initiation factor 1A		
		O35109	Dynein light intermediate chain 53/55		
		Q9Z270	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A		
		Q7TP91	Ab1-205		
		P28064	Proteasome subunit beta type-8		

Identification of RP was performed with the same databases as described for 2-DE.

By combining the results obtained for the two replicates, sixty-eight human RP were identified (Tables 1 and 5). Fifteen of them had not been visualized after 2-DE separation. Sixty-nine RP from rat dermal fibroblasts were identified in the same conditions among which seven were not identified by 2-DE

(Tables 2 and 5). Thirty-two chicken RP were identified, nine of them being not visualized after 2-DE separation. Unlike the 2-DE analysis, TMT spectrometry allows identification of RP exhibiting a $pI < 8.6$. For the three species RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPSA and RPS12, all of them with a $pI < 8.6$ were thus identified by TMT. In addition, the TMT spectrometry analysis allowed us to identify a few more basic RP not visualized by 2-DE,

Table 5 – Orthologs ribosomal proteins identified by 2-DE/mass spectrometry and/or by TMT/spectrometry at human, rat and chicken.

Protein name	Species		
	Human	Rat	Chicken
60S acidic ribosomal protein P0	TMT	TMT	TMT
60S acidic ribosomal protein P1	TMT	TMT	TMT
60S acidic ribosomal protein P2	TMT	TMT	
60S ribosomal protein L3	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L4	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L5	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L6	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L7	TMT	2-DE	TMT
60S ribosomal protein L7a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L8	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L9	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L10	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L10a	TMT	TMT and 2-DE	TMT
60S ribosomal protein L11	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L12	TMT and 2-DE	2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L13	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L13a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L14	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L15	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L17	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L18	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L18a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L19	TMT	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L21	2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L22	TMT	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L23	TMT	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L23a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L24	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L26	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L27	TMT	TMT and 2-DE	TMT
60S ribosomal protein L27a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L28	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L29	2-DE	2-DE	
60S ribosomal protein L30	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L31	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L32	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	
60S ribosomal protein L34	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L35	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L35a	TMT	TMT and 2-DE	2-DE
60S ribosomal protein L36	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L36a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	
60S ribosomal protein L37			
60S ribosomal protein L37a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
60S ribosomal protein L38	2-DE	TMT	2-DE
60S ribosomal protein L39			
60S ribosomal protein L40		2-DE	
60S ribosomal protein L41			
40S ribosomal protein SA	TMT	TMT	TMT
40S ribosomal protein S2	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S3	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
40S ribosomal protein S3a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S4	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
(homologous to human S4 X isoform)			
40S ribosomal protein S5	2-DE	2-DE	
40S ribosomal protein S6	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
40S ribosomal protein S7	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S8	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
40S ribosomal protein S9	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S10	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S11	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
40S ribosomal protein S12	TMT	TMT and 2-DE	TMT

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Protein name	Species		
	Human	Rat	Chicken
40S ribosomal protein S13	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
40S ribosomal protein S14	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S15	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT
40S ribosomal protein S15a	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S16	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S17	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE
40S ribosomal protein S18	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	
40S ribosomal protein S19	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	
40S ribosomal protein S20	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S21	TMT	TMT	
40S ribosomal protein S23	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S24	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S25	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S26	2-DE	2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S27	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S27a	TMT	TMT and 2-DE	TMT
40S ribosomal protein S28	TMT and 2-DE	TMT and 2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S29	2-DE	2-DE	2-DE
40S ribosomal protein S30		TMT and 2-DE	2-DE

namely RPL7, RPL10a, RPL19, RPL22, RPL23, RPL27, RPL35a, RPS21 and RPS27a from human, RPL38 and RPS21 from rat, and RPL7, RPL27, RPS15 and RPS27a from chicken. However the TMT spectrometry did not allow the identification of all RP. Indeed some RP were identified only by 2-DE and mass spectrometry namely RPL21, RPL29, RPL38, RPS5, RPS26 and RPS29 from human, RPL7, RPL12, RPL29, RPS5, RPS26, and RPS29 from rat and thirty-five RP from chicken listed in Tables 3 and 5.

By combining the results obtained by 2-DE and mass spectrometry and those obtained by TMT spectrometry, 74 human (Tables 1 and 5), 76 rat (Tables 2 and 5) and 67 chicken (Tables 3 and 5) RP were identified. Only a few RP of very small molecular masses were not identified neither in human cells nor in chicken cells namely RPL37, RPL39, RPL40, RPL41 and RPS30, and in rat cells namely RPL39, RPL41 and RPL37, while they are present in the databases.

Since tandem mass tags can also be used for the determination of relative abundances of peptides obtained after trypsin digestion, we attempted to compare the amount of the different RP within the three species. However, careful analysis of two replicates from the same sample with the same tag label showed a variation of about 30% for those peptides that were appearing in both analyses. Some peptides were indeed appearing only once (not shown). From these observations and because the expected variations, if any, should be small, we could not conclude about the relative proportions of each RP within the three ribosome species.

4. Discussion

The aim of this study was to design 2-DE maps in which RP human, rat and chicken cells are unambiguously identified by mass spectrometry. Because the nomenclature for ribosomal proteins was initially defined for rat liver [7] and further extended to all mammals [8], we first analyzed once again by

2-DE, total proteins extracted from rat liver 80S ribosomes (TP80S) and identified them by mass spectrometry. The same protocol was applied for TP80S of two other species, human beings and chicken, starting from HeLa cells and primary erythrocytic progenitor cells (T2EC) respectively. This strategy allowed the identification of 69 rat basic ($pI > 8.6$) RP among the 79 TP80S RP listed in Swiss-Prot/trEMBL databases. Ten of them (RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPSA, RPS12, RPL37, RPL38, RPL39, RPL41 and RPS21) were missing in the 2-DE gels, mainly those with a $pI < 8.6$ (RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPSA and RPS12) and those with a small molecular mass (RPL38, RPL39, RPL41 and RPS21) that were probably lost during the dialysis step (see Materials and methods). For unknown reason, RPL37 was not visualized in the 2-DE system neither in rat liver ribosomes nor in HeLa cells, nor in chicken T2EC ribosomes. Finally two spots contained the same RPS15a exhibiting an identical molecular mass but a small difference in charge (see Fig. 1B). Phosphorylation of RPS15a has never been described but the presence of two spots for RPS15a could be due to another post-translational modification such as an acetylation on lysine residues [23].

Among the 79 human RP listed in Swiss-Prot/trEMBL databases, only 60 of them were thus identified. As for rat RP, those with a $pI < 8.6$ (RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPSA and RPS12) and those with a too low molecular mass (RPL39, RPL40, RPL41, RPS21 and RPS27a) were not visualized in the 2-DE system. However, we have no clear explanation for the absence of the remaining RP namely RPL7, RPL10a, RPL19, RPL22, RPL23, RPL27, RPL35a and RPL37. Because these RP have been visualized in several other 2-DE systems [16], it could be postulated that some of them could co-migrate with other RP in the electrophoresis system used in this study, their released peptides being not identified by mass spectrometry.

Most chicken RP were not characterized in databases and they were often listed by sequence homology with RP of other species. By the strategy used here, 58 RP were identified, while only 34 RP including acidic ones are listed in the Swiss-Prot/

trEMBL databases. However acidic RP (RPLP0, RPLP1, RPSA and RPS12) and a few basic ones (RPL1 (10a), RPL7, RPL27, and RPL35) were not visualized by 2-DE while listed in the Swiss-Prot/trEMBL databases. In addition, as for rat RP, two spots contained the same RPS15a (Fig. 1C).

In addition to these identifications, proteins extracted from purified ribosomes were directly identified and quantified using the isobaric tagging technology. The reporter group contained in the tag should allow the relative quantification of human, rat and chicken RP. TMT spectrometry allowed identification of RP already observed by 2-DE/mass spectrometry but not all of them (see Tables 1–3), and also RP not observed by 2-DE including all RP exhibiting a $pI < 8.6$. Other non-ribosomal proteins were also identified. Among them, proteins that are associated to ribosomes as part of the translational machinery, such as different eukaryotic translation initiation and elongation factors (eIF and eEF), and not surprisingly different chaperones (see Table 4) were identified. The remaining ones could be contaminating proteins such as keratin, but also nascent polypeptide chains in the process of being synthesized. This is not surprising because ribosomes were purified as polyribosomes in low monovalent cation concentration (25 mM KCl) and in absence of treatment by puromycin.

In summary, LC-MS/MS alone allowed to identify 68 human, 69 rat and 32 chicken RP. By combining 2-DE/mass spectrometry to LC-MS/MS, 74 human, 76 rat and 67 chicken RP were identified without ambiguity.

Lastly, the quantitative analysis used in this study did not allow us to quantify the relative proportions of each RP within human or rat or chicken ribosomes nor did it allow us a comparative study between the three different species, thereby stressing the need for the development of highly accurate quantitative proteomic techniques, or the use of another strategy based upon 2-DE analysis. 2D-DIGE (2D-differential gel electrophoresis) is a very appealing alternative strategy, and the completion of the present study by 2-DE will allow a direct comparison of the relative abundance of RP in different chicken cells.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comité Départemental du Rhône), the Université Claude Bernard (UCBL), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Région Rhône Alpes and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

REFERENCES

- Palade GE. A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol Jan.* 1955;1(1):59–68.
- Wilson DN, Nierhaus KH. Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol Sep-Oct 2005;40(5):243–67.*
- Kramer G, Boehringer D, Ban N, Bukau B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol Jun.* 2009;16(6):589–97.
- Wool IG, Chan YL, Glück A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol Nov-Dec 1995;73(11–12):933–47.*
- Puglisi JD. Resolving the elegant architecture of the ribosome. *Mol Cell Dec 11 2009;36(5):720–3.*
- Kaltschmidt E, Wittmann. Ribosomal proteins: VI. Preparative polyacrylamide gel electrophoresis as applied to the isolation of ribosomal proteins. *Anal Biochem Jul.* 1969;30(1):132–41.
- Sherton CC, Wool IG. Determination of the number of proteins in liver ribosomes and ribosomal subunits by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem Jul.* 25 1972;247(14):4460–7.
- McConkey EH, Bielka H, Gordon J, Lastick SM, Lin A, Ogata K, Reboud JP, Traugh JA, Traut RR, Warner JR, Welfle H, Wool IG. Proposed uniform nomenclature for mammalian ribosomal proteins. *Mol Gen Genet Jan.* 1979;169(1):1–6.
- Meyuhas O, Perry RP. Construction and identification of cDNA clones for mouse ribosomal proteins: application for the study of r-protein gene expression. *Gene Jul.* 1980;10(2):113–29.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Aug 15 1970;227(5259):680–5.*
- Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem Apr 15 2003;75(8):1895–904.*
- Nivon M, Richet E, Codogno P, Arrigo AP, Kretz-Remy C. Autophagy activation by NfκB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy Aug.* 2009;5(6):766–83.
- Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, Samarut J. TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism. *EMBO J May 17 1999;18(10):2764–81.*
- Gandrillon O, Jurdic P, Benchaïbi M, Xiao JH, Ghysdael J, Samarut J. Expression of the v-erbA oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulates their proliferation in vitro and enhances tumor growth in vivo. *Cell Jun 5 1987;49(5):687–97.*
- Ramsey JC, Steele WJ. A method for visualizing and quantifying the total complement of free and membrane-bound ribosomes in rat liver. *Anal Biochem Jan 15 1979;92(2):305–13.*
- Madjar JJ, Arpin M, Buisson M, Reboud JP. Spot position of rat liver ribosomal proteins by four different two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel. *Mol Gen Genet Mar 20 1979;171(2):121–34.*
- Waller JP, Harris JI. Studies on the composition of the protein from *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA Jan 15 1961;47:18–23.*
- Madjar JJ. Cell biology: a laboratory handbook. Preparation of ribosomes and ribosomal proteins from cultured cells. Academic Press, Inc; 1994. p. 657–61.
- Rabilloud T. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol 1999;112:297–305.*
- Scherl A, Tsai YS, Shaffer SA, Goodlett DR. Increasing information from shotgun proteomic data by accounting for misassigned precursor ion masses. *Proteomics Jul.* 2008;8(14):2791–7.
- Dayon L, Pasquarello C, Hoogland C, Sanchez JC, Scherl A. Combining low- and high-energy tandem mass spectra for optimized peptide quantification with isobaric tags. *J Proteomics Feb.* 10 2010;73(4):769–77.
- Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods Mar.* 2007;4(3):207–14.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science Aug.* 14 2009;325(5942):834–40.

PARTIE III

Analyse de la composition des ribosomes en r-protéines et étude de la protéine RPL11

Parallèlement à l'approche gène à gène, une étude plus globale basée sur la technique 2D-DIGE (Two-Dimensionnal Difference in Gel Electrophoresis) a été réalisée afin d'analyser la composition des ribosomes en r-protéines. Préalablement à cette analyse, nous avons établi une cartographie des r-protéines composant les ribosomes des T2EC par électrophorèse bidimensionnelle associée à de la spectrométrie de masse.

A/ Détermination de la quantité de ribosomes sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*

Dans la majorité des processus de transformation cellulaire, on observe une augmentation de la biogenèse des ribosomes permettant ainsi aux cellules de proliférer plus vite. En SAGE, nous avons observé une répression des ARNm de certaines r-protéines, ce qui pouvait nous faire penser que *v-erbA* modulait la quantité de ribosomes. Néanmoins, une diminution des ribosomes dans un cas de transformation restait surprenant car dans la majorité des cas, une transformation cellulaire est associée à une augmentation de la biogenèse des ribosomes.

Pour vérifier si l'oncogène *v-erbA* pouvait modifier la biogenèse des ribosomes, nous avons dosé la quantité des ribosomes provenant de T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G* par mesure de l'absorbance à 260 nm. Les analyses statistiques, avec le test T de Student bilatéral apparié, réalisées sur 18 expériences indépendantes indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions (*p* value : 0,6429) (Figure 25). Ce résultat montre que l'oncogène *v-erbA* n'altère pas la quantité des ribosomes. Nous nous sommes donc demandé si cet oncogène pouvait modifier qualitativement les ribosomes, *i.e*, la composition des ribosomes en r-protéines ? Pour répondre à cette question, nous avons entrepris d'analyser par une approche

globale, la 2D-DIGE, la composition des ribosomes en r-protéines sous l'effet de *v-erbA*.

B/ La 2D-DIGE

B.1/ Technique de la 2D-DIGE

Dans l'objectif d'analyser la composition des ribosomes en r-protéines sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*, nous avons choisi d'utiliser la technique 2D-DIGE. Cette technique présente de nombreux avantages : la faible quantité de protéines à utiliser (75 µg), la sensibilité du système (détection des variations de 1,1 fois), l'existence d'un standard interne correspondant à un mélange équivalent des deux échantillons, la migration simultanée dans un même gel des deux échantillons à analyser ainsi que du standard interne.

Il nous a donc fallu dans un premier temps mettre aux points cette technique afin de l'adapter à l'analyse des protéines basiques, *i.e.*, la majorité des r-protéines. Le protocole détaillé de cette approche est décrit dans la partie Matériels et Méthodes, à la fin de cette partie des résultats.

Brièvement, les r-protéines associées aux ribosomes sont extraites des T2EC exprimant soit *v-erbA*, soit *S61G* et sont marquées avec les fluorochromes CyDye 3 et 5 respectivement ([Figure 26](#)). Le standard interne correspond à un mélange d'une même quantité de r-protéines provenant des deux types de T2EC infectées, marquées avec le fluorochrome CyDye 2. Pour chaque échantillon biologique indépendant, un marquage inversé a été réalisé permettant ainsi d'éliminer le biais induit par les caractéristiques propres aux fluorochromes. Les r-protéines marquées sont ensuite rassemblées et sont analysées simultanément dans le même gel en électrophorèse bidimensionnelle, éliminant ainsi les problèmes liés à la migration, et permettant de

quantifier de manière précise et concomitante les signaux fluorescents obtenus pour les 2 échantillons. Les r-protéines marquées de chaque échantillon sont alors révélées grâce aux différents lasers du Typhoon™ Trio Variable-mode imager (Amersham, GE Healthcare).

B.2/ Analyse de la composition des ribosomes sous l'effet de *v-erbA*

Quatre expériences indépendantes avec des marquages inversés ont été réalisées. Les gels ont été analysés avec le logiciel Progenesis et les valeurs de quantification du taux de chaque r-protéine ont été testées statistiquement avec le test T de Student non apparié. Les résultats obtenus ([Figures 27 et 28](#)) montrent des variations du taux de trois r-protéines, avec une p value $< 0,1$, sous l'effet de l'oncogène *v-erbA* par rapport au mutant *S61G*. Grâce aux études menées sur l'identification des r-protéines chez *Gallus gallus*, ces trois r-protéines ont été reconnues comme étant RPL11, RPS3 et RPS2.

Le taux de la protéine RPL11 associée aux ribosomes est plus faible dans les T2EC exprimant *v-erbA* en comparaison aux T2EC exprimant la forme mutée non transformante de *v-erbA*. La répression est de 1,2 fois sous l'effet de *v-erbA* avec une p value de 0,0412. Le taux de la protéine RPS3 varie dans le même sens que celui de la protéine RPL11, avec une répression de 1,3 fois et une p value de 0,0803. Quant à la protéine RPS2, son taux augmente de 1,2 fois sous l'effet de *v-erbA*, avec une p value de 0,0838. Ces variations sont effectivement faibles, car nous sommes probablement confrontés à analyser la composition d'une population hétérogène de ribosomes. Cependant, ces analyses statistiques ont été réalisées sur 4 expériences indépendantes, soit 8 marquages et attestent de l'existence de ribosomes de composition différente au sein des cellules exprimant *v-erbA*. Autrement dit, il existerait des ribosomes dépourvus ou non de certaines protéines comme RPL11, RPS3 ou RPS2, sous l'influence de *v-erbA* dans les progéniteurs érythrocytaires aviaires.

Pour la suite de notre étude, nous avons cherché à conforter la présence de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11, sous l'effet de *v-erbA*, avec une autre technique, la *p* value obtenue pour cette protéine à partir des résultats de 2D-DIGE étant la plus significative (0,0412).

C/ Démonstration de l'existence de ribosomes dépourvus de RPL11

C.1/ L'immunoprécipitation des ribosomes

Au vu des données obtenues en 2D-DIGE, nous avons décidé de poursuivre la démonstration de la présence de ribosomes contenant la protéine RPL11 et de ribosomes au contraire dépourvus de cette protéine dans les T2EC exprimant *v-erbA*, par des approches d'immunoprécipitation et de western blot.

L'immunoprécipitation est une technique très utilisée pour identifier des partenaires protéiques faisant partie d'un même complexe. Dans notre étude, ce complexe est très « gros » puisqu'il s'agit de la sous-unité 60S (2,8 x 10⁶ Daltons) ainsi que du ribosome 80S (3,3 X 10⁶ Daltons). Brièvement, les ribosomes sont extraits des T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G* selon le protocole publié dans Nguyen-Lefebvre *et al* (Nguyen-Lefebvre et al., 2011) ([Figure 23](#)), excepté que les différents tampons utilisés sont sans DTE. Ces sous-unités ribosomiques et ribosomes sont ensuite incubés, dans un premier temps, en présence d'anticorps dirigés contre la protéine RPL11 et dans un second temps, avec la protéine G couplée à des billes magnétiques. Ces complexes ribonucléoprotéiques subissent ensuite un tri magnétique permettant ainsi de séparer les sous-unités ribosomiques et ribosomes constitués de la protéine RPL11, accrochés aux billes magnétiques, des sous-unités

ribosomiques et ribosomes dépourvus de la protéine RPL11, restant libres dans le surnageant ([Figure 29](#)).

Ces complexes ribonucléoprotéiques étant très gros, il nous a fallu mettre au point les conditions d'incubation et optimiser la composition des tampons à utiliser pour garder intact les particules 60S et 80S tout au long de l'expérience d'immunoprécipitation. De plus, nous avons dû tester différents anticorps afin de reconnaître efficacement la protéine RPL11 permettant ensuite d'isoler les complexes ribosomiques.

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé un protocole classique pour immunoprécipiter ces complexes : après l'étape d'ultracentrifugation, les sous-unités ribosomiques et les ribosomes sont repris dans un tampon RIPA (50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 1% de Triton 100X, 0,25% de Na-deoxycholate, 0,1% de SDS, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 1 mM de PMSF, 1 mM de Na₃VO₄ et 1 mM de NaF), communément utilisé dans les expériences d'immunoprécipitation. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent. Les protéines contenues dans la fraction associée aux billes et dans le surnageant sont analysées par western blot ([Figure 30. A](#)). Les résultats montrent qu'il y a autant de protéine RPL11 dans la fraction associée aux billes et dans le surnageant. Ce tampon ne paraît donc pas compatible avec le maintien de la conformation des sous-unités ribosomiques tout au long de l'expérience d'immunoprécipitation. La raison semble être liée à la présence d'EDTA qui participerait à la dissociation des différents constituants des sous-unités ribosomiques.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons alors décidé de tester l'immunoprécipitation avec le même tampon (50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 5 mM de MgCl₂, 25 mM de KCl et 2 mM de DTE) que celui que nous avons utilisé pour reprendre les ribosomes dans l'étude de l'identification des r-protéines chez le poulet (Nguyen-Lefebvre et al., 2011). Les résultats ([Figure 30. B](#)) indiquent que quasiment la totalité des protéines RPL11 se retrouvent dans le surnageant et que la protéine RPL11 associée aux complexes n'a pas été immunoprécipitée. L'interprétation la plus probable est que la présence du DTE dans le tampon a détruit les ponts disulfures

nécessaires au bon fonctionnement des anticorps. En conséquence, les anticorps dirigés contre la protéine RPL11 n'étaient plus fonctionnels dans un tel tampon.

Nous avons donc refait les manipulations avec le même tampon, mais cette fois-ci sans le DTE. Les résultats étaient encourageants, car nous avons réussi à voir la présence de ribosomes contenant la protéine RPL11 dans la fraction associée aux billes. Il semblerait donc que ce tampon est bien compatible avec l'expérience d'immunoprécipitation, il nous restait maintenant à identifier l'anticorps dirigé contre la protéine RPL11 le plus efficace pour cette manipulation. Nous avons à notre disposition deux anticorps fournis par Sigma-Aldrich et Santa Cruz Biotechnology. Les résultats des analyses de la fraction associée aux billes et du surnageant ([Figure 30. C](#)) indiquent que ces anticorps n'étaient pas optimaux pour les expériences d'immunoprécipitation.

Après différents essais, nous avons trouvé un autre anticorps polyclonal dirigé contre la totalité de la protéine RPL11, commercialisé par Santa Cruz, qui semblait très efficace pour l'immunoprécipitation. Nous avons ensuite concentré nos efforts sur la détermination des proportions de r-protéines, d'anticorps anti-RPL11 et de protéines G couplées à des billes magnétiques, afin de séparer de manière la plus stringente les sous-unités et ribosomes contenant ou dépourvus de la protéine RPL11. La meilleure efficacité a été obtenue avec 5 µg de r-protéine, 2 µg d'anticorps anti-RPL11 (Santa Cruz, FL-178) et 50 µg de protéines G couplées avec des billes magnétiques ([Figure 30. D](#)).

Ces résultats montrent clairement qu'il est possible d'immunoprécipiter des ribosomes malgré le poids moléculaire important de ce complexe ribonucléoprotéique.

C.2/ Séparation des ribosomes contenant RPL11 des ribosomes dépourvus de RPL11 dans les T2EC exprimant *v-erbA*

Les fractions contenant d'une part les ribosomes associés aux billes magnétiques (ribosomes contenant la protéine RPL11) et d'autre part, les surnageants (ribosomes dépourvus de la protéine RPL11) provenant de deux expériences indépendantes ont été analysées par western blot. Nous avons utilisé pour cela un anticorps dirigé contre la protéine RPL11 pour vérifier que les étapes d'immunoprécipitation et de tri magnétique s'étaient bien déroulées. Deux hypothèses étaient alors possibles : 1/ il n'y a pas de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 sous l'influence de *v-erbA* ; 2 / il y a des ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*. L'existence de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 sera mise en évidence grâce à l'utilisation d'un autre anticorps dirigé contre une autre protéine de la grande sous-unité ribosomique, la protéine RPL27. En effet, s'il existe des ribosomes sans la protéine RPL11 sous l'influence de *v-erbA*, alors la protéine RPL27 sera détectable dans la fraction du surnageant à la différence de la protéine RPL11, présente uniquement dans la fraction associée aux billes ([Figure 31](#)). L'existence de ribosomes sans la protéine RPL11 dans les T2EC exprimant *v-erbA* sera mis en évidence si le ratio (RPL11/RPL27) est plus faible dans ces dernières comparé à celui des T2EC exprimant *S61G*.

La [figure 32](#) montre clairement qu'il existe des particules 60S et 80S dépourvues de la protéine RPL11 sous l'effet de *v-erbA*, puisque seule la bande correspondant à la protéine RPL27 a été observée dans la fraction du surnageant de T2EC exprimant *v-erbA*. Les signaux des protéines RPL11 et RPL27 sur les autoradiographies ont été quantifiés par le logiciel Image J. Les ratios du taux des protéines RPL11 et RPL27 dans les fractions des surnageants, ont été calculés et analysés statistiquement avec le test T de Student unilatéral apparié. Cette analyse statistique réalisée sur deux expériences indépendantes affirme un ratio (RPL11/RPL27) plus bas dans les T2EC exprimant *v-erbA* en comparaison à celles exprimant *S61G* (p value : 0,0125).

Les résultats obtenus ici, en plus des données de 2D-DIGE, démontrent clairement l'existence de ribosomes de composition variable en r-protéines, et en particulier l'existence de ribosomes avec ou sans la protéine RPL11, dans les T2EC exprimant l'oncogène *v-erbA*.

L'ensemble de ce travail fait l'objet d'une publication actuellement en cours de rédaction.

D/ Analyse de la fonction biologique de la protéine RPL11

Parallèlement aux études sur la composition des ribosomes, notre intérêt s'est porté sur la potentielle implication d'une fonction extra-ribosomique de RPL11 dans le processus de transformation cellulaire induit par l'oncogène *v-erbA*. En effet, une petite augmentation du taux de la protéine RPL11 dans la fraction des protéines totales ayant été observée dans les T2EC exprimant *v-erbA*, nous avons décidé de sous ou sur-exprimer cette protéine dans ces cellules afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de *v-erbA* dans le maintien de l'auto-renouvellement et dans le blocage du programme de différenciation induit par *v-erbA*.

Dans le but d'étudier la fonction biologique de la protéine RPL11 dans notre modèle cellulaire, nous avons construit des vecteurs permettant soit une inhibition de l'expression de *RPL11*, soit une sur-expression de *RPL11*.

D.1/ Analyse du taux de la protéine RPL11 dans les T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G*

Nous avons dans un premier temps déterminé le taux de la protéine RPL11 par western blot dans les T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G* provenant de 7 expériences indépendantes. Les bandes correspondant à la protéine RPL11 ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J. Comme pour l'analyse du taux des protéines RPS3 et RPS3a, nous avons choisi la protéine GAPDH en tant que témoin de charge pour nos dépôts ([Figure 33](#)).

Les ratios du taux de la protéine RPL11, provenant de T2EC exprimant *v-erbA* par rapport à *S61G* ont été calculés et analysés statistiquement avec le test T de Student unilatéral apparié. Les résultats obtenus montrent que le taux de la protéine RPL11 dans la fraction des protéines totales est plus élevé dans les T2EC exprimant *v-erbA* en comparaison à des T2EC exprimant *S61G* ([Figure 33](#)), avec une *p* value de 0,02. La moyenne des variations calculée à partir des 7 expériences indépendantes montre une augmentation faible, mais si nous regardons les expériences une à une, dans 5 expériences sur 7 et surtout dans 4 expériences sur 7, nous observons une augmentation significative.

Ce résultat associé à ceux obtenus précédemment en 2D-DIGE et par l'approche d'immunoprécipitation, suggèrent qu'il pourrait exister une fonction extra-ribosomique de la protéine RPL11 dans les T2EC exprimant *v-erbA*, puisqu'il y a moins de RPL11 dans la fraction associée aux ribosomes et plus dans la fraction des protéines totales. Il pourrait donc exister un pool libre, non associé aux ribosomes, de cette protéine dans la cellule, qui pourrait agir sur d'autres processus cellulaires indépendants de la traduction.

D.2/ Etude de la fonction biologique de la protéine RPL11 par inhibition transitoire de son expression

Dans l'objectif d'étudier la fonction biologique de RPL11, nous avons construit des vecteurs contenant des séquences de shRNA (short hairpin RNA) dirigées soit contre le transcrite mature de RPL11, soit contre celui du gène codant la luciférase, utilisé comme contrôle.

Ces séquences ont été insérées dans le plasmide p-Silencer 1.0-U6 (Bresson-Mazet et al., 2008), et les T2EC ont été nucléofectées simultanément avec les vecteurs portant les shRNA et le vecteur pMACS.4.1, qui porte le gène *hACD4* humain (Figure 34. A et B). L'expression de *hACD4* permet de séparer les T2EC nucléofectées des autres cellules par tri magnétique avec le système de sélection MACSelect-Transfected Cell (Miltenyi) (Mejia-Pous et al., 2009).

Afin de vérifier l'efficacité des vecteurs portant les shRNA dirigés contre *RPL11*, nous avons extrait les ARN totaux provenant des cellules transfectées trois jours après la nucléofection, et nous avons fait une RT-PCR quantitative, en utilisant le gène *ATP synthase sous-unité β* en tant que gène normalisateur. Le taux de transcrits *RPL11* normalisé a été quantifié dans deux expériences indépendantes (Figure 35). Le taux d'ARNm de *RPL11* dans les T2EC nucléofectées avec les shRNA dirigé contre *RPL11* diminue sous l'effet des trois shRNA (Répression par les shRNA1, shRNA2 et shRNA4 de 48%, 52% et 20% respectivement) par rapport à celui provenant des T2EC nucléofectées avec le shRNA contrôle. Ces données indiquent que nos vecteurs contenant les shRNA fonctionnent bien dans les T2EC, en tout cas au niveau du taux de transcrits de *RPL11*.

Les premiers expériences réalisées pour déterminer la prolifération des T2EC transfectées avec les vecteurs portant le shRNA contrôle ou les shRNA dirigés contre *RPL11* ne montrent pas de différences significatives entre les 2 conditions (résultat non montré). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le taux de la protéine RPL11 ne diminuait pas sous l'influence des shRNA, même 72 h après la transfection (résultat non montré). De plus, les études préliminaires menées pour déterminer la

demi-vie de la protéine RPL11 dans les T2EC indique que la demi-vie de cette protéine était très longue (supérieure à 72 h), la majorité des protéines RPL11 était très stable, car elles sont associées aux ribosomes.

Ainsi, même si les shRNA permettent de diminuer le taux des protéines RPL11 libres, cette diminution est sans doute trop faible pour être détectable par western Blot et ne semble pas avoir d'effet sur la prolifération des T2EC.

D.3/ Etude de la fonction biologique de la protéine RPL11 par sur-expression transitoire de son expression

Dans cette partie, mon travail a consisté à la conception du vecteur permettant la sur-expression de *RPL11* dans les T2EC. Les résultats préliminaires présentés ici ont été obtenus par Laetitia Gérossier, avec mon aide ponctuelle. Laetitia est actuellement en Master 2 Recherche, sous la direction de Sandrine Giraud-Gonin.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons fait sur-exprimer la protéine RPL11 dans les T2EC. Deux vecteurs ont été construits : le vecteur permettant la sur-expression de *RPL11*, pCMVie-RPL11-pCMVie- Δ hCD4[ToI2], et le vecteur de contrôle, pCMVie- Δ hCD4[ToI2] ([Figure 34. C et D](#)). Les T2EC ont été transfectées soit avec le vecteur contrôle, soit avec le vecteur permettant la sur-expression de *RPL11*, et comme pour l'expérience d'inhibition de l'expression de *RPL11*, l'expression de *ΔhCD4* a permis de séparer les T2EC transfectées des autres cellules par tri magnétique avec le système de sélection MACSelect-Transfected Cell (Miltenyi).

Afin de vérifier l'efficacité du vecteur permettant la sur-expression de *RPL11*, nous avons extrait des ARN totaux provenant des cellules transfectées soit 48 h, soit 72 h post-nucléofection (2 expériences indépendantes). Une RT-PCR quantitative a été réalisée pour déterminer le taux d'ARNm de *RPL11*, et le gène *ATP synthase sous-unité beta* a été utilisé comme gène standard.

Le taux d'ARNm de *RPL11* dans les T2EC transfectées avec le vecteur pCMVie-RPL11-pCMVie- Δ hCD4[Tol2] en comparaison à celles transfectées avec le vecteur de contrôle augmente à la fois dans les conditions 48 h (1,579 fois) et 72 h (1,7648 fois) post-nucléofection ([Figure 36.A](#)). Ces résultats montrent que le vecteur pCMVie-RPL11-pCMVie- Δ hCD4[Tol2] est bien fonctionnel dans les T2EC.

Nous avons ensuite analysé le taux protéique de RPL11 dans les T2EC nucléofectées par western blot. Le résultat présenté, représentatif de deux expériences, ([Figure 36.B](#)) montre une légère augmentation du taux de RPL11 dans les cellules sur-exprimant *RPL11* par rapport aux T2EC contrôle. Cette sur-expression apparaît faible, mais elle s'accompagne d'un effet biologique bien significatif observé pour 3 expériences indépendantes. En effet, les T2EC sur-exprimant *RPL11* prolifèrent plus lentement que les T2EC transfectées avec le vecteur contrôle, même au bout de 5 jours post-nucléofection ([Figure 36.C](#)).

Cette faible augmentation du taux de RPL11 pourrait être la résultante d'un mécanisme de régulation mis en place par la cellule afin d'empêcher une sur-expression trop importante qui pourrait induire une apoptose des cellules.

De plus, cette sur-expression n'induit pas un taux de mortalité plus importante des cellules (résultat non montré). Le ralentissement de la prolifération ne semble donc pas être corrélé avec augmentation de la mort cellulaire, mais pourrait être lié à un ralentissement du cycle cellulaire. Cette hypothèse est en cours d'investigation dans l'équipe.

Enfin, Laetitia n'a pas observé d'effet de la sur-expression de *RPL11* sur la différenciation des T2EC.

Les résultats obtenus grâce à l'étude de la fonction biologique de la protéine RPL11 et les variations du taux de RPL11 sous l'effet de *v-erbA* semblent être en discordance, puisqu'une augmentation du taux de RPL11 dans les T2EC altère la prolifération. Ainsi, ce n'est pas l'augmentation seule de l'expression de *RPL11* induite par *v-erbA* dans les T2EC qui peut expliquer le processus transformant. Ce point sera également discuté dans la partie « Discussion ».

Pour conclure, l'ensemble des résultats obtenus semblent indiquer que l'oncogène *v-erbA* serait capable, d'une part de moduler la composition des ribosomes en r-protéines, et d'autre part affecter la fonction extra-ribosomique de la protéine RPL11. Ces deux mécanismes pourraient alors participer dans l'induction ou dans le maintien du processus de transformation induit par *v-erbA*.

PARTIE IV

Ribosomes non conventionnels : traduction d'ARNm spécifiques

Parallèlement à l'étude de la composition variable des ribosomes en r-protéines sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*, une comparaison du protéome entre la condition transformée et non transformée a été réalisée par Gaël Leprun, un ancien étudiant de Master 2 Recherche, encadré par Sandrine Giraud-Gonin. Cette étude a permis d'identifier 6 protéines du cytosol et 3 protéines du noyau dont le taux varie entre les T2EC exprimant *v-erbA* et les T2EC exprimant *S61G* ([Tableau 6](#)). Compte tenu d'une part, des résultats obtenus par 2D-DIGE et suite aux expériences d'immunoprécipitation des ribosomes, et d'autre part des données bibliographiques, une hypothèse sur le rôle potentiel des ribosomes avec une composition variable en r-protéines dans la transformation induite par *v-erbA* a été émise dans notre équipe : ces ribosomes particuliers, non conventionnels, pourraient favoriser la traduction de transcrits spécifiques, pouvant jouer un rôle dans le maintien de l'auto-renouvellement, et/ou dans le blocage du processus de différenciation induits par *v-erbA*.

Des expériences de RT-PCR quantitative menées sur les gènes dont les protéines ont été identifiées par l'approche protéomique ont été ensuite menées. Les résultats obtenus montrent que le taux de certains transcrits varie dans le même sens que celui des protéines correspondantes, alors que pour d'autres, le sens de variation est inversé. Notre intérêt se porte particulièrement sur les transcrits dont les variations transcriptomiques et traductionnelles ne vont pas dans le même sens car pour ces ARNm là, une régulation traductionnelle pourrait être mise en place. Mais il est important de noter ici qu'il n'est pas tout à fait correct de faire le lien direct entre les résultats de l'analyse du protéome et de RT-qPCR, car dans le premier cas, l'étude a été réalisée sur les fractions séparées du protéome (nucléaire et cytosolique), et non sur le protéome total. Actuellement, des expériences de RT-qPCR sur différentes fractions de polyribosomes, provenant de T2EC transformées et non transformées, sont en cours de réalisation, permettant ainsi d'obtenir des informations plus précises. Ces données nous permettront en effet de mettre réellement en évidence une régulation traductionnelle si celle-ci existe pour les gènes cibles identifiés par protéomique.

Néanmoins, en attendant les résultats de la PCR quantitative sur les fractions de polyribosomes, nous avons quand même décidé de rechercher des motifs présents dans les régions 5' et 3' UTR des transcrits d'intérêt pouvant présenter une régulation traductionnelle. Pour ce faire, les séquences 5' UTR et 3' UTR (UnTranslated Region) de ces transcrits ont été récupérées à partir des bases de données et ont été analysées afin d'identifier des motifs particuliers, pouvant expliquer une régulation traductionnelle particulière. Dans cette étude, Olivier Gandrillon a utilisé l'algorithme Marguerite (Mitasiunaite et al., 2009) et a identifié une séquence dans la région 5' UTR, et une autre séquence dans la région 3' UTR dans les transcrits pouvant présenter une régulation traductionnelle par rapport aux transcrits sans régulation. Ces deux séquences sont les suivantes : 5' CGCCCGC (TZ : 0,0004) et 3' CCTGTGATG (TZ : 0,074). L'analyse de 4 transcrits d'intérêt a montré la présence à la fois du motif en 5' et en 3' UTR dans 2 cas ; dans un cas on ne trouve que le motif en 5' UTR et dans un autre cas, celui en 3' UTR. Pour rester simple, la valeur associée au TZ correspond à la probabilité que ces séquences en 5' et en 3' UTR ne soient pas présentes par hasard. Nous projetons de compléter ces données par une étude des structures secondaires présentes en 5' et 3' UTR des transcrits d'intérêt grâce au programme MiGaL, développé par un ancien membre du LBBE (Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive) à Lyon.

D'autre part, une analyse des ARNm par RNAseq dans les fractions de polyribosomes, issues de T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G*, a été initiée par Sandrine Giraud-Gonin. Cette étude a pour objectif de déterminer les transcrits qui sont faiblement, ou fortement traduits dans les T2EC exprimant *v-erba* par rapport aux T2EC exprimant *S61G*. De la même manière que pour les transcrits identifiés précédemment, des analyses bioinformatiques menées sur les régions 5' et 3' UTR de ces ARNm seront réalisées afin d'identifier des motifs communs pour des gènes présentant une régulation traductionnelle différente entre la condition normale et transformée. Les résultats de cette étude pourraient permettre de conforter l'hypothèse que des ribosomes de composition non conventionnelle, pourrait favoriser la traduction de messagers possédant des motifs communs particuliers.

Les résultats obtenus dans une étude menée par M. Von Lindern, récemment publiés, appuyerait notre hypothèse (Horos et al., 2012). Afin d'étudier l'anémie de Diamond Blackfan, une diminution de l'expression des gènes *RPS19* et *RPL11* a été induite chez des souris. La réduction du taux des protéines RPS19 et RPL11 conduisaient ainsi à une baisse de la biogenèse des ribosomes, qui s'accompagne d'une répression de la traduction d'un groupe de messagers particuliers, incluant *Bag1* et *Csde1*. Parallèlement au modèle murin, des analyses menées sur des cellules, provenant des patients atteints de la DBA, ont mis en évidence une diminution du taux protéique de ces deux protéines alors que leur taux en ARNm ne varie pas. Les traductions des gènes *Bag1* et *Csde1* sont toutes deux IRES (Internal Ribosome Entry Site)-dépendantes. Ces données montrent qu'en cas d'un défaut quantitatif de la biogenèse des ribosomes, il existe une traduction favorisée de certains messagers par rapport à d'autres. Dans cette étude et plus généralement, dans la DBA, la qualité des ribosomes n'a pas été analysée. Nous pourrions donc imaginer que l'haplo-insuffisance en protéines RPS19 et RPL11 pourrait induire en plus d'un défaut quantitatif, un défaut qualitatif des ribosomes. Nous pourrions ainsi découvrir des ribosomes ayant une composition variable en r-protéines ou des formes particulières d'ARNr, conduisant à la traduction de messagers spécifiques.

Matériels & Méthodes

A/ Culture cellulaire

A. 1/ Culture des T2EC

Les progéniteurs érythrocytaires aviaires (T2EC) sont obtenus à partir de la moelle osseuse de fémur d'embryons de poulet (Souche PA12, INRA) de 19 jours. Ces cellules sont maintenues en état d'auto-renouvellement dans un milieu de culture appelé LM1, composé d' α -MEM 1X (alpha-Modifications of Eagle's Medium, Gibco/Life Technologies Ltd, Paisley, Royaume Uni), de 10% de Sérum de veau foetal (FBS : Fetal Bovine Serum, Biowest, Miami, Florida, Etats Unis), de 10^{-3} M d'Hépès à pH 7, de 10^{-4} M de β -Mercapto-Ethanol, de 5 ng/mL de TGF- α humain (Active Bioscience, Hamburg, Allemagne), de 1 ng/mL de TGF- β 1 humain (PeproTech INC, Rocky Hill, NJ, Etats Unis), de 10^{-6} M de Dexaméthasone, de 100 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine.

Les T2EC sont maintenues à une densité comprise entre 10^5 et 8.10^5 cellules/mL, à 37°C sous atmosphère humide, contenant 5% de CO₂.

A. 2/ Infection rétrovirale des T2EC

4.10^6 T2EC sont transfectées pendant 24 h par des surnageants viraux produits par des CEF (Chicken Embryo Fibroblast) contenant soit un rétrovirus porteur de *v-erbA*, soit un rétrovirus porteur de sa forme mutée *S61G*. Pour la production de virus, les CEF ont été infectées initialement par les vecteurs *XJ12* (porteur de l'oncogène *v-erbA*) (Gandrillon et al., 1987) ou *S61G* (Sharif and Privalsky, 1991) et le vecteur auxiliaire pRAV-1. Les T2EC infectées sont ensuite sélectionnées avec du G418 (Néomycine ou Géniticine) à la concentration de 3 mg/mL pendant 5 jours. La culture est ensuite purifiée sur milieu LSM (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio, Courtaboeuf, France) pour éliminer les débris cellulaires, puis les cellules sont amplifiées en milieu LM1, à 37°C sous atmosphère humide, contenant 5% de CO₂.

A. 3/ Transfection et tri magnétique des T2EC

L'expression transitoire des gènes d'intérêt après la transfection a été obtenue en utilisant la technique de nucléofection (Amaxa Technology, Lonza Cologne, Cologne, Germany) avec quelques modifications : pour l'expérience d'inhibition de *RPL11*, 10^7 cellules ont été nucléotransfectées avec 10 µg d'ADN (7 µg de vecteur pSilencer-shRNA + 3 µg de vecteur pMACS.4.1) ; pour l'expérience de sur-expression de *RPL11*, 10^7 cellules ont été nucléotransfectées avec 10 µg d'ADN. Afin d'augmenter l'efficacité du tri magnétique, les cellules mortes et les débris cellulaires ont été éliminés avant le tri, par LSM (Lymphocyte Separation Medium). Les cellules nucléotransfectées sont ensuite triées magnétiquement grâce à l'expression de *ΔhCD4* en utilisant le système de sélection MACSelect-Tansfected Cell (Miltenyi).

B/ Lyse et fractionnement cellulaires : fractions des protéines totales et ribosomiques associées aux ribosomes

Pour toutes les fractions protéiques, les T2EC sontensemencées à la concentration de $4 \cdot 10^5$ cellules/mL la veille de chaque extraction.

B. 1/ Fraction des protéines totales

Les T2EC exprimant *v-erbA* ou sa forme mutée non transformante *S61G* sont récoltées par centrifugation et sont lavées une fois au PBS 1X froid (Phosphate Buffer Saline). Les concentrations de protéines totales sont déterminées par le kit Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats Unis), basé sur la méthode de Lowry. Les cellules sont ensuite lysées dans du tampon Laemmli 1X (Laemmli, 1970) contenant 62,5 mM de Tris-HCl à pH 6,8, 2% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10% de glycérol, 50 mM de 1,4 dithioerythritol, et 0,001% de bleu de bromophénol en tant que colorant.

Les protéines totales sont dénaturées pendant 5 min à 95°C avant d'être analysées sur gel de polyacrylamide par électrophorèse mono-dimensionnelle.

B. 2/ Fraction des protéines ribosomiques associées aux ribosomes

L'extraction, la réduction et l'alkylation des r-protéines ont été réalisées selon le protocole décrit dans l'article Nguyen-Lefebvre *et al* (Nguyen-Lefebvre et al., 2011).

C/ Two-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis (2D-DIGE)

C. 1/ Marquage des r-protéines avec les fluorochromes

Les r-protéines provenant des T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G* sont marquées avec les fluorochromes 2, 3 et 5 (CyDye DIGE Fluors 2, 3 et 5) qui possèdent un groupement d'ester N-hydroxysuccinimidyl (NHS), capable de se lier de manière covalente au groupement amino-epsilon des lysines présentes dans les r-protéines. Cinquante microgrammes de r-protéines provenant de T2EC exprimant *S61G* ont été marqués avec 400 pmol de fluorochrome CyDye 3, et la même quantité de r-protéines de T2EC exprimant *v-erbA* avec 400 pmol de fluorochrome CyDye 5. Pour le standard interne, un mélange de 25 µg de r-protéines provenant de chacun des deux types de T2EC infectées a été marqué avec 400 pmol de fluorochrome CyDye 2, selon le protocole fourni par le vendeur. Pour chaque échantillon biologique, un marquage inversé a été réalisé systématiquement. Les trois échantillons de r-protéines marquées sont ensuite rassemblés, dialysés pendant 2 h contre l'acide acétique 1 M, d'une part pour arrêter la réaction de marquage, et d'autre part pour éliminer l'excès des fluorochromes. Les r-protéines sont enfin lyophilisées et reprises dans un tampon approprié à l'analyse en électrophorèse bidimensionnelle.

C. 2/ Analyse des r-protéines par électrophorèse bidimensionnelle 2D-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Le protocole utilisé pour cette analyse a été décrit dans l'article Nguyen-Lefebvre *et al* (Nguyen-Lefebvre et al., 2011).

Après la lyophilisation, les r-protéines marquées sont solubilisées dans un tampon contenant 20 mM de Tris-Borique à pH 8,3, 1 mM d'EDTA (EthyleneDiamineTetraAcid) et 8 M d'urée (Sigma-Aldrich).

Les r-protéines sont séparées en première dimension selon leur charge dans un gel de polyacrylamide à pH constant 8,6 en présence de 8 M d'urée. La seconde dimension est réalisée selon le protocole classique du SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (Weber and Osborn, 1969).

C. 3/ Acquisition d'images

Les gels contenant les r-protéines sont scannés avec le Typhoon™ Trio Variable-mode imager (Amersham, GE Healthcare). Les r-protéines marquées avec le fluorochrome CyDye 2, CyDye 3 et CyDye 5 ont été révélées avec des lasers de longueur d'onde 488 nm, 532 nm et 633 nm, et avec des filtres d'émission de 520 nm, 580 nm et 670 nm, respectivement. La résolution utilisée pour ces scans est de 100 µm. Le traitement des images et la quantification des r-protéines dans chaque échantillon ont été réalisés avec le logiciel Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics, Durham, Etats Unis). Des analyses statistiques avec le test T de Student bilatéral non apparié ont été réalisées.

D/ Western Blot

Les protéines sont séparées par électrophorèse mono-dimensionnelle en présence de SDS sur des gels de polyacrylamide contenant 12,5% d'acrylamide-N-N'méthylènebisacrylamide (37,5 :1), 0,375 M de Tris-HCL à pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% d'ammonium persulfate (APS) et 0,05% de N,N,N',N'-tetraméthylethylenediamine (TEMED). Le tampon de migration est composé de 25 mM de Tris, 0,182 M de Glycine et 0,1% de SDS, et les protéines sont séparées à voltage constant de 100 V pendant 2 h.

Les protéines sont ensuite électro-transférées en milieu liquide sur membrane en PVDF (PolyVinylidèneFluorure) sous un voltage constant de 100 V pendant 75 min dans un tampon contenant 25 mM de Tris, 0,182 M de Glycine et 20% d'éthanol.

Les membranes sont ensuite saturées dans du TBS-Tween 1X (Tris-Buffered Saline, 0,1% Tween) contenant 5% de BSA (Bovine Serum Albumin) pendant 1 h à température ambiante, et sous agitation. Puis, elles sont incubées en présence d'anticorps primaires dilués dans du TBS-Tween 1X-BSA 5%. Les conditions d'hybridation pour chacun des anticorps sont les suivantes : l'anticorps polyclonal de lapin anti-RPS3 (Cell Signaling Technology, Ribosomal Protein S3 antibody # 2579) est utilisé au 1/1000^{ème} ; l'anticorps polyclonal de souris anti-RPS3a (Abnova, RPS3A polyclonal antibody (A01)) est utilisé au 1/2500^{ème} ; l'anticorps monoclonal de lapin anti-GAPDH (Cell Signaling Technology, GAPDH (14C10) Rabbit mAb # 2118) est utilisé au 1/35000^{ème} ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-RPL11 (FL-178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Etats Unis) est utilisé au 1/1000^{ème} ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-RPL27 (Anti-RPL27 antibody produced in rabbit, Prestige Antibodies®, Sigma-Aldrich) est utilisé au 1/2500^{ème}. Les incubations sont faites à 4°C pendant une nuit ou pendant 4 h à température ambiante (GAPDH), sous agitation.

Les membranes sont ensuite rincées dans du TBS-Tween 1X avant d'être incubées pendant 2 h à température ambiante, et sous agitation avec des anticorps

secondaires. Les conditions d'hybridation pour les anticorps secondaires sont les suivantes : les anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase (Cell Signaling, Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody # 7074) et d'âne anti-IgG de souris marqué à la peroxydase (Cell Signaling, Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody) sont utilisés au 1/10000^{ème}. Les anticorps sont dilués dans du TBS-Tween 1X-BSA 5%.

Les protéines marquées sont révélées par chimioluminescence (ECL Plus Kit, Amersham) suivi d'une autoradiographie.

La déshybridation des membranes est réalisée par incubation dans un tampon contenant 0,200 M de Glycine à pH 2,5, 2 fois pendant 15 min, puis les membranes sont lavées dans du TBS 1X avant une nouvelle étape de saturation et une seconde hybridation avec un nouvel anticorps.

E/ Co-immunoprécipitation : séparation des ribosomes dépourvus ou non de la protéine RPL11

Les expériences de co-immunoprécipitation sont effectuées sur des ribosomes provenant de $5 \cdot 10^6$ T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G*. Ces ribosomes ont été purifiés selon le protocole décrit dans l'article Nguyen-Lefebvre *et al* (Nguyen-Lefebvre et al., 2011), à une différence près : tous les tampons utilisés ne contiennent pas de DTE.

Après l'ultracentrifugation, les ribosomes sont resuspendus dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 25 mM de KCl et 5 mM de MgCl₂. La concentration des ribosomes a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm avec un NanoDrop (Thermo Scinetific, Wilmington, DE, Etats Unis).

Dix microgrammes de ribosomes ont été incubés à 4°C pendant une nuit sur une roue tournante en présence de 2 µg d'anticorps dirigé contre la protéine RPL11 (FL-178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz). Le lendemain, 100 µl de protéines G couplées à des billes magnétiques (PureProteome™ Protein G, Millipore, Billerica,

Massachusetts, Etats Unis) sont ajoutés aux ribosomes pour une incubation de 2 h à 4°C sur roue tournante. La séparation des ribosomes constitués et dépourvus de la protéine RPL11 se fait grâce à un tri magnétique. Les ribosomes retenus par l'aimant magnétique contiennent la protéine RPL11 et ceux restant dans le surnageant sont dépourvus de cette protéine. Les ribosomes associées aux billes magnétiques sont lavés une fois au PBS 1X et resuspendus dans le tampon Laemmli 2X. Le surnageant contenant des ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 est purifié avec le kit 2D-Clean Up (GE Healthcare) et enfin resuspendus dans le même tampon que la fraction associée aux billes. Les ribosomes repris dans le tampon Laemmli 2X sont dénaturés pendant 5 min à 95°C avant d'être analysés par SDS-PAGE et par western blot avec les anticorps dirigés contre les protéines RPL11 et RPL27.

F/ Quantification des signaux de western blot et analyses statistiques

La quantification des signaux de western blot a été réalisée avec le logiciel Image J (Wayne Rasband, au National Institutes of Health). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test T de Student (bilatéral ou unilatéral) avec des données appariées ou non appariées, selon les cas, sur plusieurs expériences indépendantes. Les analyse statistiques ont été réalisées par José Vinúelas, un ancien post-doctorant de notre équipe.

Test T de Student bilatéral:

Hypothèse H_0 : Il n'y a pas de différence entre les T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G*

Si la p value est inférieure à 5%, on accepte H_0 avec 5 % d'erreur

Si la p value est supérieure à 5%, on rejette H_0 .

Test T de Student unilatéral:

Hypothèse H_0 : Le taux de la protéine x observé chez les T2EC exprimant *v-erba* est plus important (ou **moins important**) que celui observé chez les T2EC exprimant *S61G*

Si la p value est inférieure à 5%, on accepte H_0 avec 5 % d'erreur

Si la p value est supérieure à 5%, on rejette H_0 .

G/ Construction des vecteurs permettant l'inhibition et la sur-expression transitoires de *RPL11*

G. 1/ Vecteurs permettant l'inhibition de l'expression de *RPL11*

Les séquences permettant la construction des shRNA (short hairpin RNA) dirigés contre les transcrits de *RPL11* et de la *luciférase* (shRNA de contrôle) ont été conçues à partir des séquences d'ADNc de *RPL11 Gallus gallus* (NM_001030904.1) et de la *luciférase* de la libellule (AY633557) en utilisant le logiciel Whitehead (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>). Les fragments simple brin contenant les séquences cibles et les séquences complémentaires de ces dernières ont été synthétisés séparément par Invitrogen (Carlsbad, CA, Etats Unis) et ont été ensuite hybridés. Les séquences utilisées pour ces constructions sont les suivantes :

shRPL11.1 sens :

5'-GCGGGCCCGTGCGAGAAATCGAATTGATTCAAGAGATCAATTCGTATTCTCGCACTTTTTTGAATTCG-3'

shRPL11.1 antisens :

5'- CGAATTCAAAAAAGTGCGAGAATACGAATTGATCTCTTGAATCAATTCGATTTCTCGCACGGGCCCGC-3'

shRPL11.2 sens :

5'- GCGGGCCCGGTTGAAGGACCGAGAATATTCAAGAGATATTCTCGCACCTTCAACCTTTTTTGAATTCG-3'

shRPL11.2 antisens :

5'- CGAATTCAAAAAAGGTTGAAGGTGCGAGAATATCTCTTGAATATTCTCGGTCCTTCAACCGGCCCGC-3'

shRPL11.4 sens :

5'- GCGGGCCCGCGAGAATAGCAATTGAGATTCAAGAGATCTCAATTCGTATTCTCGCTTTTTTGAATTCG-3'

shRPL11.4 antisens :

5'- CGAATTCAAAAAAGCGAGAATACGAATTGAGATCTCTTGAATCTCAATTGCTATTCTCGCGGGCCCGC-3'

shLuc.2 sens :

5'-GCGGGCCCGCGTTAATCTTAGAGGCGATTCAAGAGATCGCCTCTTTGATTAACGCTTTTTTGAATTCG-3'

shLuc.2 antisens:

5'- CGAATTCAAAAAAGCGTTAATCAAAGAGGCGATCTCTTGAATCGCCTCTAAGATTAACGCGGGCCCGC-3'

Ces fragments hybridés (double brin) sont clonés *via* les sites de restriction ApaI et EcoRI dans le plasmide pSilencer_1.0-U6 (Ambion, Austin, TX, USA) afin de générer les vecteurs pSilencer_ shRNA ([Figure 34. A et B](#)).

Le vecteur pMACS.4.1 a été fourni par Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Allemagne) (Gaines and Wojchowski, 1999).

G. 2/ Vecteurs permettant la sur-expression de *RPL11*

Dans l'objectif de sur-exprimer la protéine RPL11 dans les T2EC, le vecteur pCMVie-RPL11-pCMVie-ΔhCD4[Tol2] (6741 pb) et le vecteur de contrôle pCMVie-ΔhCD4[Tol2] (5693 pb) ont été construits ([Figure 34. C et D](#)).

Le vecteur pCMVie-RPL11-pCMVie-ΔhCD4[Tol2] est composé de deux modules : un promoteur CMVie (immediate early promoter of Cytomegalovirus) suivi soit de la séquence de l'ADNc de *RPL11 Gallus gallus*, soit celle de *ΔhCD4 Homo sapiens* et se terminant par une séquence *polyA* (polyadénosines). Ces deux modules sont encadrés par deux séquences Tol 2 (Urasaki et al., 2006) permettant ainsi une transfection stable si besoin. L'expression de la protéine ΔhCD4 est nécessaire pour séparer les T2EC transfectées des T2EC non transfectées, lors du tri magnétique.

Le vecteur contrôle pCMVie- Δ hCD4[Tol2] a été conçu sur la même base que celui permettant la sur-expression de *RPL11*, sauf qu'il ne contient que le second module.

Les amorces utilisées pour l'amplification des séquences d'ADNc de *RPL11 Gallus gallus* et de *Δ hCD4 Homo sapiens* sont les suivants :

RPL11 Gallus gallus :

5'-TTATTTGCCAGGAAGGATGATGCC-3'

5'-CCCCATCATGGCGCAAGACCA-3'

Δ hCD4 Homo sapiens :

5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAG-3'

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTGCCGGCACCTGACACAGA-3'

H/ RT-PCR quantitative

Les ARN totaux provenant de T2EC transfectées ont été extraits avec le kit RNeasy Mini (QIAGEN, Hilden, Allemagne) selon le protocole vendu par le fournisseur. Un traitement à la DNase avec le kit DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion, Austin, Texas, USA) a été réalisé afin d'éliminer l'ADN génomique résiduel. La concentration des ARN totaux a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm avec un NanoDrop. Un microgramme d'ARN total a été rétro-transcrit en ADNc avec le Super Script III Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) selon les instructions du fabricant.

La PCR quantitative a été réalisée avec l'appareil MX 3000 PRO (Stratagene, Kirkland, WA, USA) en utilisant le kit Quanti Tect SYBR Green PCR (QIAGEN). Nous avons utilisé le gène *ATP synthase subunit beta* en tant que gène standard pour quantifier le taux d'ARNm de *RPL11*. Le rapport du taux d'ARNm de *RPL11* dans la condition d'intérêt par rapport à la condition contrôle est calculé selon la formule suivante (Pfaffl, 2001) :

T2EC transfectées avec le vecteur cible	=	$(E_{rp111})^{(CP\ rp111\ T2EC\ contrôle - CP\ rp111\ T2EC\ à\ tester)}$
T2EC transfectées avec le vecteur de contrôle		$(E_{ATP\ synthase})^{(CP\ ATP\ synthase\ T2EC\ contrôle - CP\ ATP\ synthase\ T2EC\ à\ tester)}$

E: Efficacité de la PCR en temps réel
CP: Crossing Point

Chapitre III

Discussion & Conclusion

A/ Composition variable des ribosomes en protéines ribosomiques

L'oncogène *v-erbA* code une forme altérée du récepteur à l'hormone thyroïdienne TR3, qui n'est plus capable de lier l'hormone T3. *In vitro*, *v-erbA* seul est capable de stimuler la croissance de fibroblastes d'embryon de poulet et d'induire la transformation des progéniteurs érythrocytaires en bloquant leur programme de différenciation (Gandrillon et al., 1994). Il existe un mutant ponctuel, non transformant de l'oncogène *v-erbA*, appelé *S61G*, qui n'induit pas de transformation des progéniteurs érythrocytaires. La comparaison du transcriptome de progéniteurs érythrocytaires exprimant *v-erbA* ou *S61G* indique, entre autre, que l'oncogène *v-erbA* réprime l'expression de certains gènes codant les r-protéines (*RPS3*, *RPS3a*, *RPS9* et *RPL13*) (Bresson et al., 2007), suggérant qu'il pourrait exister des ribosomes avec une composition variable en r-protéines. Ces résultats ont fait émerger l'idée que l'oncogène *v-erbA* pouvait réguler l'appareil traductionnel. Des travaux réalisés précédemment dans notre équipe avaient montré une activation de la voie de signalisation mTOR/p70S6K par l'oncogène *v-erbA*, révélant à nouveau un rôle potentiel de *v-erbA* dans la traduction (Gonin-Giraud et al., 2008). De plus, l'analyse par western blot du taux des protéines RPS3 et RPS3a dans la fraction des protéines totales indique qu'il n'y a pas de variations au niveau protéique alors que le taux de leurs transcrits est réprimée sous l'effet de *v-erbA*. Ces résultats transcriptomiques et protéomiques semblent montrer du doigt l'implication de *v-erbA* dans le processus de traduction, *via* une régulation éventuelle de la composition des ribosomes en r-protéines.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé par la technique 2D-DIGE, la composition des ribosomes en r-protéines, provenant de T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G*. Nous avons montré que sous l'effet de *v-erbA*, le taux des protéines RPL11, RPS3 et RPS2 associées aux ribosomes, varie de manière significative notamment dans le cas de RPL11. De plus, des expériences d'immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence la présence de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 dans les T2EC exprimant *v-erbA*. L'ensemble de ces données protéomiques indique, en

conséquence, qu'il existe bien sous l'effet de *v-erba*, au moins une population de ribosomes avec une composition en r-protéines différente de celle conventionnellement admise, *i.e*, constitué d'une seule copie de chaque protéine ribosomique.

Ribosomes avec une composition en r-protéines variable chez d'autres espèces

Ces dernières années, de nombreuses publications supposaient l'existence de plusieurs populations de ribosomes, permettant ainsi la traduction spécifique de certains messagers.

En effet, chez *E. coli*, en présence de l'antibiotique Kasugamycine, des transcrits particuliers sont traduits par des complexes ribosomiques 61S. Ces ribosomes inhabituels mais fonctionnels, sont dépourvus de 6 r-protéines dans la petite sous-unité : RPS1, RPS2, RPS6, RPS12, RPS18, et RPS21 (Kaberina et al., 2009).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 59 gènes codant les r-protéines des 78 gènes existant ont subi un phénomène de duplication, donnant ainsi naissance à 2 copies de r-protéines paralogues. Les premières études menées en 1988 par M. O. Rotenberg semblaient montrer que les fonctions des protéines paralogues étaient redondantes (Rotenberg et al., 1988). Presque 10 ans plus tard, en 1997, des analyses centrées sur les r-protéines paralogues RPS27a et RPS27b, qui diffèrent d'un seul acide aminé sur les 82, ont mis en évidence une relation plus complexe entre les protéines ribosomiques paralogues ; en effet, la déplétion de l'expression de *RPS27b* induit un défaut de maturation des ARNr 18S plus sévère que celui observé avec la déplétion de *RPS27a*. Les levures ayant un défaut d'expression de *RPS27b* accumulent davantage de pré-ARNr 35S et 23S, dus à des défauts de clivage (Baudin-Baillieu et al., 1997). En 2007, Komili et ses collaborateurs ont montré que la traduction des messagers du gène *ASH1* (asymmetric synthesis of HO 1) requiert des ribosomes particuliers, constitués d'un sous-groupe spécifique de r-protéines paralogues (Komili et al., 2007). L'expression du gène *ASH1* est essentielle pour l'orientation du bourgeonnement chez la levure, car les transcrits de ce gène ne se

trouvent que dans la future cellule fille. Plus récemment, en 2012, un groupe espagnol, a conforté l'existence de ribosomes hétérogènes chez la levure par leurs travaux sur les paralogues des phospho-protéines ribosomiques P1 (α et β) et P2 (α et β) (Cardenas et al., 2012). En effet, la sous-unité 60S est constituée normalement d'un complexe hétérodimérique formé par un paralogue des protéines P1 et P2. Ainsi, il existe 4 hétérodimères différents chez la levure qui constituent les ribosomes. Les résultats obtenus par ce groupe ont montré que selon la composition de l'hétérodimère participant à la formation des sous-unités 60S, d'une part l'efficacité de la synthèse protéique, et d'autre part le taux de croissance des levures sont différents.

D'autres études menées chez les rongeurs ont montré clairement la présence de populations différentes de ribosomes dans différents organes, et spécialement dans les testicules (Sugihara et al., 2009). Chez les mammifères, contrairement aux levures, les gènes provenant de processus de duplication sont dans la majorité des cas non fonctionnels (des pseudogènes). L'analyse de la composition des r-protéines associées aux polysomes provenant des glandes mammaires et du foie de souris par électrophorèse bidimensionnelle ont montré la présence d'une protéine spécifique appelée RPL22-like 1, en plus de la protéine RPL22, qui présente 70% d'homologie avec la protéine RPL22. D'autre part, les mêmes analyses réalisées sur les polysomes provenant de testicules de souris ont indiqué la présence des protéines RPL10-like et RPL39-like, en plus des protéines RPL10 et RPL39. Les protéines RPL10-like et RPL39-like sont spécifiques aux polysomes de testicules de souris et montrent 99% et 94% d'homologie avec les r-protéines RPL10 et RPL39, respectivement.

On observe aussi une composition variable des ribosomes en r-protéines chez l'être humain pour la protéine RPS4. Pour cette dernière, il existe trois paralogues fonctionnels, RPS4X (gène localisé sur le chromosome X) et deux RPS4Y1-2 (gènes localisés sur le chromosome Y) (Andres et al., 2008). Ainsi, chez l'être humain de sexe masculin, on trouverait donc deux populations de ribosomes, l'une constituée de la protéine RPS4X et l'autre de RPS4Y (Zinn et al., 1994). Cependant, ces deux

populations de ribosomes sembleraient avoir la même efficacité dans le processus de traduction (Watanabe et al., 1993).

Dans l'étude menée ici, nous avons démontré clairement chez *Gallus gallus*, la présence de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11. Nous pourrions imaginer que chez le poulet, un paralogue de la protéine RPL11 pourrait prendre sa place dans les ribosomes dépourvus de la protéine RPL11, puisque nous n'avons actuellement aucune information concernant l'identification de paragraphes fonctionnels chez cette espèce. Cependant cette hypothèse est peu probable, car l'anticorps dirigé contre la protéine RPL11 utilisé dans les expériences d'immunoprécipitation est polyclonal et il est dirigé contre les épitopes présents sur la protéine RPL11 entière. Or nous savons que les paragraphes sont très proches au niveau des séquences en acides aminés ou en conformation tertiaires. L'anticorps anti-RPL11 aurait donc sans doute reconnu le paralogue de la protéine RPL11, s'il existait, et nous n'aurions jamais pu séparer des ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 des ribosomes contenant la protéine RPL11. Ainsi, nous sommes bien face à une population de ribosomes sans la protéine RPL11, qui pourrait favoriser la traduction de messagers spécifiques, jouant un rôle dans le processus de transformation induit par l'oncogène *v-erbA*.

B/ La protéine RPL11

Nos résultats de 2D-DIGE et de western blot ont montré que le taux de la protéine RPL11 associée aux ribosomes est plus faible dans les T2EC exprimant *v-erbA* en comparaison aux T2EC exprimant *S61G*, alors que ce taux est plus élevé dans la fraction des protéines totales.

B.1/ La protéine RPL11 et les ribosomes

La protéine RPL11 est un constituant de la grande sous-unité ribosomique 60S et présente un poids moléculaire d'environ 20 kDa chez l'Homme. Cette protéine est essentielle à la maturation des sous-unités 60S au cours de la biogenèse des ribosomes.

Des études menées chez la levure ont montré que très tôt dans la biogenèse des ribosomes, le complexe constitué des protéines RPL5, RPL11 et d'ARNr 5S, est recruté par les facteurs d'assemblage Rpf2 et Rrs1 dans la particule pré-ribosomique 90S contenant le pré-ARNr 35S. La présence de l'ARNr 5S est essentielle d'une part pour la maturation des particules pré-ribosomiques et d'autre part pour le bon fonctionnement des ribosomes matures (Kiparisov et al., 2005). Des expériences réalisées par Zhang et ses collaborateurs ont montré que l'absence de l'incorporation d'une seule de ces 4 protéines dans la particule pré-ribosomique 90S conduisait, dans un premier temps, à un défaut de maturation du pré-ARNr 27SB et dans un deuxième temps, à une libération prématurée des particules pré-ribosomiques 66S dans le nucléoplasme, qui ne seront pas exportées vers le cytoplasme ([Figure 37](#)).

Ces données montrent clairement que la protéine RPL11 est une protéine essentielle pour la maturation des sous-unités 60S. Une question émerge alors de ces données : comment peut-on expliquer l'existence d'une population de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 dans les T2EC exprimant *v-erba*? On pourrait penser dans un premier temps que les sous-unités 60S dépourvues de la protéine RPL11 pourraient être en réalité des particules pré-ribosomiques 66S qui n'ont pas fini leur maturation. Or il a été montré que ces particules ne sont pas exportées dans le cytoplasme, et nos analyses de la composition des ribosomes en r-protéines par la 2D-DIGE et par immunoprécipitation ont été réalisées à partir de ribosomes provenant du cytosol. Ceci sous-entend que les sous-unités ribosomiques 60S dépourvues de la protéine RPL11 observées dans les T2EC exprimant *v-erba*, ont été exportées du noyau vers le cytoplasme et qu'en conséquence, elles ont commencé leur maturation cytoplasmique.

Une hypothèse permettant d'expliquer la présence de ces sous-unités ribosomiques 60S dans le cytoplasme pourrait être basée sur l'importance de la conformation des ARNr pour la fixation des r-protéines lors de la biogenèse des ribosomes. Il a en effet été observé qu'à chaque fixation d'une nouvelle r-protéine aux ARNr, de nouveaux sites de fixation pour d'autres r-protéines étaient dévoilés (Hill et al., 1990). Ainsi, nous pourrions imaginer que la protéine RPL11 serait associée à la sous-unité 60S dans les premières étapes de la biogenèse des ribosomes. La fixation de certaines r-protéines *a posteriori*, pourrait ensuite modifier la conformation des ARNr. Etant donné que l'association des r-protéines avec les ARNr sont des processus dynamiques et non figés, on pourrait penser que le changement de conformation des ARNr permettrait la libération de la protéine RPL11 des sous-unités 60S.

Cette hypothèse sous-entend ainsi qu'il existerait dans les T2EC exprimant *v-erbA* des protéines RPL11 libres. Or une r-protéine non associée aux ribosomes ou à un complexe protéique est très vite dégradée dans le nucléoplasme (Lam et al., 2007). Les résultats obtenus par western blot ont montré que le taux de la protéine RPL11 dans la fraction des protéines totales provenant des T2EC exprimant *v-erbA* est sensiblement plus élevé par rapport à celui des T2EC exprimant *S61G*. Ces observations sembleraient montrer que la protéine RPL11 non associée aux ribosomes formerait des complexes avec d'autres protéines, dans notre modèle cellulaire, sous l'effet de *v-erbA*. Ainsi, la protéine RPL11 serait stabilisée dans ces complexes et pourrait assurer différentes fonctions extra-ribosomiques dans les T2EC exprimant *v-erbA*, comme cela a déjà été montré dans d'autres études où la RPL11 exerçait une fonction à la fois dans la régulation de la transcription de *c-myc* (Dai et al., 2007a), ou dans le taux de la protéine p53 (Miliani de Marval and Zhang, 2011).

B.2/ La protéine RPL11 et des fonctions extra-ribosomiques

Diverses fonctions extra-ribosomiques de la protéine RPL11 ont été relatées dans de nombreuses publications, telles que son implication dans le stress ribosomique en régulant la voie de signalisation « r-protéine-MDM2-p53 » (Zhang

et al., 2011), ou encore dans la régulation de la transcription (Dai et al., 2007a), mais aussi dans la traduction de l'oncogène *c-myc* (Challagundla et al., 2011). Il est donc envisageable que la protéine RPL11 puisse aussi avoir une fonction extra-ribosomique dans les T2EC.

Les expériences d'analyse du taux de la protéine RPL11 par western blot indiquent que *RPL11* est légèrement sur-exprimée dans les T2EC exprimant *v-erbA*. Au contraire, la sur-expression du gène *RPL11* dans les T2EC semble provoquer un ralentissement du taux de la prolifération des T2EC. A première vue, il paraît donc bien difficile d'interpréter l'ensemble de ces données puisqu'une prolifération plus rapide caractérise les T2EC exprimant *v-erbA* en comparaison aux T2EC exprimant *S61G*.

Pour expliquer le ralentissement du taux de la prolifération des T2EC lorsque le gène *RPL11* est sur-exprimé, nous émettons l'hypothèse suivante : la sur-synthèse seule de la protéine RPL11 pourrait induire un stress ribosomique dans les T2EC, comme cela a déjà été montré dans le syndrome 5q- ou dans certains cas d'anémie de Diamond-Blackfan (cas non associés à une haplo-insuffisance de *RPL11*) (Dutt et al., 2011) ou lors d'une biogenèse défailante des sous-unités ribosomiques 40S (Fumagalli et al., 2009), où la protéine RPL11 était en excès par rapport à d'autres r-protéines.

Les résultats des western blot montrent que cette sur-expression est faible, et en conséquence, n'est pas létale pour la cellule. Le faible excès de la protéine RPL11, résultant sans doute d'un mécanisme de régulation mis en place par la cellule, pourrait se fixer à la protéine MDM2 et induire en conséquence, une petite activation de la protéine p53. Cette activation serait alors suffisante pour bloquer les T2EC en phase G1 du cycle cellulaire, mais insuffisante pour déclencher le processus d'apoptose, puisque nous n'avons pas observé d'augmentation de la mort cellulaire dans les cellules sur-exprimant *RPL11*. Pour confirmer cette hypothèse, Laetitia mène actuellement des études visant à comparer les distributions des T2EC sur-exprimant ou non *RPL11* dans les phases du cycle cellulaire.

Il est cependant important de noter que la sur-expression de *RPL11* seule dans les T2EC ne peut évidemment pas à elle seule reproduire l'effet de l'oncogène *v-erbA*, car celui-ci a des cibles multiples qui ont des fonctions biologiques variées (Bresson et al., 2007).

D'autre part, de nombreuses publications ont mis en évidence l'interaction directe de la protéine RPL11 avec l'oncoprotéine c-Myc dans la régulation de la transcription de cette dernière, ainsi que dans la biogenèse des ribosomes (Dai et al., 2007b). Très récemment, des études menées par Sasaki et ses collaborateurs ont permis d'identifier un nouveau mécanisme de régulation reliant l'excès de la protéine RPL11, la voie de signalisation MDM2-p53 et la croissance des cellules cancéreuses (Lu, 2011; Sasaki et al., 2011). Cette étude a mis en évidence une séquestration de la protéine RPL11 par la protéine PICT1, lors d'un stress ribosomique, dans le noyau. L'interaction entre les protéines PICT1 et RPL11 empêche cette dernière de se fixer à la protéine MDM2, et en conséquence d'activer la protéine p53. Par ce mécanisme de séquestration de la protéine RPL11 dans le noyau, la protéine PICT1 favoriserait la progression tumorale. La mise à jour de ce mécanisme de régulation pourrait alors expliquer les résultats que nous avons obtenus dans notre étude : un des mécanismes d'action de l'oncogène *v-erbA* consisterait à induire dans les T2EC la biogenèse d'une population de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11. Ces ribosomes non conventionnels favoriseraient alors la traduction de messagers spécifiques, jouant un rôle dans le processus de transformation induit par l'oncogène *v-erbA*. D'autre part, les protéines RPL11 libres, non associées aux ribosomes seraient alors séquestrées par d'autres protéines, peut-être par un homologue de PICT1 chez le poulet, ou par *v-erbA* lui-même, afin de permettre le maintien des T2EC en état d'auto-renouvellement sous l'effet de *v-erbA* ([Figure 38](#)).

C/ Conclusion

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis d'une part de mettre en évidence l'existence d'une population de ribosomes avec une composition variable en r-protéines, et plus spécifiquement des ribosomes dépourvus de la protéine RPL11, dans les T2EC sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*. Ces ribosomes non conventionnels pourraient favoriser alors la traduction d'ARNm spécifiques pouvant jouer un rôle dans le processus de transformation induit par *v-erbA*. C'est la première démonstration que l'oncogène *v-erbA* pourrait agir sur l'appareil traductionnel. D'autre part, nous avons montré que la protéine RPL11 pourrait avoir une fonction extra-ribosomique, qui reste encore à déterminer, dans notre modèle cellulaire et qui pourrait participer au processus transformant induit par l'oncogène *v-erbA*.

Le travail présenté dans ce manuscrit devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le processus de transformation cellulaire induit par l'oncogène *v-erbA*, mais aussi de manière plus générale. Plus particulièrement, les résultats obtenus au cours de ma thèse devraient éclaircir le rôle des r-protéines dans le développement de certains cancers, de par leur fonction dans la synthèse protéique, mais aussi probablement de par leur fonction extra-ribosomique. La preuve d'une variation de la composition des ribosomes en r-protéines chez les eucaryotes, en lien avec la transformation cellulaire démontrée ici, est un concept très novateur pouvant ouvrir des perspectives intéressantes sur de nouvelles applications thérapeutiques.

Références

Aguissa-Toure, A. H., Da Costa, L., Leblanc, T., Tchernia, G., Fribourg, S., and Gleizes, P. E. (2009). [Diamond-Blackfan anemia reveals the dark side of ribosome biogenesis]. *Med Sci (Paris)* *25*, 69-76.

Amaldi, F., Camacho-Vanegas, O., Cardinall, B., Cecconi, F., Crosio, C., Loreni, F., Mariottini, P., Pellizzoni, L., and Pierandrei-Amaldi, P. (1995). Structure and expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis*. *Biochem Cell Biol* *73*, 969-977.

Anderson, S. J., Lauritsen, J. P., Hartman, M. G., Foushee, A. M., Lefebvre, J. M., Shinton, S. A., Gerhardt, B., Hardy, R. R., Oravec, T., and Wiest, D. L. (2007). Ablation of ribosomal protein L22 selectively impairs alphabeta T cell development by activation of a p53-dependent checkpoint. *Immunity* *26*, 759-772.

Andres, O., Kellermann, T., Lopez-Giraldez, F., Rozas, J., Domingo-Roura, X., and Bosch, M. (2008). RPS4Y gene family evolution in primates. *BMC Evol Biol* *8*, 142.

Aoyama, K., Hidaka, S., Tanaka, T., and Ishikawa, K. (1982). The nucleotide sequence of 5S RNA from rat liver ribosomes. *J Biochem* *91*, 363-367.

Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al.* (2005). *c-Myc* associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* *7*, 303-310.

Ayrault, O., Andrique, L., Fauvin, D., Eymin, B., Gazzeri, S., and Seite, P. (2006). Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation. *Oncogene* *25*, 7577-7586.

Azim, H., Azim, H. A., Jr., and Escudier, B. (2010). Targeting mTOR in cancer: renal cell is just a beginning. *Target Oncol* *5*, 269-280.

Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell* *15*, 5-15.

Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q. J., Liu, Y., and Jiang, Y. (2007). Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* *318*, 977-980.

Barlow, J. L., Drynan, L. F., Hewett, D. R., Holmes, L. R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A. L., Jolin, H. E., Pannell, R., Middleton, A. J., Wong, S. H., *et al.* (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q-syndrome. *Nat Med* *16*, 59-66.

Bartova, E., Horakova, A. H., Uhlirova, R., Raska, I., Galiova, G., Orlova, D., and Kozubek, S. (2010). Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J Histochem Cytochem* *58*, 391-403.

Baudin-Baillieu, A., Tollerve, D., Cullin, C., and Lacroute, F. (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell Biol* *17*, 5023-5032.

Bellemer, C., Chabosseau, P., Gallardo, F., Gleizes, P. E., and Stahl, G. (2010). Genetic interactions show the importance of rRNA modification machinery for the role of Rps15p during ribosome biogenesis in *S. cerevisiae*. *PLoS One* *5*, e10472.

Beug, H., Palmieri, S., Freudenstein, C., Zentgraf, H., and Graf, T. (1982). Hormone-dependent terminal differentiation in vitro of chicken erythroleukemia cells transformed by ts mutants of avian erythroblastosis virus. *Cell* *28*, 907-919.

Bister, K., and Duesberg, P. H. (1979). Structure and specific sequences of avian erythroblastosis virus RNA: evidence for multiple classes of transforming genes among avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 5023-5027.

Blazquez-Domingo, M., Grech, G., and von Lindern, M. (2005). Translation initiation factor 4E inhibits differentiation of erythroid progenitors. *Mol Cell Biol* *25*, 8496-8506.

Blumenthal, T., and Carmichael, G. G. (1979). RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase. *Annu Rev Biochem* *48*, 525-548.

Bonamy, G. M., Guiochon-Mantel, A., and Allison, L. A. (2005). Cancer promoted by the oncoprotein v-ErbA may be due to subcellular mislocalization of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* *19*, 1213-1230.

Bonde, B. G., Sharif, M., and Privalsky, M. L. (1991). Ontogeny of the v-erbA oncoprotein from the thyroid hormone receptor: an alteration in the DNA binding domain plays a role crucial for v-erbA function. *J Virol* *65*, 2037-2046.

Boocock, G. R., Morrison, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. R., and Rommens, J. M. (2003). Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* *33*, 97-101.

Boon, K., Caron, H. N., van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M. C., van Sluis, P., Roobeek, I., Weis, I., Voute, P. A., Schwab, M., and Versteeg, R. (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J* *20*, 1383-1393.

Boria, I., Garelli, E., Gazda, H. T., Aspesi, A., Quarello, P., Pavesi, E., Ferrante, D., Meerpohl, J. J., Kartal, M., Da Costa, L., *et al.* (2010). The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat* *31*, 1269-1279.

Boulwood, J., Fidler, C., Lewis, S., Kelly, S., Sheridan, H., Littlewood, T. J., Buckle, V. J., and Wainscoat, J. S. (1994). Molecular mapping of uncharacteristically small 5q

deletions in two patients with the 5q- syndrome: delineation of the critical region on 5q and identification of a 5q- breakpoint. *Genomics* *19*, 425-432.

Boulwood, J., Fidler, C., Strickson, A. J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J. F., Jaju, R. J., and Wainscoat, J. S. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* *99*, 4638-4641.

Boulwood, J., Pellagatti, A., Cattan, H., Lawrie, C. H., Giagounidis, A., Malcovati, L., Della Porta, M. G., Jadersten, M., Killick, S., Fidler, C., *et al.* (2007). Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br J Haematol* *139*, 578-589.

Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., G'Elugne J, P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1997). A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *Embo J* *16*, 4770-4776.

Brand, R. C., Klootwijk, J., Van Steenberg, T. J., De Kok, A. J., and Planta, R. J. (1977). Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA. *Eur J Biochem* *75*, 311-318.

Bresson, C., Keime, C., Faure, C., Letrillard, Y., Barbado, M., Sanfilippo, S., Benhra, N., Gandrillon, O., and Gonin-Giraud, S. (2007). Large-scale analysis by SAGE reveals new mechanisms of v-erbA oncogene action. *BMC Genomics* *8*, 390.

Bresson-Mazet, C., Gandrillon, O., and Gonin-Giraud, S. (2008). Stem cell antigen 2: a new gene involved in the self-renewal of erythroid progenitors. *Cell Prolif* *41*, 726-738.

Busch, H., and Smetana, K. (1970). *The nucleolus*. Academic Press, New York, 626.

Cardenas, D., Revuelta-Cervantes, J., Jimenez-Diaz, A., Camargo, H., Remacha, M., and Ballesta, J. P. (2012). P1 and P2 protein heterodimer binding to the PO protein of *Saccharomyces cerevisiae* is relatively non-specific and a source of ribosomal heterogeneity. *Nucleic Acids Res* *40*, 1-10.

Cavaille, J., Nicoloso, M., and Bachellerie, J. P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* *383*, 732-735.

Challagundla, K. B., Sun, X. X., Zhang, X., DeVine, T., Zhang, Q., Sears, R. C., and Dai, M. S. (2011). Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress. *Mol Cell Biol* *31*, 4007-4021.

Challice, J. M., and Segall, J. (1989). Transcription of the 5 S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *J Biol Chem* *264*, 20060-20067.

-
- Chan, Y. L.,** Diaz, J. J., Denoroy, L., Madjar, J. J., and Wool, I. G. (1996). The primary structure of rat ribosomal protein L10: relationship to a Jun-binding protein and to a putative Wilms' tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* *225*, 952-956.
- Chan, Y. L.,** Olvera, J., Gluck, A., and Wool, I. G. (1994). A leucine zipper-like motif and a basic region-leucine zipper-like element in rat ribosomal protein L13a. Identification of the tumor transplantation antigen P198. *J Biol Chem* *269*, 5589-5594.
- Chan, Y. L.,** Olvera, J., and Wool, I. G. (1983). The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. *Nucleic Acids Res* *11*, 7819-7831.
- Chen, F. W.,** and Ioannou, Y. A. (1999). Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol* *18*, 429-448.
- Chen, J.,** Guo, K., and Kastan, M. B. (2012). Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in the translational control of human p53 mRNA. *J Biol Chem*.
- Chen, S.,** Warszawski, J., Bader-Meunier, B., Tchernia, G., Da Costa, L., Marie, I., and Dommergues, J. P. (2005). Diamond-blackfan anemia and growth status: the French registry. *J Pediatr* *147*, 669-673.
- Chiocchetti, A.,** Gibello, L., Carando, A., Aspesi, A., Secco, P., Garelli, E., Loreni, F., Angelini, M., Biava, A., Dahl, N., *et al.* (2005). Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica* *90*, 1453-1462.
- Choesmel, V.,** Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Cretien, A., Leblanc, T., Tchernia, G., Da Costa, L., and Gleizes, P. E. (2007). Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *109*, 1275-1283.
- Choesmel, V.,** Fribourg, S., Aguisa-Toure, A. H., Pinaud, N., Legrand, P., Gazda, H. T., and Gleizes, P. E. (2008). Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet* *17*, 1253-1263.
- Choudhary, C.,** Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* *325*, 834-840.
- Ciarmatori, S.,** Scott, P. H., Sutcliffe, J. E., McLees, A., Alzuherri, H. M., Dannenberg, J. H., te Riele, H., Grummt, I., Voit, R., and White, R. J. (2001). Overlapping functions of the pRb family in the regulation of rRNA synthesis. *Mol Cell Biol* *21*, 5806-5814.
- Colombo, E.,** Alcalay, M., and Pelicci, P. G. (2011). Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene* *30*, 2595-2609.

-
- Colombo, E.,** Martinelli, P., Zamponi, R., Shing, D. C., Bonetti, P., Luzi, L., Volorio, S., Bernard, L., Pruneri, G., Alcalay, M., and Pelicci, P. G. (2006). Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res* *66*, 3044-3050.
- Congdon, C. C.** (1957). Bone marrow transplantation in animals exposed to whole-body radiation. *J Cell Physiol Suppl* *50*, 103-108.
- Da Costa, L.,** Moniz, H., Simansour, M., Tchernia, G., Mohandas, N., and Leblanc, T. (2010). Diamond-Blackfan anemia, ribosome and erythropoiesis. *Transfus Clin Biol* *17*, 112-119.
- Dai, M. S.,** Arnold, H., Sun, X. X., Sears, R., and Lu, H. (2007a). Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *Embo J* *26*, 3332-3345.
- Dai, M. S.,** and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* *279*, 44475-44482.
- Dai, M. S.,** Sears, R., and Lu, H. (2007b). Feedback regulation of c-Myc by ribosomal protein L11. *Cell Cycle* *6*, 2735-2741.
- Dai, M. S.,** Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X. X., David, L., and Lu, H. (2004). Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* *24*, 7654-7668.
- Dang, C. V.,** O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* *16*, 253-264.
- Davies, B.,** and Fried, M. (1995). The L19 ribosomal protein gene (RPL19): gene organization, chromosomal mapping, and novel promoter region. *Genomics* *25*, 372-380.
- Decatur, W. A.,** Liang, X. H., Piekna-Przybylska, D., and Fournier, M. J. (2007). Identifying effects of snoRNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome. *Methods Enzymol* *425*, 283-316.
- Delaunay, J.,** Creusot, F., and Schapira, G. (1973). Evolution of ribosomal proteins. *Eur J Biochem* *39*, 305-312.
- Diamond, L.,** and Blackfan, K. (1938). Hypoplastic anemia. *AM J Dis Child* *56*, 464.
- Diaz, J. J.,** Gandrillon, O., Hentzen, D., Leguellec, D., Samarut, J., and Madjar, J. J. (1989). Increase in ribosomal protein S6 phosphorylation is due to v-erbB-transforming activity and not to v-erbA mitogenic activity in avian erythroblastosis virus-infected chicken embryo fibroblasts. *Oncogene Res* *4*, 163-175.

Dingwall, C., and Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* *16*, 478-481.

Doherty, L., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choismel, V., O'Donohue, M. F., Clinton, C., Schneider, H. E., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., *et al.* (2010). Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* *86*, 222-228.

Dokal, I. (2011). Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* *2011*, 480-486.

Dowdy, S. F., Lai, K. M., Weissman, B. E., Matsui, Y., Hogan, B. L., and Stanbridge, E. J. (1991). The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. *Nucleic Acids Res* *19*, 5763-5769.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M. D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* *307*, 521-527.

Duan, J., Ba, Q., Wang, Z., Hao, M., Li, X., Hu, P., Zhang, D., Zhang, R., and Wang, H. Knockdown of ribosomal protein S7 causes developmental abnormalities via p53 dependent and independent pathways in zebrafish. *Int J Biochem Cell Biol* *43*, 1218-1227.

Dudov, K. P., and Perry, R. P. (1984). The gene family encoding the mouse ribosomal protein L32 contains a uniquely expressed intron-containing gene and an unmutated processed gene. *Cell* *37*, 457-468.

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F. H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., *et al.* (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* *117*, 2567-2576.

Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D. E., Attar, E., Ellis, S. R., and Golub, T. R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* *451*, 335-339.

Emmott, E., and Hiscox, J. A. (2009). Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* *10*, 231-238.

Eng, F. J., and Warner, J. R. (1991). Structural basis for the regulation of splicing of a yeast messenger RNA. *Cell* *65*, 797-804.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154-156.

-
- Farrar, J. E.,** Nater, M., Caywood, E., McDevitt, M. A., Kowalski, J., Takemoto, C. M., Talbot, C. C., Jr., Meltzer, P., Esposito, D., Beggs, A. H., *et al.* (2008). Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *112*, 1582-1592.
- Fassio, C. A.,** Schofield, B. J., Seiser, R. M., Johnson, A. W., and Lycan, D. E. (2010). Dominant mutations in the late 40S biogenesis factor Ltv1 affect cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *185*, 199-209.
- Felton-Edkins, Z. A.,** Kenneth, N. S., Brown, T. R., Daly, N. L., Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003). Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle* *2*, 181-184.
- Feo, S.,** Davies, B., and Fried, M. (1992). The mapping of seven intron-containing ribosomal protein genes shows they are unlinked in the human genome. *Genomics* *13*, 201-207.
- Ferreira-Cerca, S.,** Poll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* *20*, 263-275.
- Ferreira-Cerca, S.,** Poll, G., Kuhn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Mol Cell* *28*, 446-457.
- Fewell, S. W.,** and Woolford, J. L., Jr. (1999). Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol Cell Biol* *19*, 826-834.
- Ford, C. L.,** Randal-Whitis, L., and Ellis, S. R. (1999). Yeast proteins related to the p40/laminin receptor precursor are required for 20S ribosomal RNA processing and the maturation of 40S ribosomal subunits. *Cancer Res* *59*, 704-710.
- Foss, E. J.,** Radulovic, D., Shaffer, S. A., Ruderfer, D. M., Bedalov, A., Goodlett, D. R., and Kruglyak, L. (2007). Genetic basis of proteome variation in yeast. *Nat Genet* *39*, 1369-1375.
- Friedman, D. I.,** Schauer, A. T., Baumann, M. R., Baron, L. S., and Adhya, S. L. (1981). Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 1115-1118.
- Frojmark, A. S.,** Badhai, J., Klar, J., Thuveson, M., Schuster, J., and Dahl, N. (2010). Cooperative effect of ribosomal protein s19 and Pim-1 kinase on murine c-Myc expression and myeloid/erythroid cellularity. *J Mol Med (Berl)* *88*, 39-46.

-
- Fromont-Racine, M.**, Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* *313*, 17-42.
- Frykberg, L.**, Palmieri, S., Beug, H., Graf, T., Hayman, M. J., and Vennstrom, B. (1983). Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the *erbA* or *erbB* oncogenes. *Cell* *32*, 227-238.
- Fumagalli, S.**, Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G. F., Bernardi, R., Pandolfi, P. P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* *11*, 501-508.
- Gaines, P.**, and Wojchowski, D. M. (1999). pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *Biotechniques* *26*, 683-688.
- Ganapathi, K. A.**, Austin, K. M., Lee, C. S., Dias, A., Malsch, M. M., Reed, R., and Shimamura, A. (2007). The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood* *110*, 1458-1465.
- Ganapathi, K. A.**, and Shimamura, A. (2008). Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure. *Br J Haematol* *141*, 376-387.
- Gandrillon, O.**, Ferrand, N., Michaille, J. J., Roze, L., Zile, M. H., and Samarut, J. (1994). *c-erbA* alpha/T3R and RARs control commitment of hematopoietic self-renewing progenitor cells to apoptosis or differentiation and are antagonized by the *v-erbA* oncogene. *Oncogene* *9*, 749-758.
- Gandrillon, O.**, Jurdic, P., Benchaibi, M., Xiao, J. H., Ghysdael, J., and Samarut, J. (1987). Expression of the *v-erbA* oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulates their proliferation in vitro and enhances tumor growth in vivo. *Cell* *49*, 687-697.
- Gandrillon, O.**, Jurdic, P., Pain, B., Desbois, C., Madjar, J. J., Moscovici, M. G., Moscovici, C., and Samarut, J. (1989). Expression of the *v-erbA* product, an altered nuclear hormone receptor, is sufficient to transform erythrocytic cells in vitro. *Cell* *58*, 115-121.
- Gandrillon, O.**, Rascle, A., and Samarut, J. (1995). The *v-erba* oncogene - a superb tool for dissecting the involvement of nuclear hormone receptors in differentiation and neoplasia (review). *Int J Oncol* *6*, 215-231.
- Gandrillon, O.**, and Samarut, J. (1998). Role of the different RAR isoforms in controlling the erythrocytic differentiation sequence. Interference with the *v-erbA* and *p135gag-myb-ets* nuclear oncogenes. *Oncogene* *16*, 563-574.

-
- Gandrillon, O.**, Schmidt, U., Beug, H., and Samarut, J. (1999). TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism. *Embo J* *18*, 2764-2781.
- Gazda, H. T.**, Preti, M., Sheen, M. R., O'Donohue, M. F., Vlachos, A., Davies, S. M., Kattamis, A., Doherty, L., Landowski, M., Buros, C., *et al.* (2012). Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat.*
- Gazda, H. T.**, Sheen, M. R., Vlachos, A., Choessel, V., O'Donohue, M. F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C. A., Newburger, P. E., *et al.* (2008). Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* *83*, 769-780.
- Ghazalpour, A.**, Bennett, B., Petyuk, V. A., Orozco, L., Hagopian, R., Mungrue, I. N., Farber, C. R., Sinsheimer, J., Kang, H. M., Furlotte, N., *et al.* (2011). Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet* *7*, e1001393.
- Gleizes, P. E.**, Noaillac-Depeyre, J., Leger-Silvestre, I., Teulieres, F., Dauxois, J. Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M. C., and Gas, N. (2001). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol* *155*, 923-936.
- Golomb, L.**, Bublik, D. R., Wilder, S., Nevo, R., Kiss, V., Grabusic, K., Volarevic, S., and Oren, M. (2012). Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis. *Mol Cell* *45*, 222-232.
- Gomez-Roman, N.**, Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290-294.
- Gonin-Giraud, S.**, Bresson-Mazet, C., and Gandrillon, O. (2008). Involvement of the TGF-beta and mTOR/p70S6Kinase pathways in the transformation process induced by v-ErbA. *Leuk Res* *32*, 1878-1888.
- Gonzalez, I. L.**, and Sylvester, J. E. (1995). Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* *27*, 320-328.
- Gorlich, D.** (1997). Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 412-419.
- Gorlich, D.**, and Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* *271*, 1513-1518.
- Graf, T.**, and Beug, H. (1978). Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta* *516*, 269-299.

-
- Grandori, C.**, Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 653-699.
- Grandori, C.**, Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* *7*, 311-318.
- Grisendi, S.**, Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P. P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* *437*, 147-153.
- Group, T. C. S. C.** (1996). Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group. *Nat Genet* *12*, 130-136.
- Grummt, I.**, Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N., and Bachellerie, J. P. (1985). Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer. *Cell* *43*, 801-810.
- Gunsilius, E.**, Gastl, G., and Petzer, A. L. (2001). Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother* *55*, 186-194.
- Hadjiolov, A. A.** (1985). The nucleolus and ribosome biogenesis. In *Cell Biology Monographs Springer-Verlag, New York*, 1-263.
- Hadjiolov, A. A.**, Georgiev, O. I., Nosikov, V. V., and Yavachev, L. P. (1984). Primary and secondary structure of rat 28 S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* *12*, 3677-3693.
- Hadjiolova, K. V.**, Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A. A., and Bachellerie, J. P. (1993). Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem* *212*, 211-215.
- Hannan, K. M.**, Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., and Hannan, R. D. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* *23*, 8862-8877.
- He, H.**, and Sun, Y. (2007). Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis. *Oncogene* *26*, 2707-2716.

-
- Henderson, A. S.**, Warburton, D., and Atwood, K. C. (1973). Letter: Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. *Nature* *245*, 95-97.
- Henras, A. K.**, Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., and Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* *65*, 2334-2359.
- Henry, J. L.**, Coggin, D. L., and King, C. R. (1993). High-level expression of the ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2. *Cancer Res* *53*, 1403-1408.
- Hill, W. E.**, Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. W. (1990). The Ribosome: Structure, function, and evolution. American Society of Microbiology, xxiii, 678.
- Horos, R.**, Ijspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I. P., and von Lindern, M. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* *119*, 262-272.
- Huang, S.** (2002). Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* *157*, 739-741.
- Huh, W. K.**, Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686-691.
- Hurt, E.**, Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D., and Simos, G. (1999). A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol* *144*, 389-401.
- Ion, A.**, Crosby, A. H., Kremer, H., Kenmochi, N., Van Reen, M., Fenske, C., Van Der Burgt, I., Brunner, H. G., Montgomery, K., Kucherlapati, R. S., *et al.* (2000). Detailed mapping, mutation analysis, and intragenic polymorphism identification in candidate Noonan syndrome genes MYL2, DCN, EPS8, and RPL6. *J Med Genet* *37*, 884-886.
- Jacobson, M. R.**, Cao, L. G., Wang, Y. L., and Pederson, T. (1995). Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *J Cell Biol* *131*, 1649-1658.
- Jakel, S.**, and Gorlich, D. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J* *17*, 4491-4502.

-
- Jakovljevic, J.**, de Mayolo, P. A., Miles, T. D., Nguyen, T. M., Leger-Silvestre, I., Gas, N., and Woolford, J. L., Jr. (2004). The carboxy-terminal extension of yeast ribosomal protein S14 is necessary for maturation of 43S preribosomes. *Mol Cell* *14*, 331-342.
- Jang, C. Y.**, Shin, H. S., Kim, H. D., Kim, J. W., Choi, S. Y., and Kim, J. (2011). Ribosomal protein S3 is stabilized by sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* *414*, 523-527.
- Jefferies, H. B.**, Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* *16*, 3693-3704.
- Kaberdina, A. C.**, Szaflarski, W., Nierhaus, K. H., and Moll, I. (2009). An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: a look into ancestral times of protein synthesis? *Mol Cell* *33*, 227-236.
- Kaltschmidt, E.** (1971). Ribosomal proteins. XIV. Isoelectric points of ribosomal proteins of *E. coli* as determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* *43*, 25-31.
- Kaltschmidt, E.**, and Wittmann, H. G. (1970). Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal Biochem* *36*, 401-412.
- Kaltschmidt, E.**, and Wittmann, H. G. (1972). Ribosomal proteins. XXXII. Comparison of several extraction methods for proteins from *Escherichia coli* ribosomes. *Biochimie* *54*, 167-175.
- Kasai, H.**, Nadano, D., Hidaka, E., Higuchi, K., Kawakubo, M., Sato, T. A., and Nakayama, J. (2003). Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* *51*, 567-574.
- Keel, S. B.**, Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., *et al.* (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* *319*, 825-828.
- Kenmochi, N.**, Kawaguchi, T., Rozen, S., Davis, E., Goodman, N., Hudson, T. J., Tanaka, T., and Page, D. C. (1998). A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res* *8*, 509-523.
- Kenmochi, N.**, Yoshihama, M., Higa, S., and Tanaka, T. (2000). The human ribosomal protein L6 gene in a critical region for Noonan syndrome. *J Hum Genet* *45*, 290-293.

Khanna, N., Sen, S., Sharma, H., and Singh, N. (2003). S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* *304*, 26-35.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* *110*, 163-175.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* *11*, 895-904.

Kim, S., Li, Q., Dang, C. V., and Lee, L. A. (2000). Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11198-11202.

King, T. H., Liu, B., McCully, R. R., and Fournier, M. J. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol Cell* *11*, 425-435.

Kiparisov, S., Petrov, A., Meskauskas, A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., and Dinman, J. D. (2005). Structural and functional analysis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* *274*, 235-247.

Kirn-Safran, C. B., Oristian, D. S., Focht, R. J., Parker, S. G., Vivian, J. L., and Carson, D. D. (2007). Global growth deficiencies in mice lacking the ribosomal protein HIP/RPL29. *Dev Dyn* *236*, 447-460.

Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., and Jady, B. E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell* *37*, 597-606.

Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., and Silver, P. A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* *131*, 557-571.

Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., and Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 589-597.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Lam, Y. W., Lamond, A. I., Mann, M., and Andersen, J. S. (2007). Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol* *17*, 749-760.

-
- Lamanna, A. C.**, and Karbstein, K. (2009). Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14259-14264.
- Larkin, J. C.**, Thompson, J. R., and Woolford, J. L., Jr. (1987). Structure and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* CRY1 gene: a highly conserved ribosomal protein gene. *Mol Cell Biol* *7*, 1764-1775.
- Leblanc, T.**, Gluckman, E., and Brauner, R. (2003). Growth hormone deficiency caused by pituitary stalk interruption in Diamond-Blackfan anemia. *J Pediatr* *142*, 358.
- Leger-Silvestre, I.**, Caffrey, J. M., Dawaliby, R., Alvarez-Arias, D. A., Gas, N., Bertolone, S. J., Gleizes, P. E., and Ellis, S. R. (2005). Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J Biol Chem* *280*, 38177-38185.
- Leger-Silvestre, I.**, Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J. C., Choessel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., and Gleizes, P. E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *Embo J* *23*, 2336-2347.
- Lempiainen, H.**, and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 855-863.
- Li, J.**, Tan, J., Zhuang, L., Banerjee, B., Yang, X., Chau, J. F., Lee, P. L., Hande, M. P., Li, B., and Yu, Q. (2007). Ribosomal protein S27-like, a p53-inducible modulator of cell fate in response to genotoxic stress. *Cancer Res* *67*, 11317-11326.
- Liang, X. H.**, Liu, Q., and Fournier, M. J. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Mol Cell* *28*, 965-977.
- Lindstrom, M. S.**, Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G., and Zhang, Y. (2007). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* *27*, 1056-1068.
- Lipton, J. M.**, Federman, N., Khabbaze, Y., Schwartz, C. L., Hilliard, L. M., Clark, J. I., and Vlachos, A. (2001). Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *J Pediatr Hematol Oncol* *23*, 39-44.
- Liu, J. J.**, Huang, B. H., Zhang, J., Carson, D. D., and Hooi, S. C. (2006). Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells. *J Cell Physiol* *207*, 287-292.

Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* *3*, 577-587.

Lomholt, B., Frederiksen, S., Nielsen, J. N., and Hallenberg, C. (1995). Additional assignment of the human 5S rRNA genes to chromosome region 1q31. *Cytogenet Cell Genet* *70*, 76-79.

Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R., and Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* *12*, 197-201.

Lowe, S. W., and Sherr, C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* *13*, 77-83.

Lu, H. (2011). A ribosomal tactic to halt cancer. *Nat Med* *17*, 930-931.

Macias, E., Jin, A., Deisenroth, C., Bhat, K., Mao, H., Lindstrom, M. S., and Zhang, Y. (2010). An ARF-independent c-MYC-activated tumor suppression pathway mediated by ribosomal protein-Mdm2 Interaction. *Cancer Cell* *18*, 231-243.

Madjar, J. J. (1994). Preparation of ribosomes and ribosomal proteins from cultured cells. *Cell Biology: A laboratory Handbook A laboratory Handbook*, 657-661.

Madjar, J. J., Arpin, M., Buisson, M., and Reboud, J. P. (1979). Spot position of rat liver ribosomal proteins by four different two-dimensional electrophoreses in polyacrylamide gel. *Mol Gen Genet* *171*, 121-134.

Malygin, A. A., Parakhnevitch, N. M., Ivanov, A. V., Eperon, I. C., and Karpova, G. G. (2007). Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. *Nucleic Acids Res* *35*, 6414-6423.

Marrone, A., Walne, A., Tamary, H., Masunari, Y., Kirwan, M., Beswick, R., Vulliamy, T., and Dokal, I. (2007). Telomerase reverse-transcriptase homozygous mutations in autosomal recessive dyskeratosis congenita and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Blood* *110*, 4198-4205.

Martin, D. E., Soulard, A., and Hall, M. N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* *119*, 969-979.

Marygold, S. J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G. H., Harrison, P. M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T. C., *et al.* (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* *8*, R216.

Maximow, A. (1909). Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica* VIII 8, 125-134.

Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25, 6384-6391.

Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 18, 423-434.

Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V., Maitra, R. K., DiCorleto, P. E., and Fox, P. L. (2003). Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* 115, 187-198.

McConkey, E. H., Bielka, H., Gordon, J., Lastick, S. M., Lin, A., Ogata, K., Reboud, J. P., Traugh, J. A., Traut, R. R., Warner, J. R., *et al.* (1979). Proposed uniform nomenclature for mammalian ribosomal proteins. *Mol Gen Genet* 169, 1-6.

McGowan, K. A., Li, J. Z., Park, C. Y., Beaudry, V., Tabor, H. K., Sabnis, A. J., Zhang, W., Fuchs, H., de Angelis, M. H., Myers, R. M., *et al.* (2008). Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* 40, 963-970.

McKusick, V. A., Eldridge, R., Hostetler, J. A., Ruangwit, U., and Egeland, J. A. (1965). Dwarfism in the Amish. Ii. Cartilage-Hair Hypoplasia. *Bull Johns Hopkins Hosp* 116, 285-326.

McStay, B., and Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 131-157.

Mejia-Pous, C., Vinuelas, J., Faure, C., Koszela, J., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Gandrillon, O. (2009). A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary erythroid progenitors. *BMC Biotechnol* 9, 81.

Menne, T. F., Goyenechea, B., Sanchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Brost, R. L., Costanzo, M., Boone, C., and Warren, A. J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* 39, 486-495.

Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267, 6321-6330.

Meyuhas, O., and Dreazen, A. (2009). Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90, 109-153.

-
- Miliani de Marval, P. L.,** and Zhang, Y. (2011). The RP-Mdm2-p53 pathway and tumorigenesis. *Oncotarget* *2*, 234-238.
- Mitasiunaite, I.,** Rigotti, C., Schicklin, S., Meyniel, L., Boulicaut, J. F., and Gandrillon, O. (2009). Extracting signature motifs from promoter sets of differentially expressed genes. *In Silico Biol* *9*, S17-39.
- Mitrovich, Q. M.,** and Anderson, P. (2000). Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Dev* *14*, 2173-2184.
- Montanaro, L.,** Trere, D., and Derenzini, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol* *173*, 301-310.
- Montanaro, L.,** Trere, D., and Derenzini, M. (2011). Changes in ribosome biogenesis may induce cancer by down-regulating the cell tumor suppressor potential. *Biochim Biophys Acta* *1825*, 101-110.
- Moritz, M.,** Paulovich, A. G., Tsay, Y. F., and Woolford, J. L., Jr. (1990). Depletion of yeast ribosomal proteins L16 or rp59 disrupts ribosome assembly. *J Cell Biol* *111*, 2261-2274.
- Morris, S. W.,** Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., and Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* *263*, 1281-1284.
- Moss, T.,** Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., and Stefanovsky, V. (2007). A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* *64*, 29-49.
- Myant, K.,** and Sansom, O. J. (2011). Wnt/Myc interactions in intestinal cancer: partners in crime. *Exp Cell Res* *317*, 2725-2731.
- Nader, G. A.,** McLoughlin, T. J., and Esser, K. A. (2005). mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *Am J Physiol Cell Physiol* *289*, C1457-1465.
- Narla, A.,** and Ebert, B. L. (2011). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* *115*, 3196-3205.
- Nazar, R. N.,** Sitz, T. O., and Busch, H. (1975). Structural analyses of mammalian ribosomal ribonucleic acid and its precursors. Nucleotide sequence of ribosomal 5.8 S ribonucleic acid. *J Biol Chem* *250*, 8591-8597.
- Neumann, F.,** Hemmerich, P., von Mikecz, A., Peter, H. H., and Krawinkel, U. (1995). Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and

affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucleic Acids Res* *23*, 195-202.

Nguyen-Lefebvre, A. T., Gonin-Giraud, S., Scherl, A., Arboit, P., Granger, L., Sanchez, J. C., Diaz, J. J., Gandrillon, O., and Madjar, J. J. (2011). Identification of human, rat and chicken ribosomal proteins by a combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteomics* *74*, 167-185.

Ni, J. Q., Liu, L. P., Hess, D., Rietdorf, J., and Sun, F. L. (2006). Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev* *20*, 1959-1973.

Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *Embo J* *21*, 5539-5547.

Nolte, R. T., Conlin, R. M., Harrison, S. C., and Brown, R. S. (1998). Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2938-2943.

O'Donohue, M. F., Choessel, V., Faubladiere, M., Fichant, G., and Gleizes, P. E. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J Cell Biol* *190*, 853-866.

Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev* *18*, 196-209.

Oettel, S., Hartel, F., Kober, I., Iben, S., and Seifart, K. H. (1997). Human transcription factors IIIC2, IIIC1 and a novel component IIIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Res* *25*, 2440-2447.

Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M. B., and Oren, M. (2008). Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell* *32*, 180-189.

Palade, G. E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* *1*, 59-68.

Panse, V. G., and Johnson, A. W. (2011). Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci* *35*, 260-266.

Panse, V. G., Kressler, D., Pauli, A., Petfalski, E., Gnadig, M., Tollervey, D., and Hurt, E. (2006). Formation and nuclear export of preribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway. *Traffic* *7*, 1311-1321.

-
- Peculis, B. A.,** and Steitz, J. A. (1993). Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* *73*, 1233-1245.
- Pellagatti, A.,** Hellstrom-Lindberg, E., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M. G., Jadersten, M., Killick, S., Fidler, C., Cazzola, M., *et al.* (2008). Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br J Haematol* *142*, 57-64.
- Pellagatti, A.,** Marafioti, T., Paterson, J. C., Barlow, J. L., Drynan, L. F., Giagounidis, A., Pileri, S. A., Cazzola, M., McKenzie, A. N., Wainscoat, J. S., and Boulwood, J. (2010). Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q- syndrome. *Blood* *115*, 2721-2723.
- Perry, R. P.** (2005). The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. *BMC Evol Biol* *5*, 15.
- Pertschy, B.,** Schneider, C., Gnadig, M., Schafer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J Biol Chem* *284*, 35079-35091.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* *29*, e45.
- Preiss, T.,** Baron-Benhamou, J., Ansorge, W., and Hentze, M. W. (2003). Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat Struct Biol* *10*, 1039-1047.
- Prentice, D. A.** (2004). Adult stem cells. *Issues Law Med* *19*, 265-294.
- Rabilloud, T.** (1999). Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* *112*, 297-305.
- Reboud, A. M.,** Reboud, J. P., Arpin, M., and Wittmann, C. (1971). [Partial extraction of proteins from rat liver ribosomes by different monovalent cations. Properties of the core particles]. *Biochim Biophys Acta* *232*, 171-183.
- Redner, R. L.,** Rush, E. A., Faas, S., Rudert, W. A., and Corey, S. J. (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* *87*, 882-886.
- Ridanpaa, M.,** van Eenennaam, H., Pelin, K., Chadwick, R., Johnson, C., Yuan, B., vanVenrooij, W., Pruijn, G., Salmela, R., Rockas, S., *et al.* (2001). Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell* *104*, 195-203.

Rizos, H., McKenzie, H. A., Ayub, A. L., Woodruff, S., Becker, T. M., Scurr, L. L., Stahl, J., and Kefford, R. F. (2006). Physical and functional interaction of the p14ARF tumor suppressor with ribosomes. *J Biol Chem* *281*, 38080-38088.

Rotenberg, M. O., Moritz, M., and Woolford, J. L., Jr. (1988). Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes. *Genes Dev* *2*, 160-172.

Rouquette, J., Choemmel, V., and Gleizes, P. E. (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *Embo J* *24*, 2862-2872.

Ruggero, D. (2009). The role of Myc-induced protein synthesis in cancer. *Cancer Res* *69*, 8839-8843.

Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* *3*, 179-192.

Rujkijyanont, P., Adams, S. L., Beyene, J., and Dror, Y. (2009). Bone marrow cells from patients with Shwachman-Diamond syndrome abnormally express genes involved in ribosome biogenesis and RNA processing. *Br J Haematol* *145*, 806-815.

Samarut, J., and Gazzolo, L. (1982). Target cells infected by avian erythroblastosis virus differentiate and become transformed. *Cell* *28*, 921-929.

Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., and Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* *25*, 903-915.

Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennstrom, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* *324*, 635-640.

Sasaki, M., Kawahara, K., Nishio, M., Mimori, K., Kogo, R., Hamada, K., Itoh, B., Wang, J., Komatsu, Y., Yang, Y. R., *et al.* (2011). Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med* *17*, 944-951.

Sato, N., Nakazato, T., Kizaki, M., Ikeda, Y., and Okamoto, S. (2004). Transformation of myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia: a case report and review of the literature. *Int J Hematol* *79*, 147-151.

Savkur, R. S., and Olson, M. O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* *26*, 4508-4515.

Schafer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervy, D., Bottcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* *441*, 651-655.

Schafer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *Embo J* *22*, 1370-1380.

Scheer, U., and Hock, R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 385-390.

Scherrer, K., Latham, H., and Darnell, J. E. (1963). Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *49*, 240-248.

Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H., and Eick, D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* *31*, 6148-6156.

Seiser, R. M., Sundberg, A. E., Wollam, B. J., Zobel-Thropp, P., Baldwin, K., Spector, M. D., and Lycan, D. E. (2006). Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *174*, 679-691.

Sharif, M., and Privalsky, M. L. (1991). v-erbA oncogene function in neoplasia correlates with its ability to repress retinoic acid receptor action. *Cell* *66*, 885-893.

Sherton, C. C., and Wool, I. G. (1972). Determination of the number of proteins in liver ribosomes and ribosomal subunits by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* *247*, 4460-4467.

Shwachman, H., Diamond, L. K., Oski, F. A., and Khaw, K. T. (1964). The Syndrome of Pancreatic Insufficiency and Bone Marrow Dysfunction. *J Pediatr* *65*, 645-663.

Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* *336*, 688-690.

Sorensen, P. D., and Frederiksen, S. (1991). Characterization of human 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* *19*, 4147-4151.

Soussi, T. (2011). TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Adv Cancer Res* *110*, 107-139.

Soussi, T., and Wiman, K. G. (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* *12*, 303-312.

Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U., and Silver, P. A. (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. *Mol Biol Cell* *11*, 3777-3789.

Steitz, J. A., Berg, C., Hendrick, J. P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J., and Yario, T. (1988). A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol* *106*, 545-556.

-
- Sugihara, Y.**, Honda, H., Iida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. (2009). Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *J Proteome Res* *9*, 1351-1366.
- Thiel, C. T.**, Horn, D., Zabel, B., Ekici, A. B., Salinas, K., Gebhart, E., Ruschendorf, F., Sticht, H., Spranger, J., Muller, D., *et al.* (2005). Severely incapacitating mutations in patients with extreme short stature identify RNA-processing endoribonuclease RMRP as an essential cell growth regulator. *Am J Hum Genet* *77*, 795-806.
- Thomas, E. D.**, Lochte, H. L., Jr., Lu, W. C., and Ferrebee, J. W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* *257*, 491-496.
- Thompson, A.**, Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K., and Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* *75*, 1895-1904.
- Till, J. E.**, and McCulloch, E. A. (1963). Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiat Res* *18*, 96-105.
- Torczynski, R.**, Bollon, A. P., and Fuke, M. (1983). The complete nucleotide sequence of the rat 18S ribosomal RNA gene and comparison with the respective yeast and frog genes. *Nucleic Acids Res* *11*, 4879-4890.
- Uechi, T.**, Nakajima, Y., Chakraborty, A., Torihara, H., Higa, S., and Kenmochi, N. (2008). Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet* *17*, 3204-3211.
- Uechi, T.**, Tanaka, T., and Kenmochi, N. (2001). A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders. *Genomics* *72*, 223-230.
- Urasaki, A.**, Morvan, G., and Kawakami, K. (2006). Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* *174*, 639-649.
- Valdez, B. C.**, Henning, D., So, R. B., Dixon, J., and Dixon, M. J. (2004). The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10709-10714.

Van den Berghe, H., Cassiman, J. J., David, G., Fryns, J. P., Michaux, J. L., and Sokal, G. (1974). Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* *251*, 437-438.

Vanrobays, E., Gelugne, J. P., Gleizes, P. E., and Caizergues-Ferrer, M. (2003). Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *23*, 2083-2095.

Vita, M., and Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* *16*, 318-330.

Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* *288*, 2045-2047.

Wagner, M., and Perry, R. P. (1985). Characterization of the multigene family encoding the mouse S16 ribosomal protein: strategy for distinguishing an expressed gene from its processed pseudogene counterparts by an analysis of total genomic DNA. *Mol Cell Biol* *5*, 3560-3576.

Wan, F., Anderson, D. E., Barnitz, R. A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L. T., Staudt, L. M., Levens, D., *et al.* (2007). Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* *131*, 927-939.

Wang, D., Umekawa, H., and Olson, M. O. (1993). Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res* *39*, 33-42.

Wang, H., Zhao, L. N., Li, K. Z., Ling, R., Li, X. J., and Wang, L. (2006). Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer* *6*, 91.

Warner, J. R. (1977). In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly. *J Mol Biol* *115*, 315-333.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* *24*, 437-440.

Warner, J. R., and McIntosh, K. B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* *34*, 3-11.

Watanabe, M., Zinn, A. R., Page, D. C., and Nishimoto, T. (1993). Functional equivalence of human X- and Y-encoded isoforms of ribosomal protein S4 consistent with a role in Turner syndrome. *Nat Genet* *4*, 268-271.

-
- Watt, F. M.,** and Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* *287*, 1427-1430.
- Weber, K.,** and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* *244*, 4406-4412.
- White, R. J.** (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 69-78.
- White, R. J.,** Trouche, D., Martin, K., Jackson, S. P., and Kouzarides, T. (1996). Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature* *382*, 88-90.
- Wild, T.,** Horvath, P., Wyler, E., Widmann, B., Badertscher, L., Zemp, I., Kozak, K., Csucs, G., Lund, E., and Kutay, U. (2010). A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS Biol* *8*, e1000522.
- Williams, R. L.,** Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684-687.
- Willig, T. N.,** Gazda, H., and Sieff, C. A. (2000). Diamond-Blackfan anemia. *Curr Opin Hematol* *7*, 85-94.
- Wilson, D. N.,** and Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *40*, 243-267.
- Wobus, A. M.,** and Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* *85*, 635-678.
- Wong, C. C.,** Traynor, D., Basse, N., Kay, R. R., and Warren, A. J. (2011). Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* *118*, 4305-4312.
- Wool, I. G.** (1979). The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem* *48*, 719-754.
- Wool, I. G.** (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* *21*, 164-165.
- Wool, I. G.,** Chan, Y. L., and Gluck, A. (1996). Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol* *73*, 933-947.

-
- Worton, R. G.**, Sutherland, J., Sylvester, J. E., Willard, H. F., Bodrug, S., Dube, I., Duff, C., Kean, V., Ray, P. N., and Schmickel, R. D. (1988). Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science* *239*, 64-68.
- Wu, C. H.**, Sahoo, D., Arvanitis, C., Bradon, N., Dill, D. L., and Felsher, D. W. (2008). Combined analysis of murine and human microarrays and CHIP analysis reveals genes associated with the ability of MYC to maintain tumorigenesis. *PLoS Genet* *4*, e1000090.
- Wu, Q.**, Gou, Y., Wang, Q., Jin, H., Cui, L., Zhang, Y., He, L., Wang, J., Nie, Y., Shi, Y., and Fan, D. (2011). Downregulation of RPL6 by siRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human gastric cancer cell lines. *PLoS One* *6*, e26401.
- Xirodimas, D. P.**, Sundqvist, A., Nakamura, A., Shen, L., Botting, C., and Hay, R. T. (2008). Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep* *9*, 280-286.
- Yadavilli, S.**, Mayo, L. D., Higgins, M., Lain, S., Hegde, V., and Deutsch, W. A. (2009). Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair (Amst)* *8*, 1215-1224.
- Yamanaka, S.**, Li, J., Kania, G., Elliott, S., Wersto, R. P., Van Eyk, J., Wobus, A. M., and Boheler, K. R. (2008). Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* *331*, 5-22.
- Yao, W.**, Roser, D., Kohler, A., Bradatsch, B., Bassler, J., and Hurt, E. (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell* *26*, 51-62.
- Yen, P. M.**, Ikeda, M., Brubaker, J. H., Forgione, M., Sugawara, A., and Chin, W. W. (1994). Roles of v-erbA homodimers and heterodimers in mediating dominant negative activity by v-erbA. *J Biol Chem* *269*, 903-909.
- Yoshihama, M.**, Uechi, T., Asakawa, S., Kawasaki, K., Kato, S., Higa, S., Maeda, N., Minoshima, S., Tanaka, T., Shimizu, N., and Kenmochi, N. (2002). The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome Res* *12*, 379-390.
- Zafarana, G.**, Ishkanian, A. S., Malloff, C. A., Locke, J. A., Sykes, J., Thoms, J., Lam, W. L., Squire, J. A., Yoshimoto, M., Ramnarine, V. R., *et al.* (2012). Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy. *Cancer*.
- Zeller, K. I.**, Haggerty, T. J., Barrett, J. F., Guo, Q., Wonsey, D. R., and Dang, C. V. (2001). Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. *J Biol Chem* *276*, 48285-48291.

Zemp, I., and Kutay, U. (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett* *581*, 2783-2793.

Zengel, J. M., and Lindahl, L. (1994). Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *47*, 331-370.

Zhai, W., and Comai, L. (2000). Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* *20*, 5930-5938.

Zhang, Q., Xiao, H., Chai, S. C., Hoang, Q. Q., and Lu, H. (2011). Hydrophilic residues are crucial for ribosomal protein L11 (RPL11) interaction with zinc finger domain of MDM2 and p53 protein activation. *J Biol Chem* *286*, 38264-38274.

Zinn, A. R., Alagappan, R. K., Brown, L. G., Wool, I., and Page, D. C. (1994). Structure and function of ribosomal protein S4 genes on the human and mouse sex chromosomes. *Mol Cell Biol* *14*, 2485-2492.

RÉSUMÉ

L'oncogène *v-erbA* transforme les progéniteurs érythrocytaires primaires aviaires (T2EC) en bloquant leur engagement d'un programme d'auto-renouvellement vers un programme de différenciation. Une comparaison transcriptomique de T2EC exprimant soit *v-erbA*, soit une forme non transformante de *v-erbA* a été réalisée par SAGE et RT-qPCR. Seuls quelques uns, mais pas tous les messagers codant les protéines ribosomiques sont réprimés. Ces résultats suggèrent que *v-erbA* pourrait moduler la composition des ribosomes et/ou moduler les fonctions extra-ribosomiques de protéines ribosomiques spécifiques. Ainsi, nous avons décidé d'analyser le taux des protéines ribosomiques associées aux ribosomes par 2D-DIGE à partir des ribosomes purifiés. L'analyse statistique effectuée sur 4 expériences indépendantes avec des marquages inversées a montré de manière significative que le taux de RPL11 est inférieur dans les T2EC exprimant *v-erbA* comparé à ceux exprimant la forme non transformante de *v-erbA*. Ces données indiquent l'existence de ribosomes dépourvus de RPL11 dans les T2EC sous l'effet de *v-erbA*. Les résultats des expériences d'immunoprécipitation ont conforté cette hypothèse. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent l'implication des protéines ribosomiques, et spécialement celle de RPL11, dans les processus de transformation induite par l'oncogène *v-erbA*, à la fois au niveau de la traduction, et probablement par sa fonction extra-ribosomique. L'analyse de la fonction biologique de RPL11 a montré qu'une sur-expression de *RPL11* dans les T2EC retarderait la prolifération cellulaire.

MOTS-CLÉS

Progéniteurs érythrocytaires aviaires, Oncogène *v-erbA*, Protéines ribosomiques, RPL11, Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis, Composition des ribosomes

Implication of ribosomal proteins in transformation process induced by *v-erbA* oncogene

SUMMARY

The *v-erbA* oncogene transforms chicken erythroid progenitors by blocking their differentiation and preventing them to exit a state of self-renewal. The transcriptome of primary avian erythroid progenitors cells (T2EC) expressing either *v-erbA* or a non-transforming form of *v-erbA* were compared by SAGE. Only some, but not all, mRNAs encoding ribosomal proteins were shown to be affected. These results suggest that *v-erbA* could modulate the composition of ribosomes and/or modulate the extraribosomal functions of specific ribosomal proteins. We therefore decided to analyze the level of ribosomal proteins associated to ribosomes by 2D-DIGE performed on purified ribosomes. A statistical analysis performed on 4 independent flip-flop experiments demonstrated that the level of RPL11 is significantly lower in T2EC expressing *v-erbA* as compared to the non-transforming form of *v-erbA*. These data suggest the presence of ribosomes without RPL11 in T2EC expressing *v-erbA*. Results obtained from immunoprecipitation experiments were strengthened this hypothesis. The set of these data evoke the involvement of ribosomal proteins, and specially RPL11, in the *v-erbA* transformation process both at the translational level and possibly in its extra-ribosomal function. Overexpression of *RPL11* in T2EC showed a decrease of cell proliferation.

KEYWORDS

Chicken erythrocytic progenitors, *v-erbA* oncogene, ribosomal proteins, RPL11, Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis, Ribosomal composition

DISCIPLINE

Biologie Cellulaire et Moléculaire

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires (CGφMC). CNRS - UMR 5534
Université Claude Bernard Lyon 1 - Bâtiment Grégor MENDEL - 16 rue Raphaël DUBOIS -
69622 Villeurbanne CEDEX - FRANCE

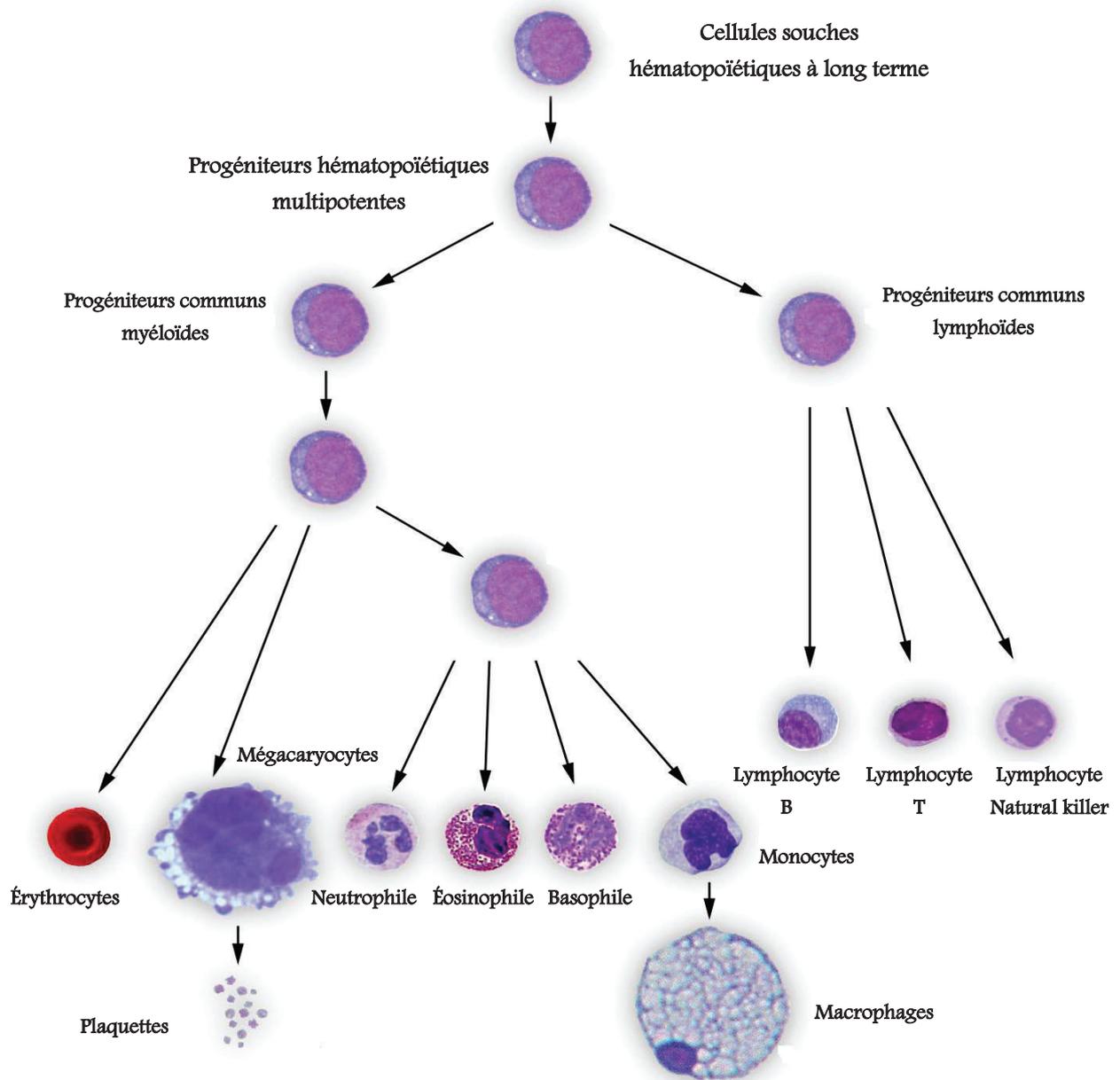
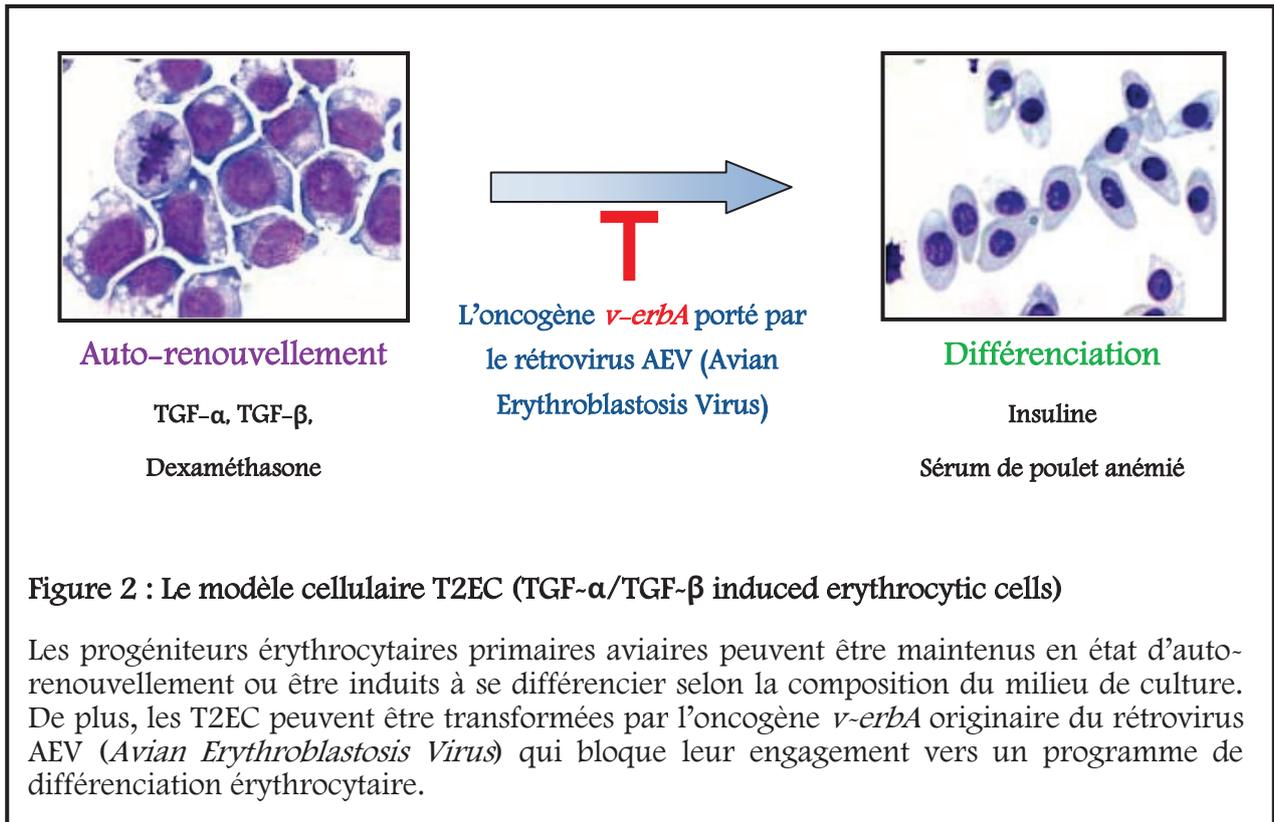
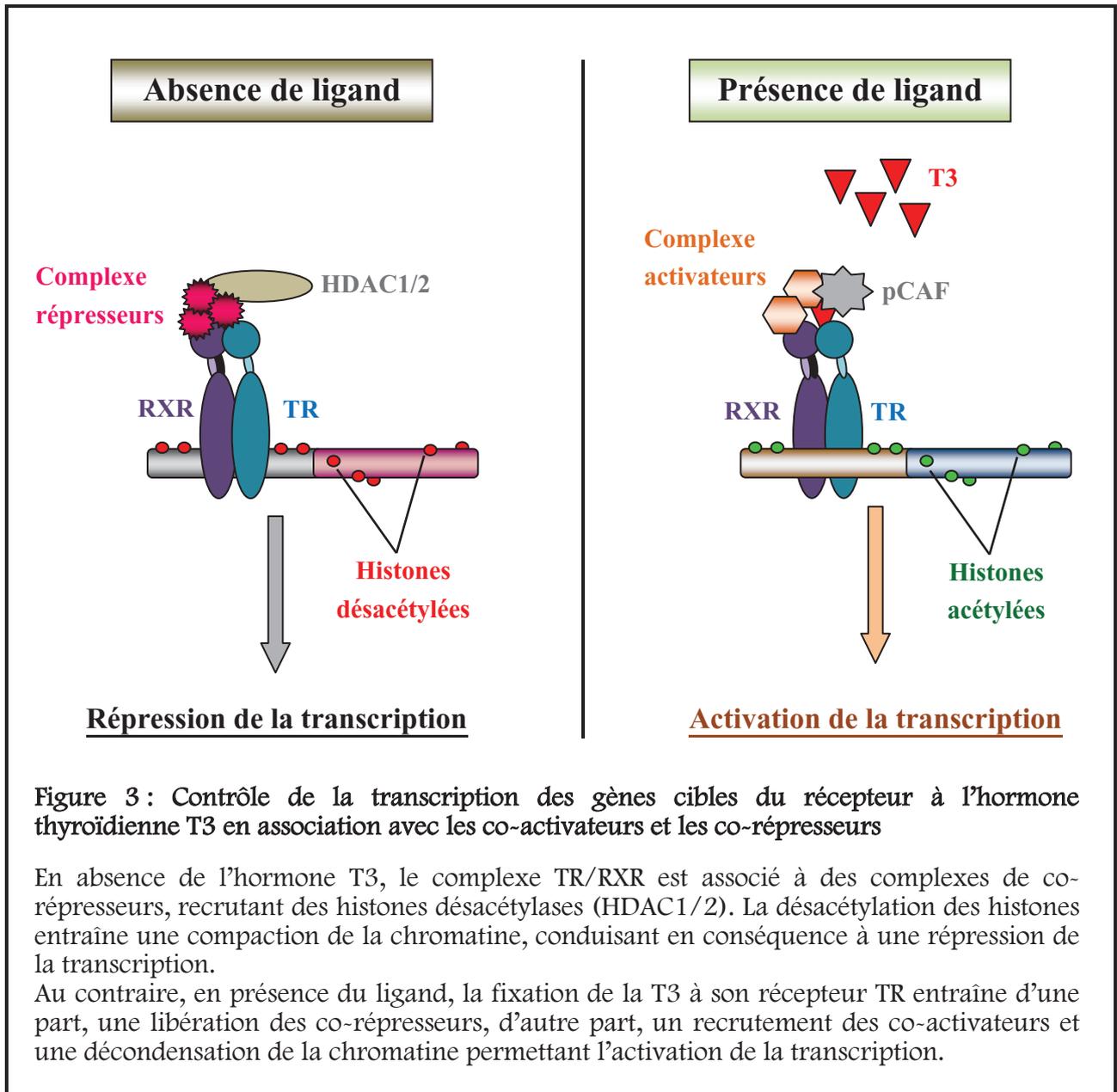


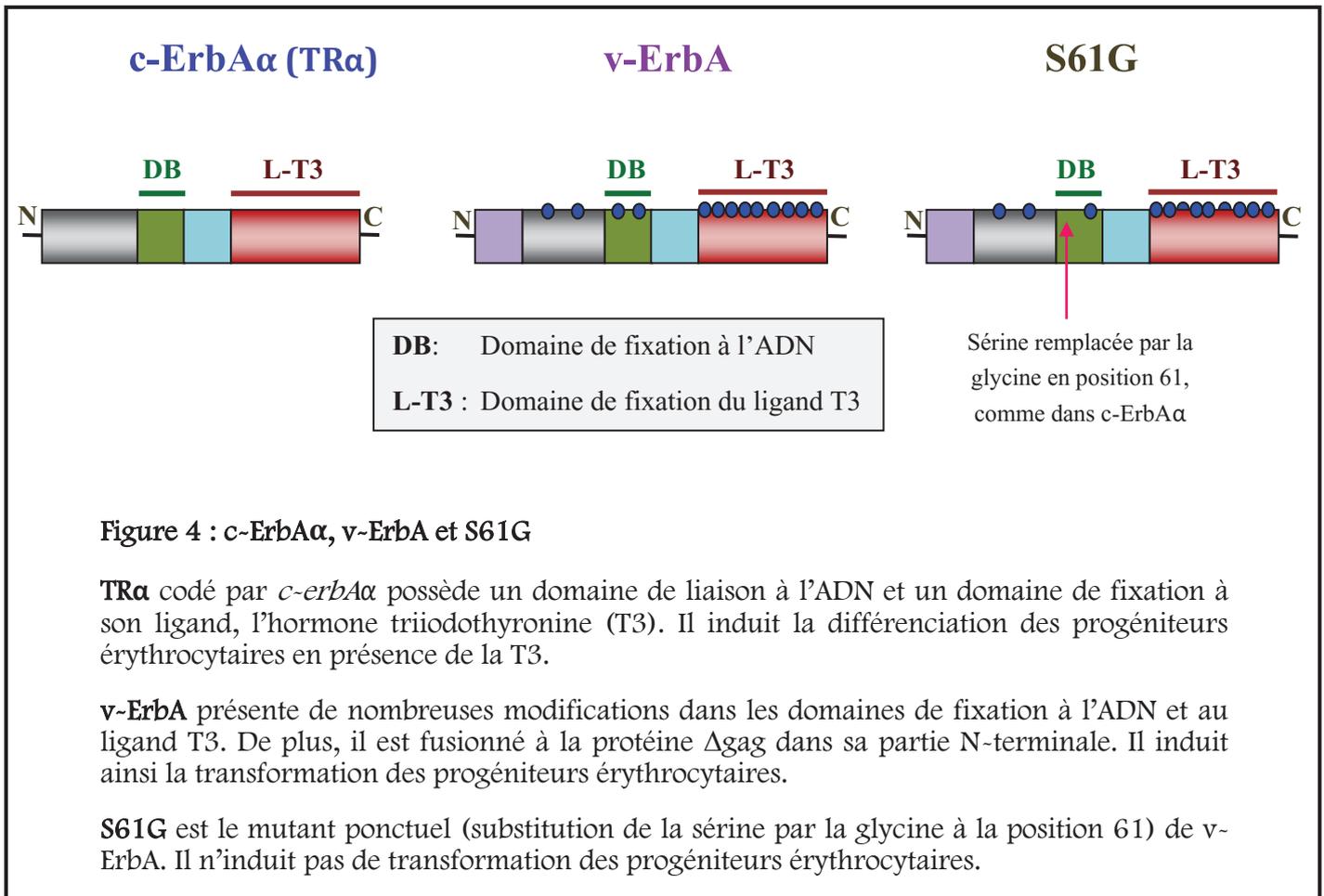
Figure 1 : L'hématopoïèse

L'hématopoïèse désigne l'ensemble des mécanismes qui assure le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines. Les cellules souches hématopoïétiques à long terme peuvent s'auto-renouveler tout au long de la vie d'un individu et donner naissance à des progéniteurs hématopoïétiques multipotentes. Ces derniers se différencient en deux grands catégories : les progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes. Schéma modifié et simplifié à partir de celui de William Lensch, Daley Laboratory (HHMI/Children's Hospital Boston/Harvard Medical School).

Site web : <http://daley.med.harvard.edu/assets/Willy/willy.htm>







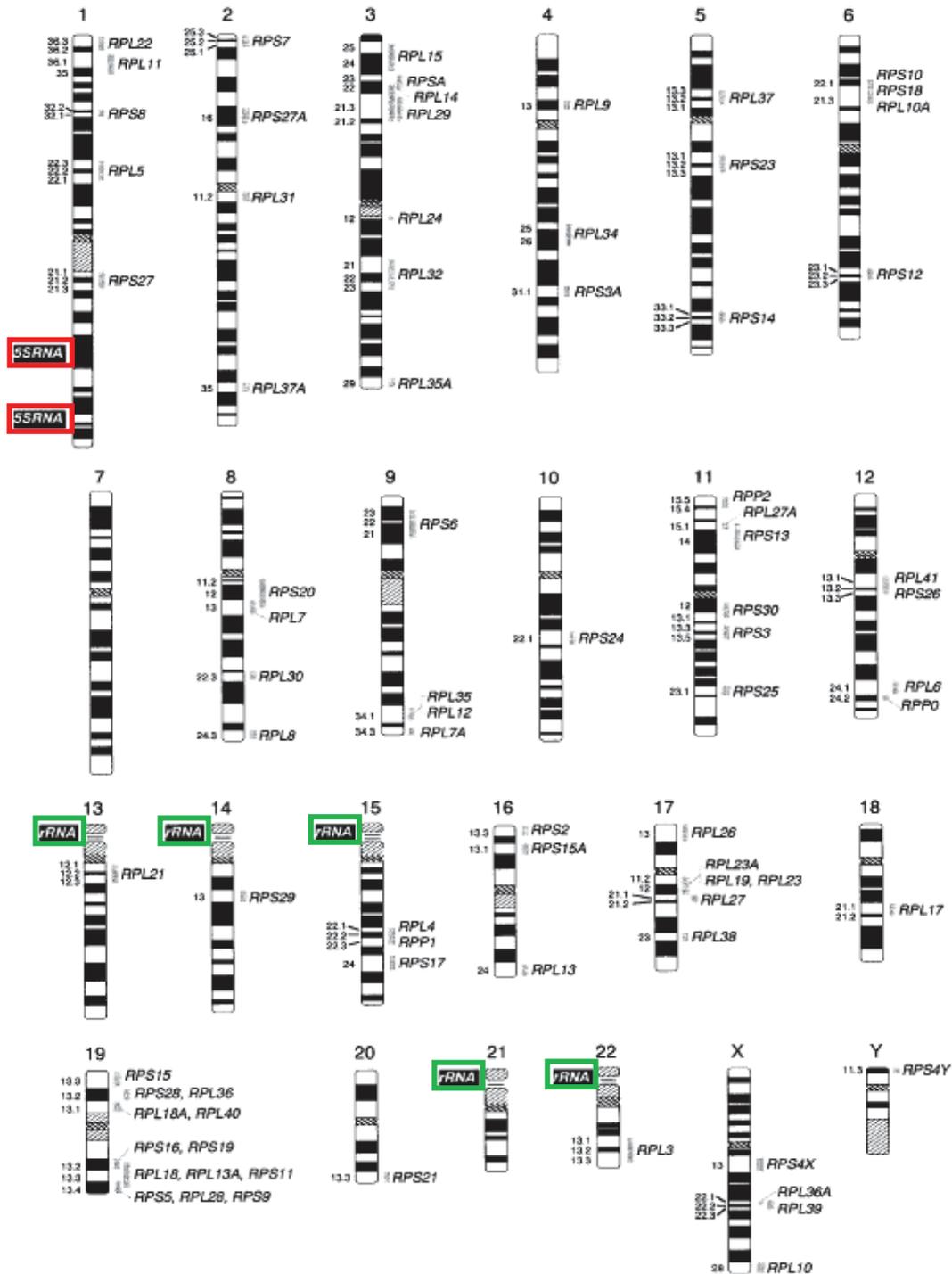


Figure 5 : Cartographie des gènes codant les ARNr et les r-protéines composant le ribosome humain

Schéma extrait et modifié de l'article «A complete map of the human ribosomal protein genes : assignment of 80 genes to cytogenetic map and implications for human disorders», Uechi *et al*, Genomics (2001), 72: 223-230. Cartographie cytogénétique des gènes codant les constituants du ribosome humain. Les 80 gènes de r-protéines sont assignés à des bandes cytogénétiques. Les positions des clusters de gènes codant les ARNr 4S et 5S sont indiqués par des rectangles verts et rouges respectivement.

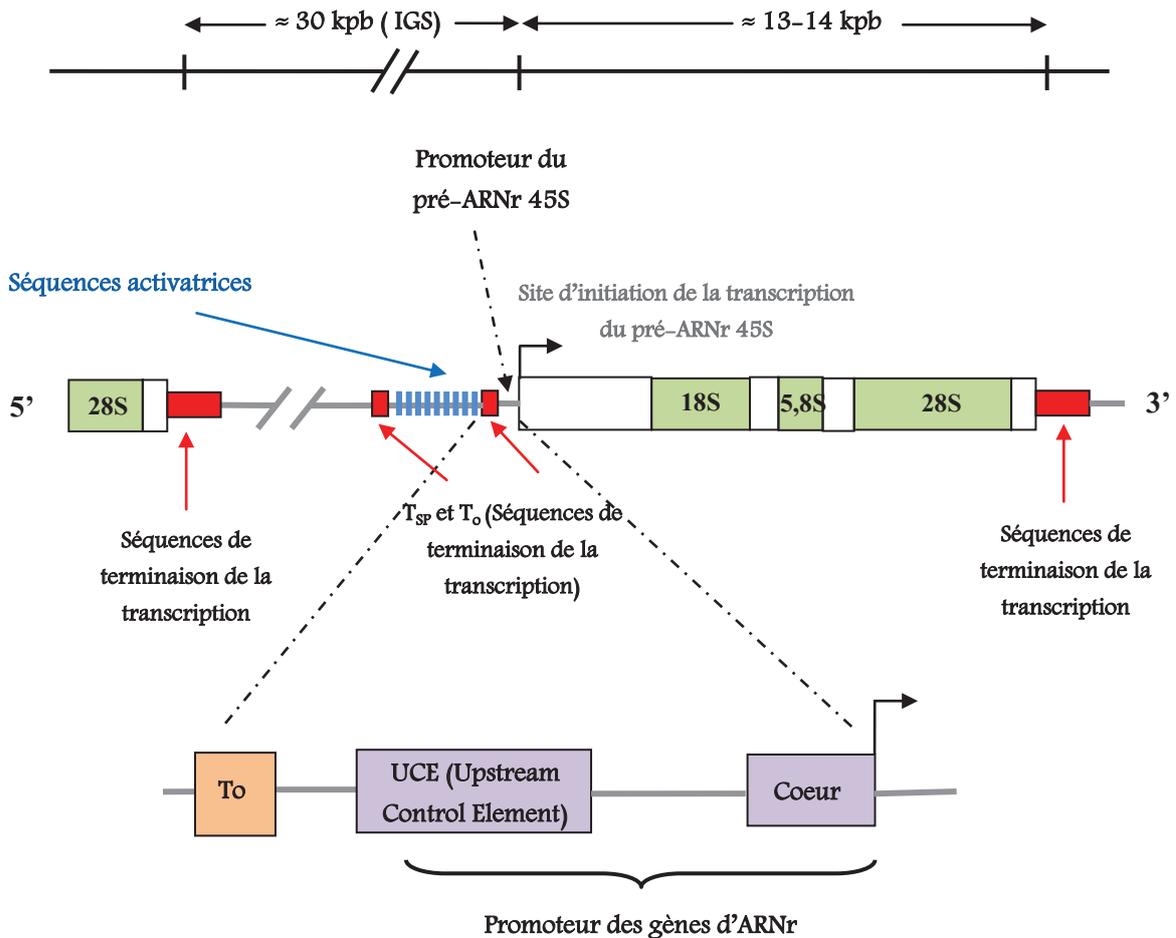


Figure 6 : Organisation structurale du gène codant le pré-ARNr 45S chez la souris

(Schéma simplifié et inspiré de l'article «*The Epigenetics of rRNA Genes : From Molecular to Chromosome Biology*», Brian McStay & Ingrid Grummt, Annu. Rev. Cell Dev. Biol, 2008. 24 :131-57).

Le site de l'initiation de la transcription du pré-ARNr 45S est indiqué par la flèche noire. Les séquences de terminaison de la transcription (en rouge) se trouvent en aval et en amont de la séquence codant le pré-ARNr 45S. Les séquences activatrices se trouvent entre les séquences T_{SP} et T_O. L'élément de contrôle (UCE) et le cœur du promoteur se localisent entre la séquence T_O et le site d'initiation de la transcription du pré-ARNr 45S.

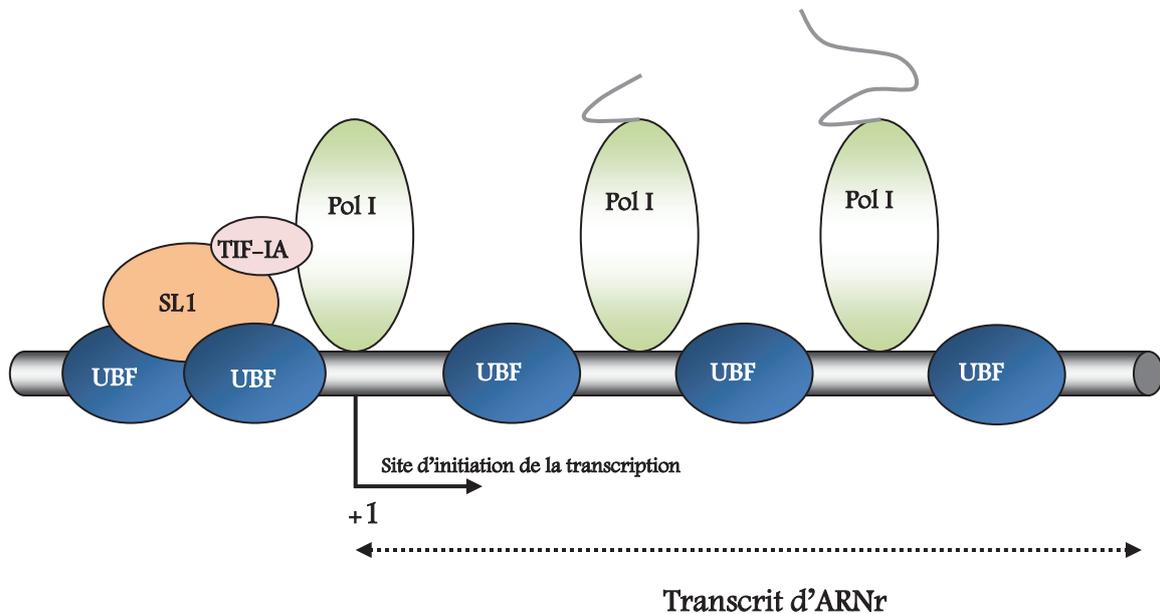


Figure 7: Formation du complexe de pré-initiation de la transcription des gènes d'ARNr 45S

Schéma extrait et modifié «RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer», R. J. White, Trends Genet. 2008 ;24(12) : 622-9.

Le complexe de pré-initiation de la transcription qui se fixe sur la région promotrice des gènes d'ARNr est composé d'un homodimère de facteurs UBF, du complexe SL1, constitué des facteurs TBP et TAFs, du facteur TIF-IA, et de l'ARN Polymérase I. L'interaction de TIF-IA, facteur s'associant avec la sous-unité β I de la Pol I, avec le complexe SL1 conduit au recrutement de la Pol I sur la région promotrice des gènes d'ARNr. Le facteur UBF contrôle la transcription dépendante de la Pol I à différents niveaux : formation du complexe d'initiation et régulation de l'étape d'élongation de la transcription.

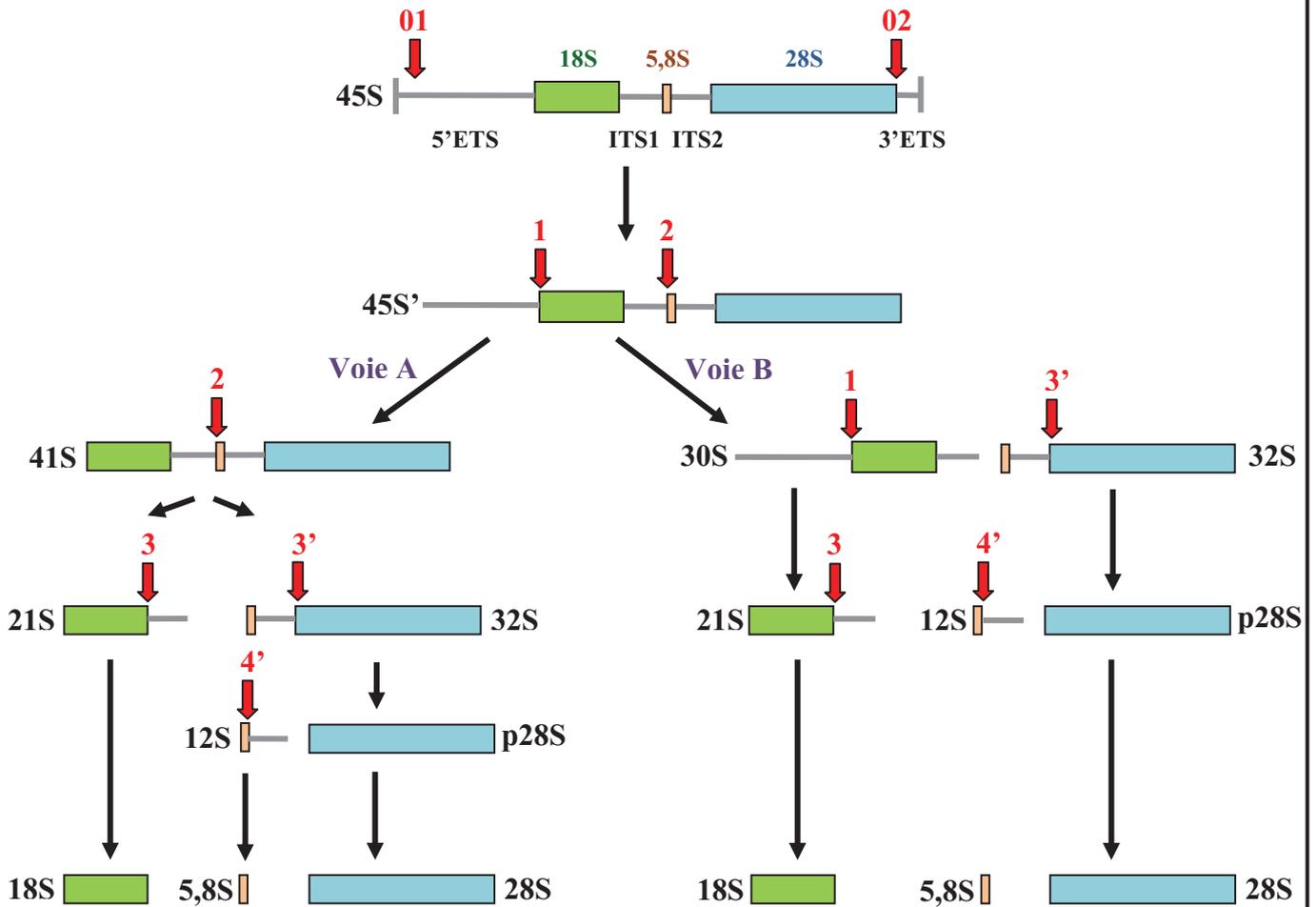


Figure 8 : Clivage du pré-ARNr 45S dans les cellules humaines (HeLa) pour former les trois ARNr 28S, 18S et 5,8S

Schéma extrait et modifié selon l'article de Hadjiolova *et al*, « Alternative pré-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis », Eur. J. Biochem. 212, 211-215 (1993). Deux voies de clivages du pré-ARNr 45S, faisant participer de nombreuses endo- et exonucléases, sont possibles pour former les ARNr 28S, 18S et 5,8S. Les flèches en rouge représentent les sites de clivage au cours de la maturation des ARNr.

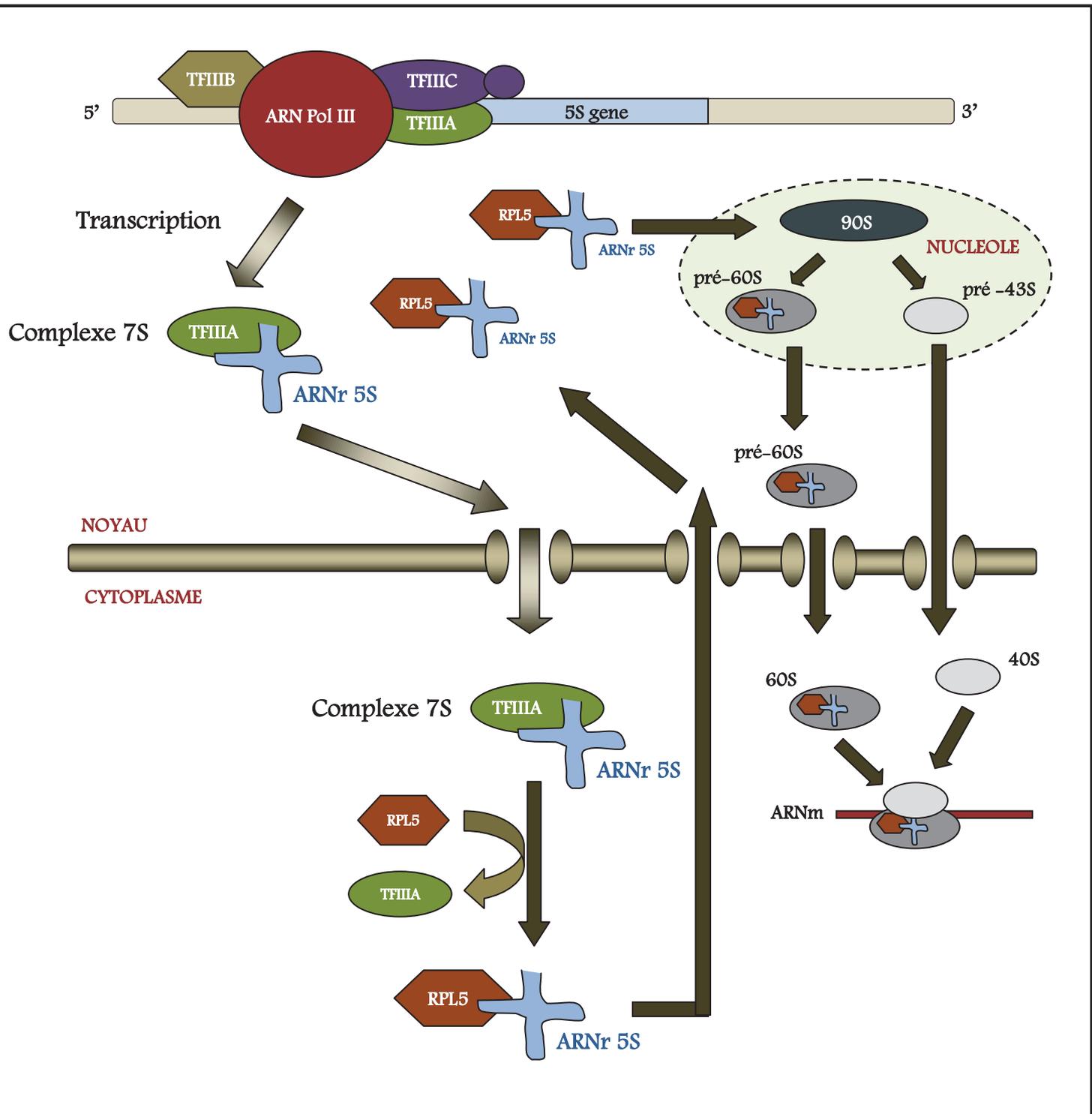


Figure 9 : Transcription et maturation de l'ARNr 5S

Schéma inspiré des articles « Spatial organization of transcription by RNA polymerase III », Rebecca. A *et al*, Nucleic Acids Research, 2006, et « Eukaryotic 5S rRNA biogenesis », Ciganda. M & Williams. N, Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. Le gène de l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN Polymérase III. Le transcrit ARNr 5S, lié au facteur TFIIIA, est exporté du noyau vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, le facteur TFIIIA est remplacé par la protéine ribosomique L5, et le complexe ARNr 5S - RPL5 se localise à nouveau dans le noyau. Une partie de ce complexe se dirige vers le nucléole pour participer à la biogenèse des ribosomes et l'autre partie, ne s'associant pas aux ribosomes, forme un complexe de stockage en cas de besoin.

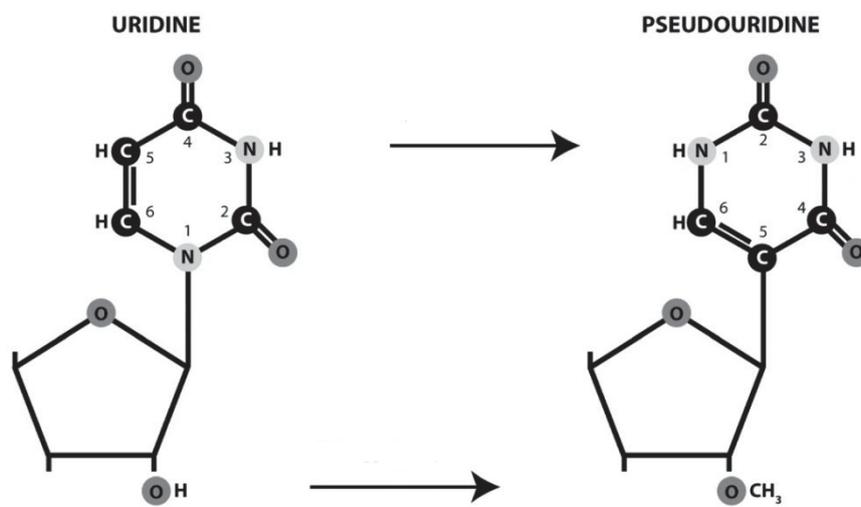


Figure 10 : Pseudo-uridylation et 2'-O-méthylations des pré-ARNr

Schéma extrait et modifié de l'article « The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis », Henras *et al*, Cellular and Molecular Life Sciences. 65(2008) 2334-2359. Les pseudo-uridylation et 2'-O-méthylations des pré-ARNr sont guidées par des snoRNA à boîtes C/D et H/ACA.

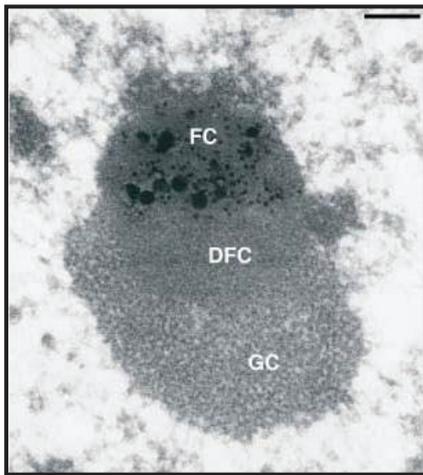


Figure 11 : La structure du nucléole

(Image extraite de l'article « The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism », Hernandez-Verdun *et al*, Advances Review, 2010). La biogenèse des ribosomes se déroule dans le nucléole. Le nucléole est une structure nucléaire proéminente, visible en microscopie et composée de trois régions distinctes : le centre fibrillaire (FC), la zone fibrillaire dense (DFC) et la zone granulaire (GC).

Grande sous-unité
ribosomique 60S

Petite sous-unité
ribosomique 40S

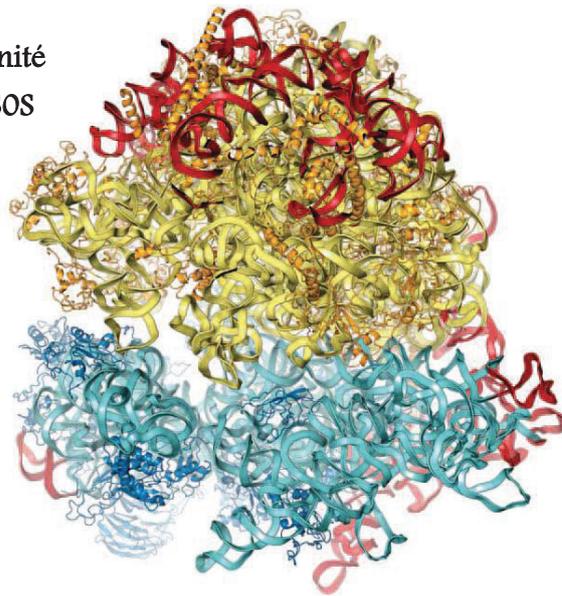


Figure 12 : Structure cristallographique au rayon X du ribosome eucaryote 80S (*S. cerevisiae*)

Schéma extrait et modifié de l'article « Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome », A. Ben-Shem *et al*, Science. 330, 1203 (2010). Le ribosome eucaryote 80S est constitué de deux sous-unités ribosomiques : 60S et 40S.

La grande sous-unité ribosomique 60S est composée de 3 ARNr : 5S, 5.8S et 28S (en jaune clair) et de 48 r-protéines (en jaune foncé).

La petite sous-unité ribosomique 40S est composée d'un ARNr : 18S (en bleu clair) et de 33 r-protéines (en bleu foncé).

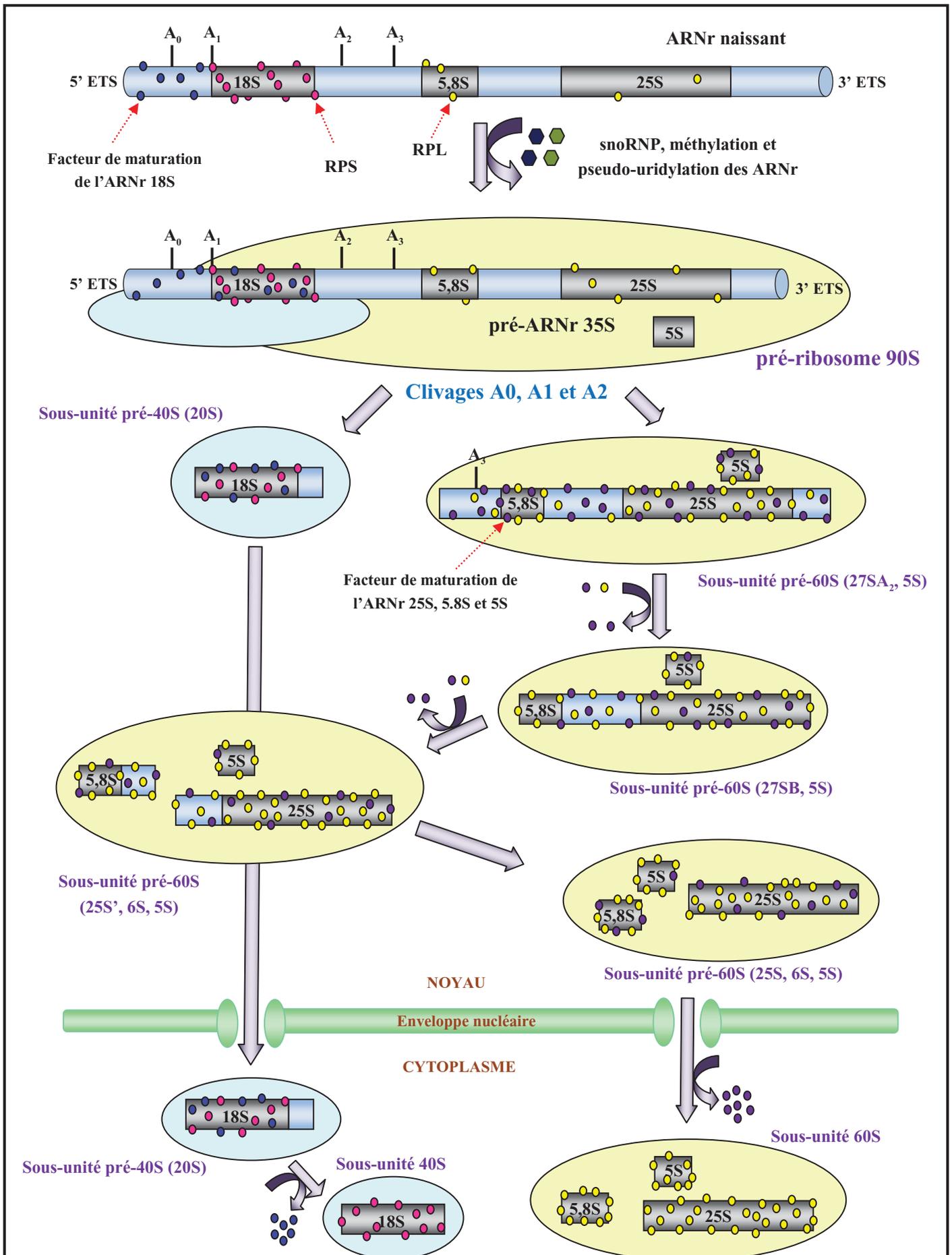


Figure 13: Biogenèse des ribosomes chez *S. cerevisiae*

Schéma inspiré et simplifié de l'article M. Fromont-Racine *et al.* Gene 313 (2003) 17-42. Les différentes étapes de maturation des deux sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme.

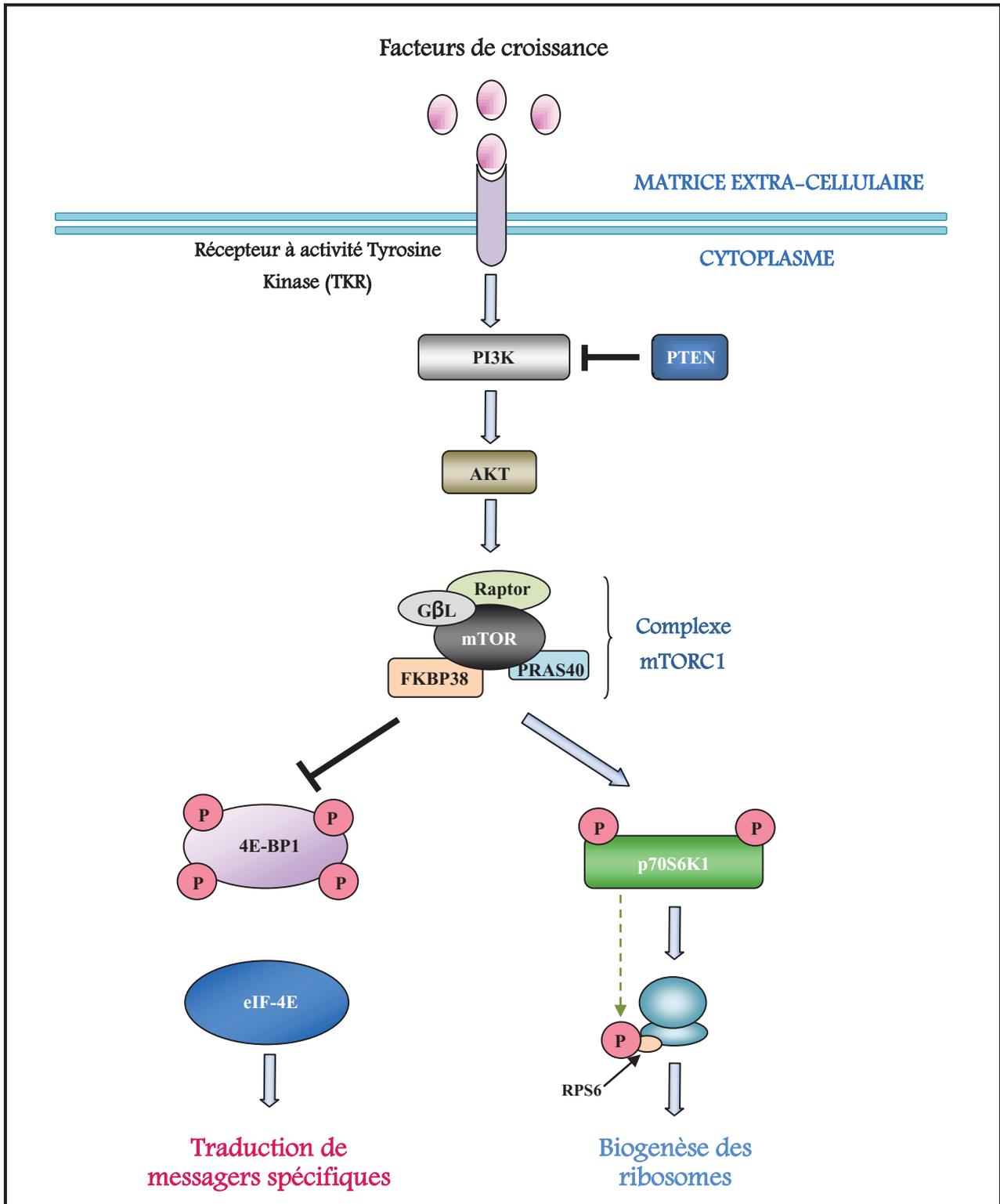


Figure 14 : La voie de signalisation mTORC1

Suite à la présence de facteurs de croissance dans la matrice extra-cellulaire, la cascade de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTORC1 est activée : PI3K phosphoryle son substrat AKT qui à son tour phosphoryle mTOR, un des facteurs du complexe mTORC1. Le complexe mTORC1 activé, inhibe d'une part la protéine 4E-BP1, conduisant ainsi à la libération du facteur de traduction eIF-4E et à la traduction de messagers spécifiques, contenant des régions 5'UTR particulières. D'autre part, mTORC1 phosphoryle la kinase p70S6K1, déclenchant ainsi la traduction des différents constituants du ribosomes.

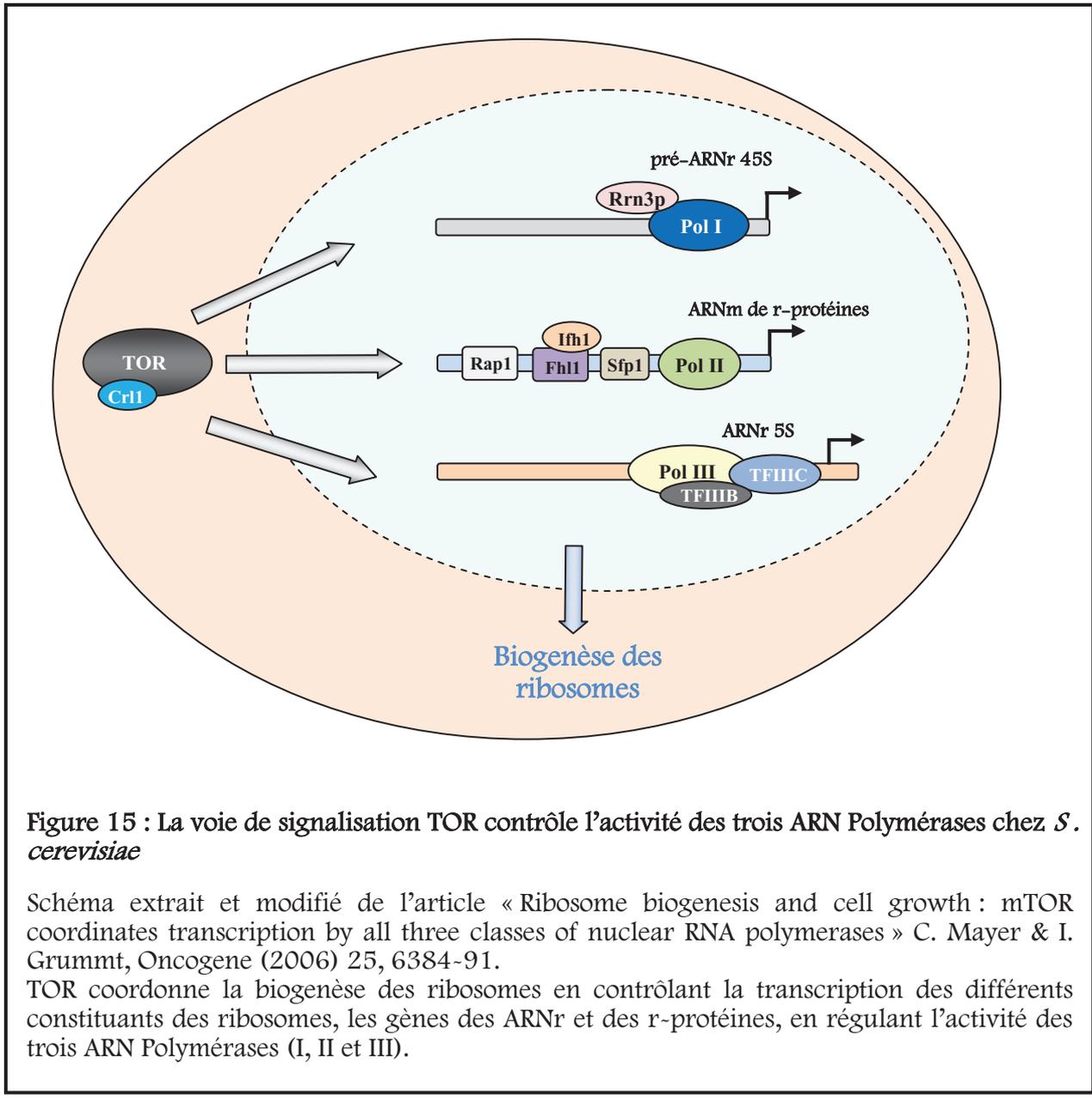


Figure 15 : La voie de signalisation TOR contrôle l'activité des trois ARN Polymérase chez *S. cerevisiae*

Schéma extrait et modifié de l'article « Ribosome biogenesis and cell growth : mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases » C. Mayer & I. Grummt, Oncogene (2006) 25, 6384-91.

TOR coordonne la biogenèse des ribosomes en contrôlant la transcription des différents constituants des ribosomes, les gènes des ARNr et des r-protéines, en régulant l'activité des trois ARN Polymérase (I, II et III).

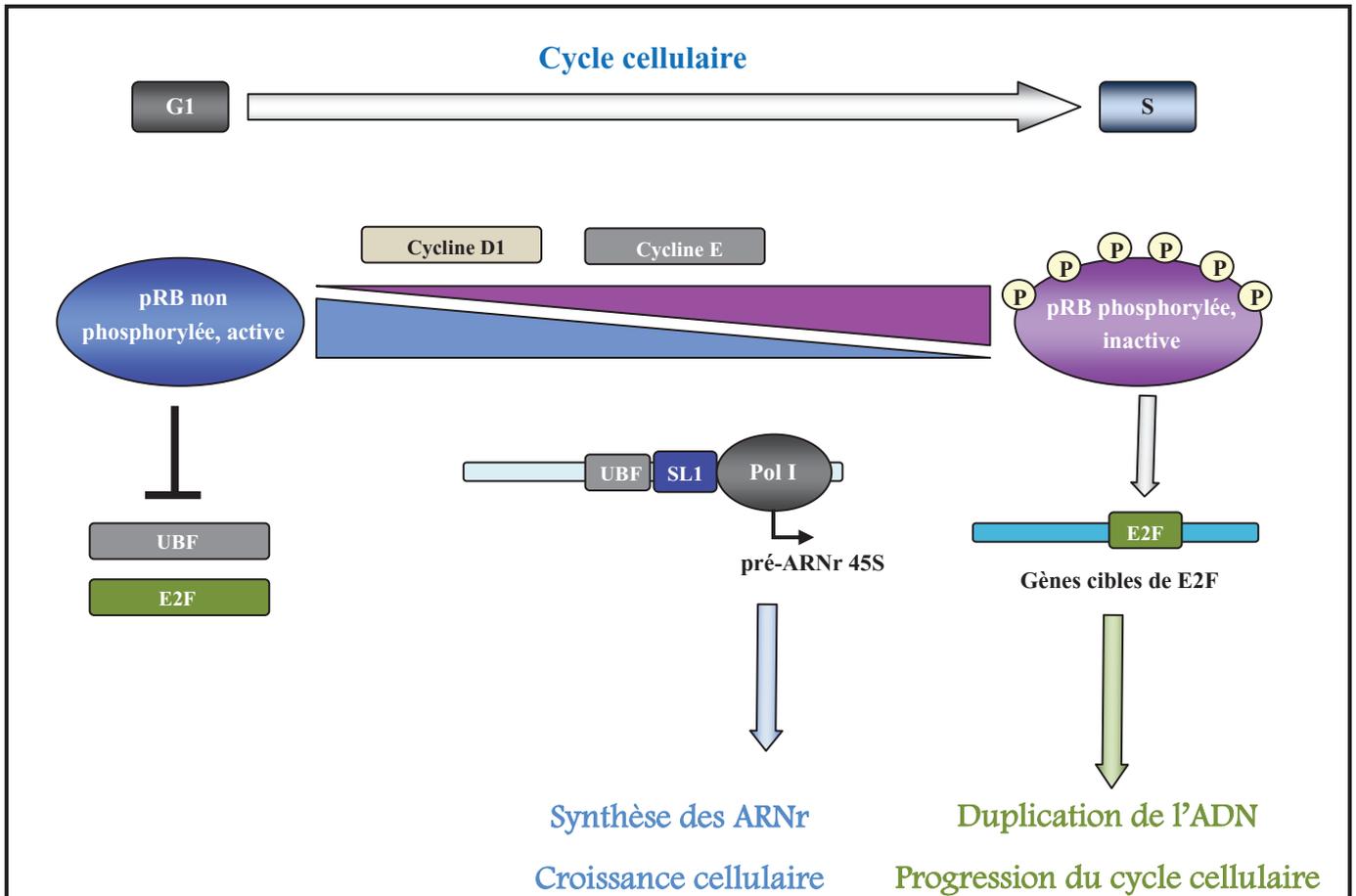


Figure 16 : Régulation de la progression du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire et de la biogenèse des ribosomes par la protéine RB

La protéine RB existe sous deux formes, une forme active non phosphorylée, et une forme inactive phosphorylée. La forme active de pRB séquestre les facteurs UBF et E2F dans les conditions physiologiques. Lorsque les cellules progressent dans le cycle cellulaire, la forme active de la protéine pRB subit progressivement une phosphorylation, conduisant à la libération des facteurs UBF et E2F. Ces deux facteurs vont pouvoir se fixer à leurs gènes cibles permettant d'une part la synthèse des ARNr 45S et d'autre part la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

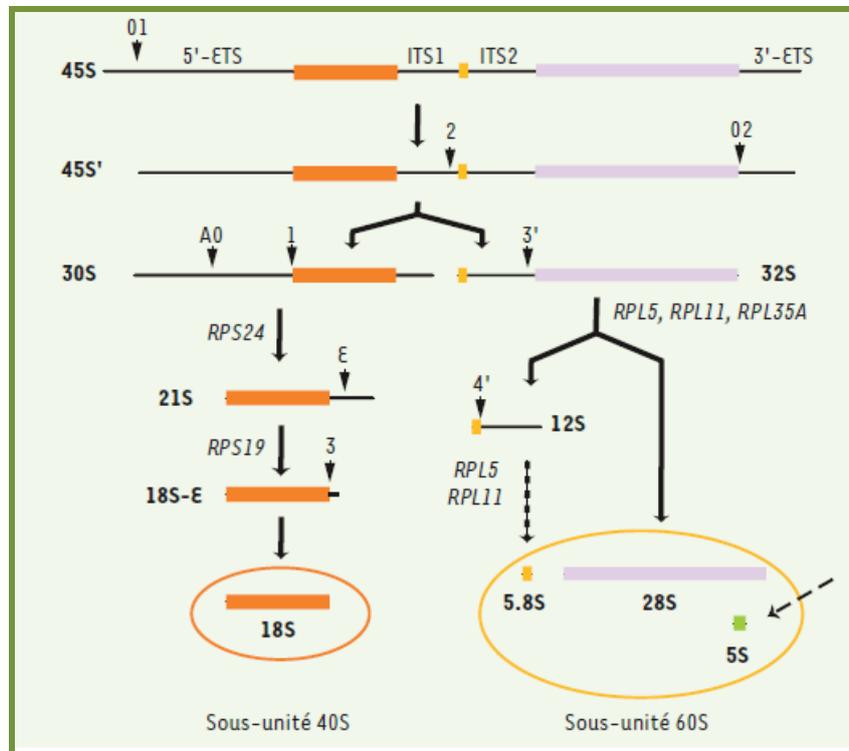


Figure 17 : Maturation du pré-ARN ribosomique chez l'être humain et les fonctions potentielles des r-protéines dans la DBA

Figure extrait de l'article « Anémie de Diamond-Blackfan : le côté obscur de la biogenèse des ribosomes », A. H. Aguisa-Touré *et al*, *Medecine/Sciences* 2009 ; 25 : 69-76.

La transcription des gènes ribosomiques par l'ARN polymérase I conduit à un précurseur pré-ARNr 45S contenant les ARNr 18S, 5,8S et 28S. Les têtes de flèche indiquent les sites des clivages qui amènent progressivement à l'élimination des espaceurs transcrits externes (ETS) et internes (ITS). Le clivage de l'ITS1 au site 2 du pré-ARNr 45S conduit à la formation de deux pré-ARNr 30S et 32S. L'ARN 5S est synthétisé indépendamment par l'ARN polymérase III. Les noms des protéines ribosomiques indiquent les étapes dans lesquelles ces protéines sont requises.

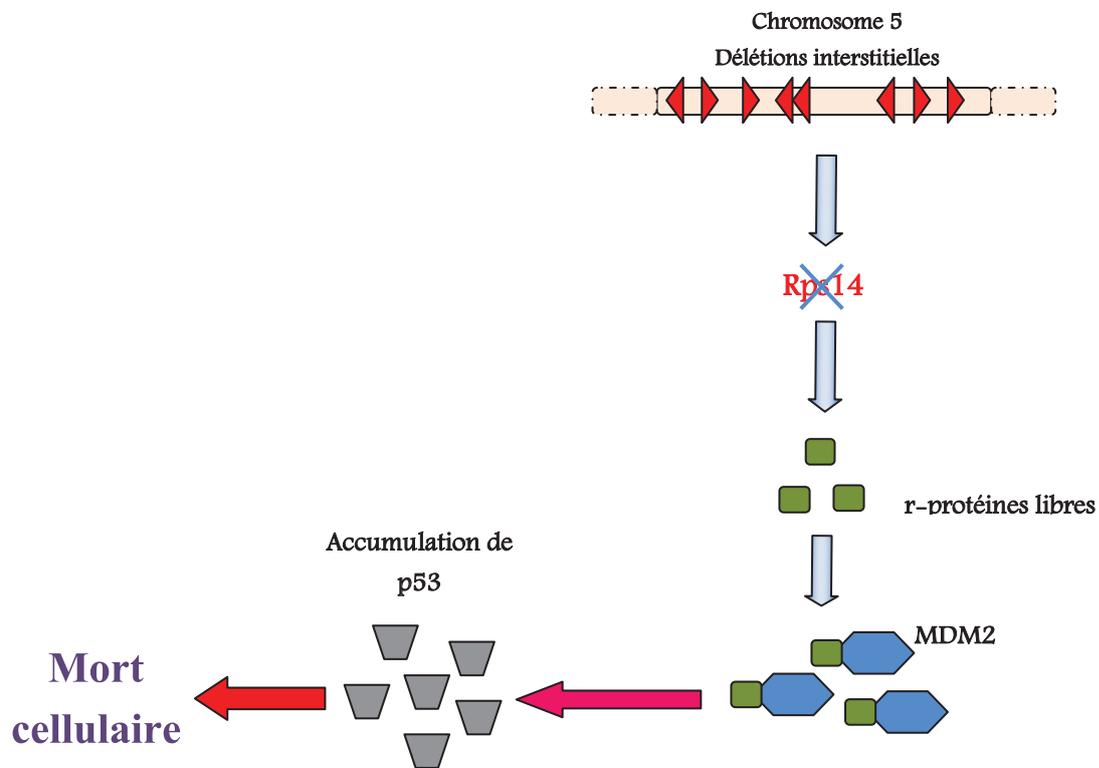
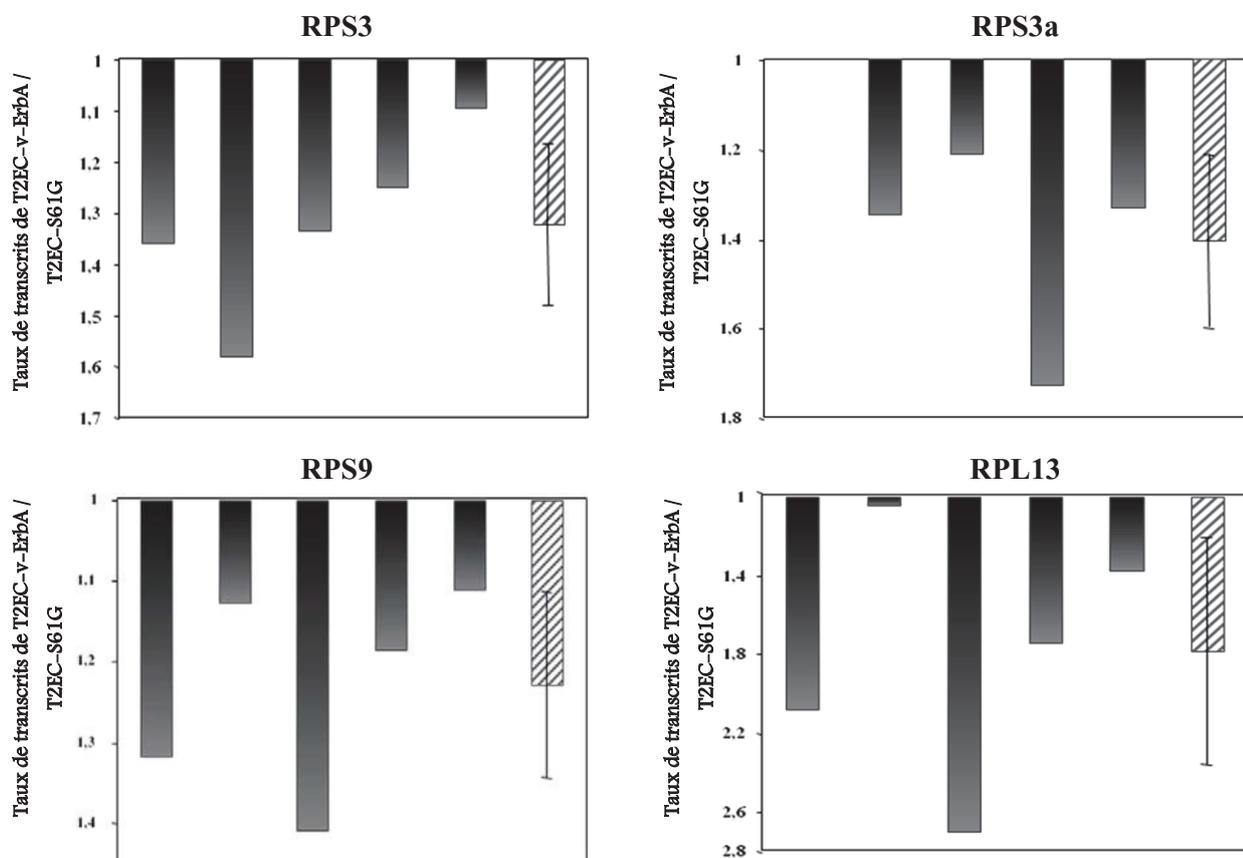


Figure 18 : Un modèle des mécanismes dépendants de p53 dans le syndrome de 5q-

Figure extrait et simplifié de l'article « New insights into 5q- syndrome as a ribosomopathy » J. L. Barlow *et al.* Cell Cycle 9 :21, 4286-4293 ; Nov 1, 2010.

L'haploinsuffisance de *RPS14* pourrait conduire à une mort cellulaire dans le syndrome 5q- en induisant l'augmentation du taux et de l'activité de p53 *via* l'inhibition d'ubiquitinylation de MDM2 par différentes protéines ribosomiques (de la grande et de la petite sous-unités) non associées aux ribosomes.

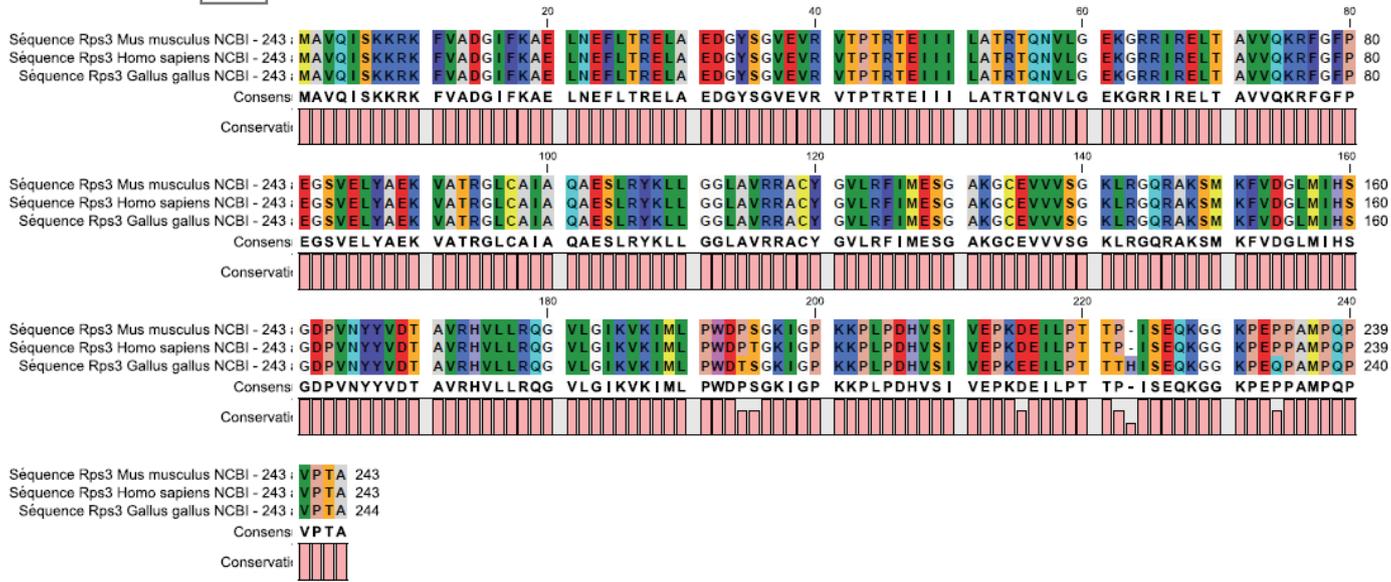


Bresson *et al*, BMC Genomics, 2007(8); 390

Figure 19 : Analyse du taux d'ARNm de *RPS3*, *RPS3a*, *RPS9* et *RPL13* par PCR en temps réel

Graphes extraits de l'article « Large-scale analysis by SAGE reveals new mechanisms of *v-erbA* oncogene action » C. Bresson *et al*, BMC Genomics, 2007(8) : 390. Analyse du taux des gènes identifiés par SAGE, *RPS3*, *RPS3a*, *RPS9* et *RPL13* en RT-qPCR. Les ARN totaux ont été extraits des T2EC exprimant soit *v-erbA*, soit *S61G*, le mutant ponctuel non transformant de *v-erbA*. Une rétro-transcription et une analyse par PCR quantitative ont été réalisées pour quantifier le taux des transcrits de ces 4 gènes. Chaque graphe représente le taux de transcrits du gène d'intérêt dans les T2EC exprimant *v-erbA* par rapport à des T2EC exprimant *S61G*. Les histogrammes en gris dégradé représentent des expériences indépendantes, dont les valeurs sont normalisées en utilisant trois gènes de référence : *T-Complex 1*, *hnRNP* et *ATP synthase subunit beta 1*. Le dernier histogramme de chaque graphe (gris hachuré) représente la valeur moyenne du rapport des 4 ou des 5 expériences indépendantes, selon les gènes analysés.

A



B

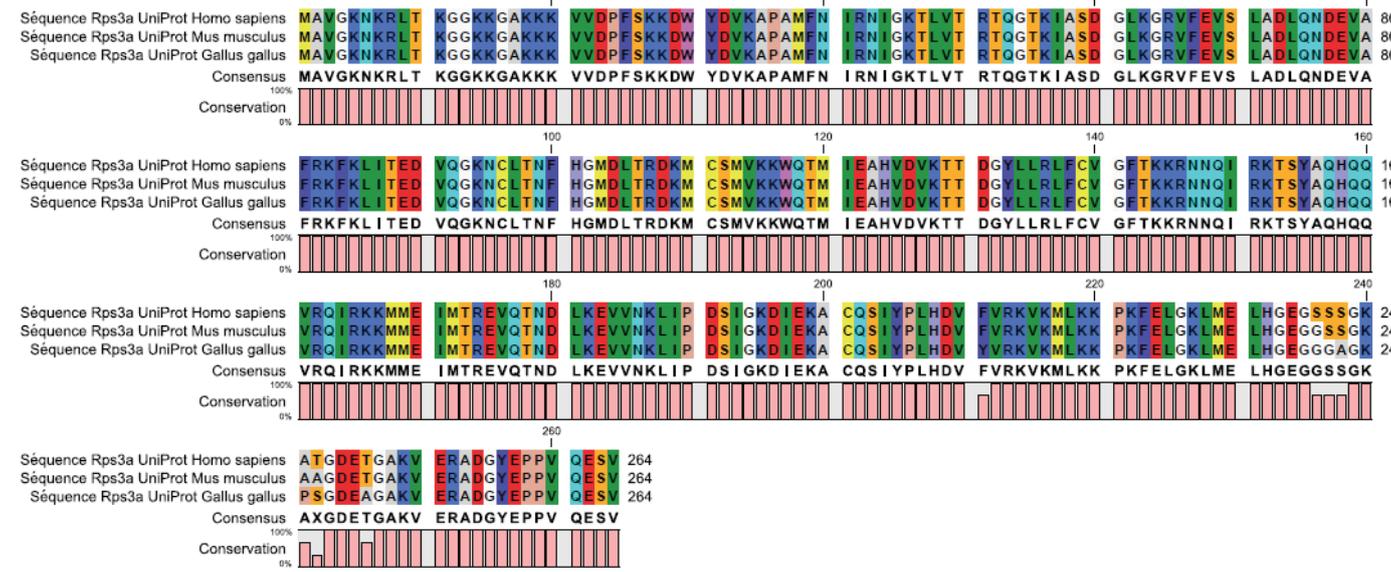


Figure 20 : Alignement des séquences des protéines ribosomiques S3 et S3a chez *Gallus gallus*, *Homo sapiens* et *Mus musculus*

A : Alignement des séquences de **RPS3** d'être humain, de souris et de poulet avec le logiciel CLC Sequence Viewer 6.4. Toutes les séquences proviennent de la base de données NCBI.
 B : Alignement des séquences de **RPS3a** d'être humain, de souris et de poulet avec le logiciel CLC Sequence Viewer 6.4. Toutes les séquences proviennent de la base de données UniProt.

N = 5 expériences indépendantes

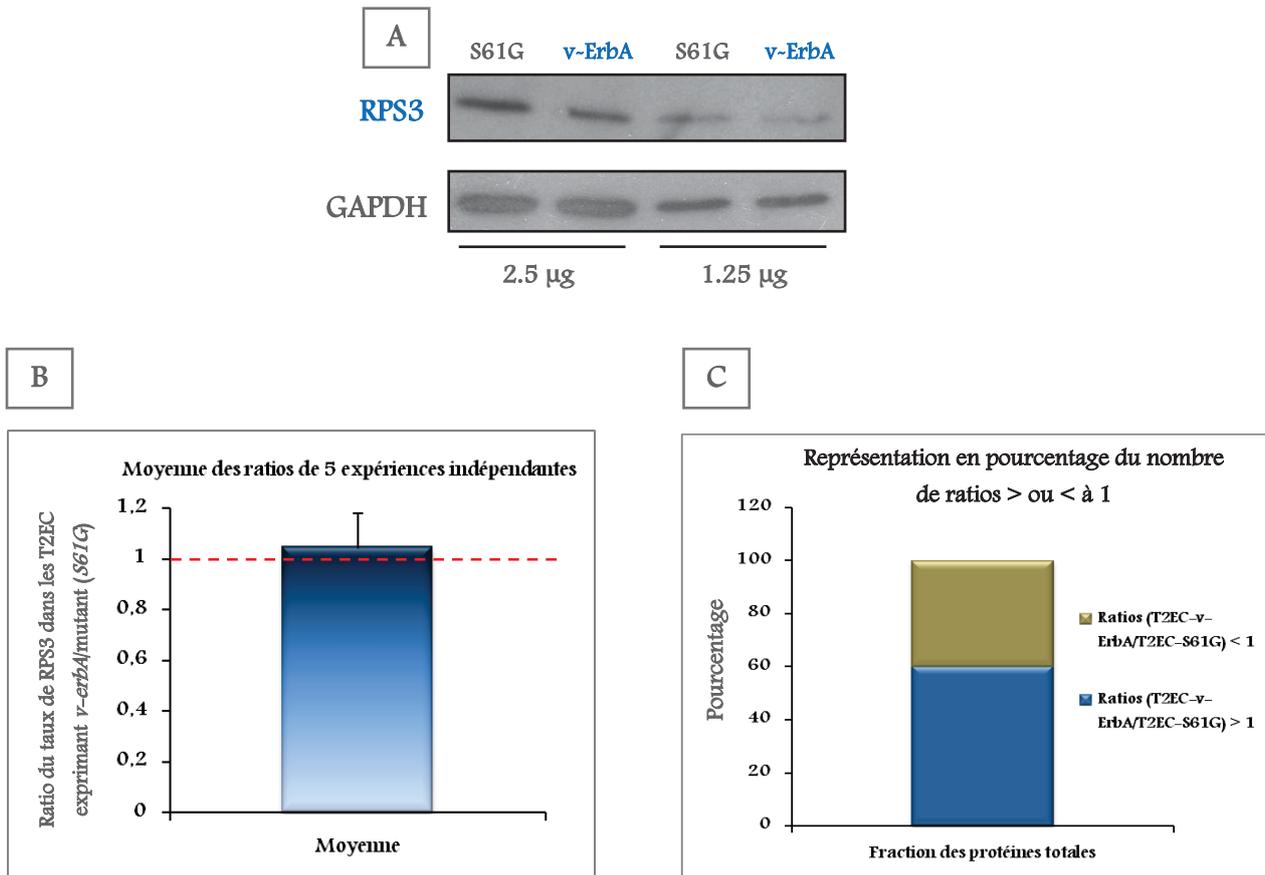


Figure 21 : Analyse du taux de la protéine ribosomique S3 dans la fraction des protéines totales

A : Les protéines totales ont été extraites à partir de T2EC exprimant *v-erbA* ou sa forme mutée, non transformante, *S61G*. Différentes quantités (2,5 µg et 1,25 µg) de protéines totales ont été analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines RPS3 et GAPDH. La protéine GAPDH sert de témoin de charge. Le résultat d'une seule expérience représentative de 5 expériences indépendantes est représenté ici.

B : Le ratio du taux de la protéine RPS3, normalisé par rapport à celui de GAPDH, dans les T2EC exprimant *v-erbA* par rapport à *S61G*, a été calculé pour 5 expériences indépendantes. Ici est représentée la moyenne des 5 ratios : la moyenne est de 1,05 avec une erreur standard de 0,133.

C : Représentation en pourcentages du nombre d'expériences montrant un ratio (T2EC-*v-erbA*/T2EC-*S61G*) du taux de la protéine RPS3 inférieur à 1 (en vert kaki : 40%) et supérieur à 1 (en bleu : 60%).

N = 6 expériences indépendantes

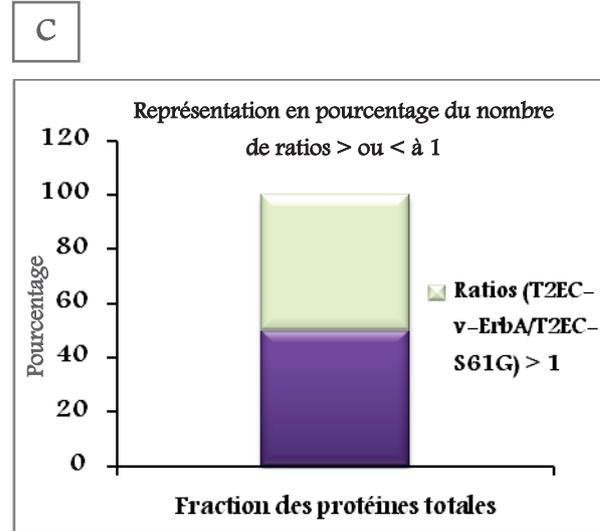
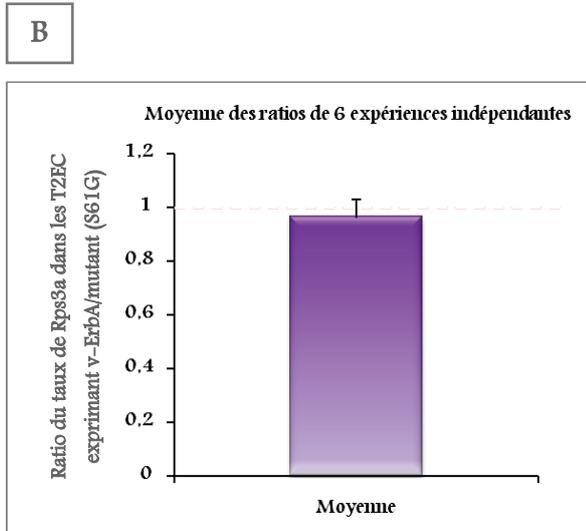
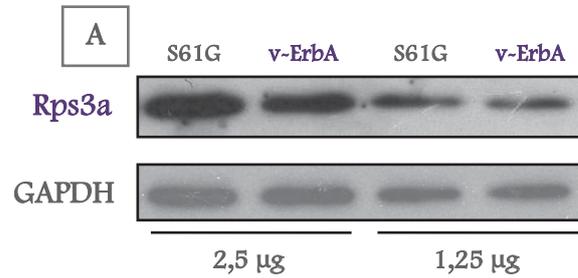


Figure 22 : Analyse du taux de la protéine ribosomique S3a dans la fraction des protéines totales

A : Les protéines totales ont été extraites à partir de T2EC exprimant *v-erbA* ou sa forme mutée, non transformante, *S61G*. Différentes quantités (2,5 µg et 1,25 µg) de protéines totales ont été analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines RPS3a et GAPDH. La protéine GAPDH sert de témoin de charge. Le résultat d'une seule expérience représentative de 6 expériences indépendantes est représenté ici.

B : Le ratio du taux de la protéine RPS3a, normalisé par rapport à celui de GAPDH, dans les T2EC exprimant *v-erbA* par rapport à *S61G*, a été calculé pour 6 expériences indépendantes. Ici est représentée la moyenne des 6 ratios : la moyenne est de 0,97 avec une erreur standard de 0,064.

C : Représentation en pourcentages du nombre d'expériences montrant un ratio (T2EC-*v-erbA*/T2EC-*S61G*) du taux de la protéine RPS3a inférieur à 1 (en violet : 50%) et supérieur à 1 (en vert clair : 50%).

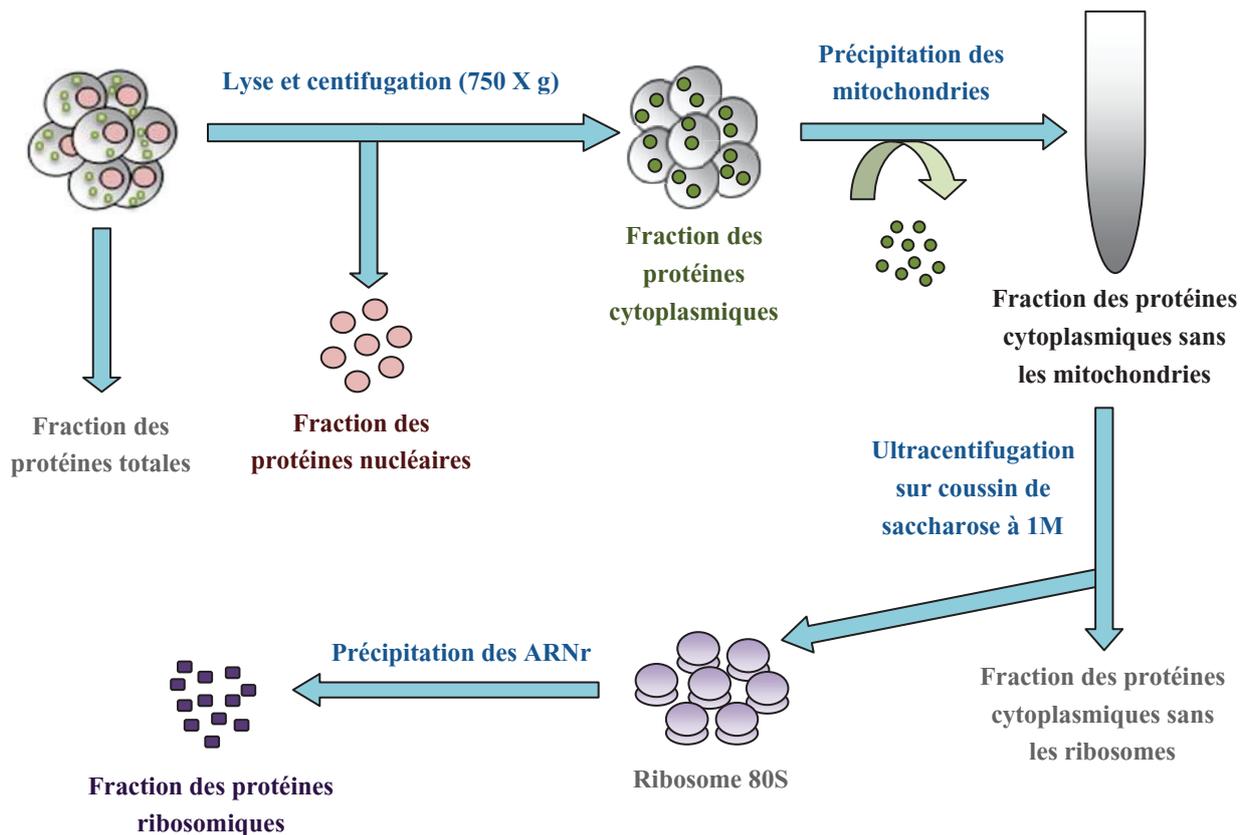
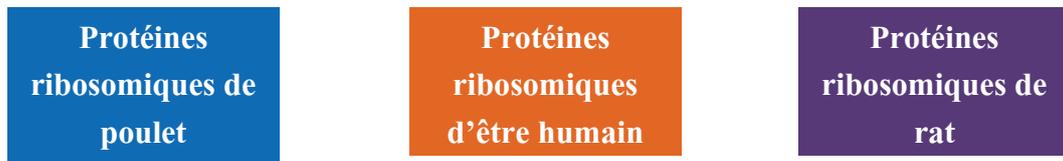


Figure 23 : Protocole de purification des ribosomes et d'extraction des r-protéines

Les cellules ont subi une lyse douce permettant la séparation des noyaux de la fraction cytoplasmique. Les mitochondries contenues dans le cytoplasme sont ensuite éliminées et la fraction cytoplasmique sans mitochondries est déposée sur un coussin de saccharose à 1 M. Une étape d'ultracentrifugation permet d'isoler les ribosomes. Les r-protéines contenus dans ces ribosomes sont ensuite extraites grâce à de l'acide acétique en présence de l'acétate de magnésium.



↓
 Marquage avec le Tag 1 Marquage avec le Tag 2 Marquage avec le Tag 3

← Trypsine →



Analyse des peptides par spectrométrie de masse

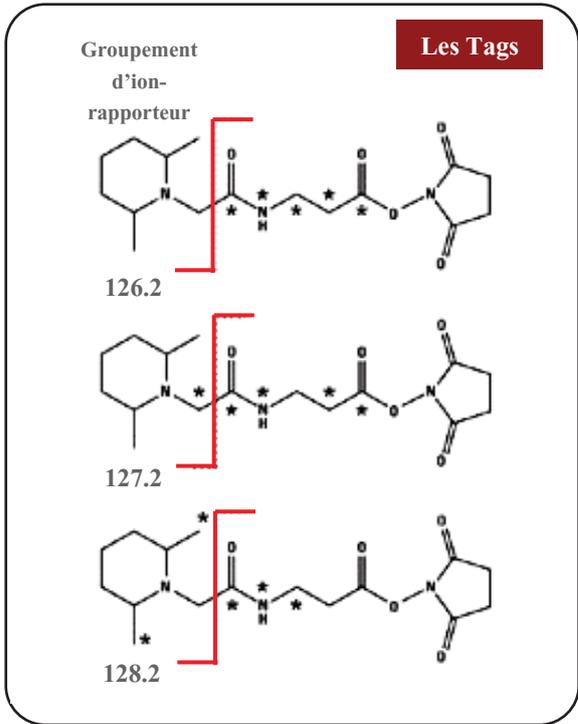
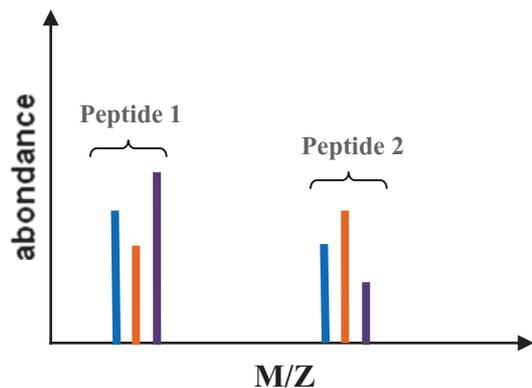


Figure 24 : Triplex Mass Tag

Les r-protéines provenant des trois espèces sont marquées avec des tags ayant des groupements d'ion-rapporteur avec une valeur m/z différente. Les r-protéines sont ensuite rassemblées et subissent un clivage par la trypsine. Ces peptides sont ensuite quantifiés et identifiés par spectrométrie de masse pour les trois espèces.

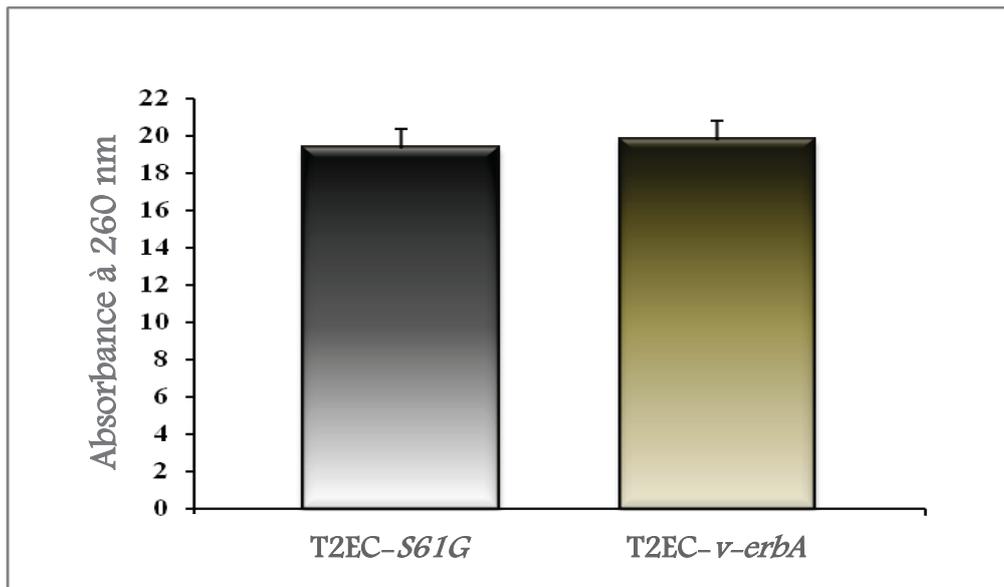


Figure 25 : Quantification des ribosomes provenant de T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G*

Les ribosomes ont été extraits de 10^8 T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G* sur coussin de saccharose. La concentration des ribosomes a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm avec un NanoDrop. Quatorze DO (densité optique) correspond à 1 mg de ribosomes. Les analyses statistiques, avec le test T de Student, réalisées sur 18 expériences indépendantes montrent une absence de différence de la quantité de ribosomes entre les deux conditions (p value : 0,6429). Le graphe ci-dessus représente la moyenne de la quantité de ribosomes des 18 expériences. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne.

2D-DIGE : Two-Dimensional Difference In Gel Electrophoresis

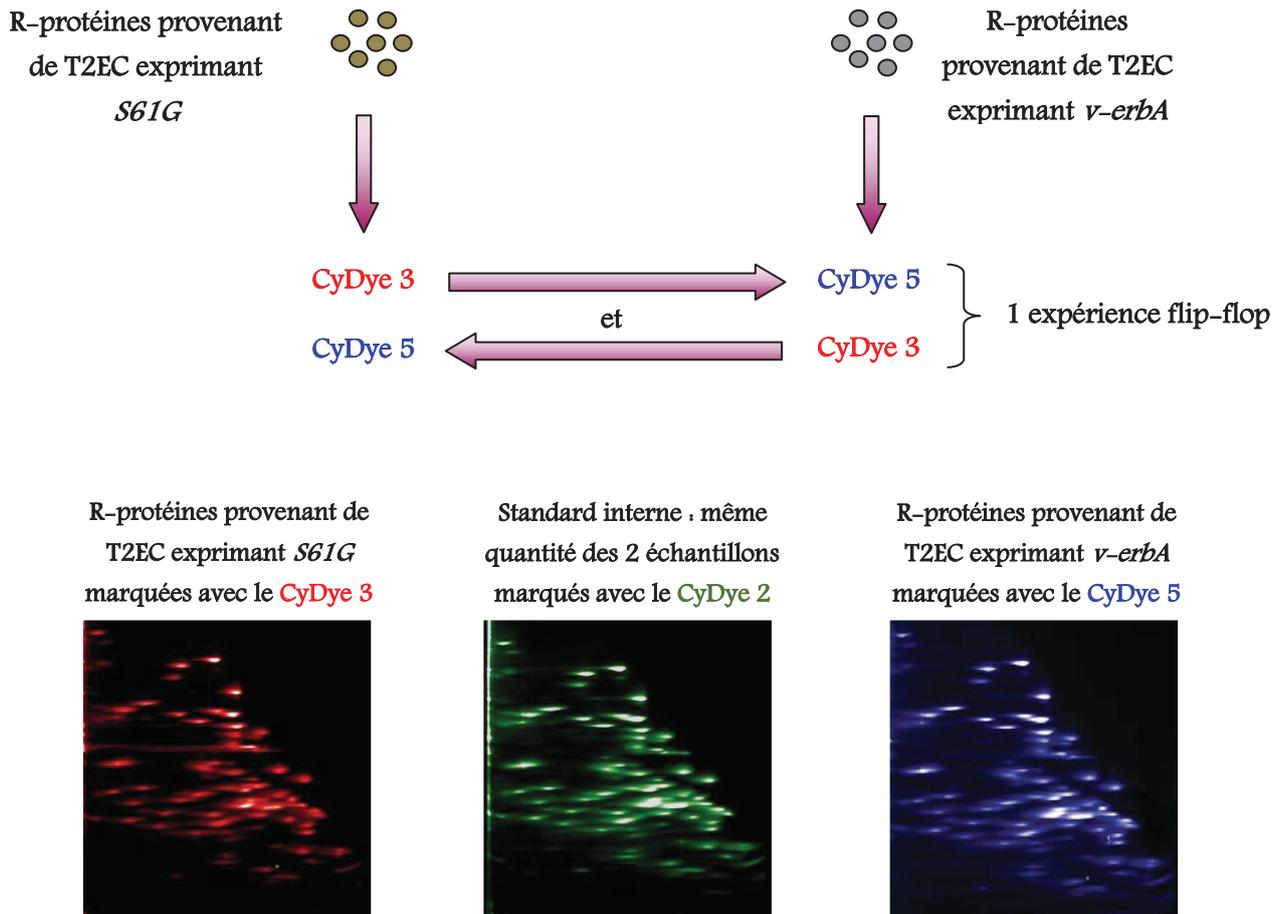


Figure 26 : 2D-DIGE (Two-Dimensionnal Difference In Gel Electrophoresis)

Les r-protéines extraites de T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G* sont marquées respectivement avec les CyDyes 5 et 3. Pour chaque échantillon biologique, un marquage inverse a été réalisé (une expérience flip-flop). Une quantité égale de r-protéines provenant des deux types de T2EC infectées est marquée avec le CyDye 2 et sert de standard interne lors de la quantification du taux des r-protéines. Les 3 échantillons marqués sont rassemblés et analysés simultanément en électrophorèse bidimensionnelle. Les gels d'une seule expérience représentative de 4 expériences indépendantes sont représentés ici.

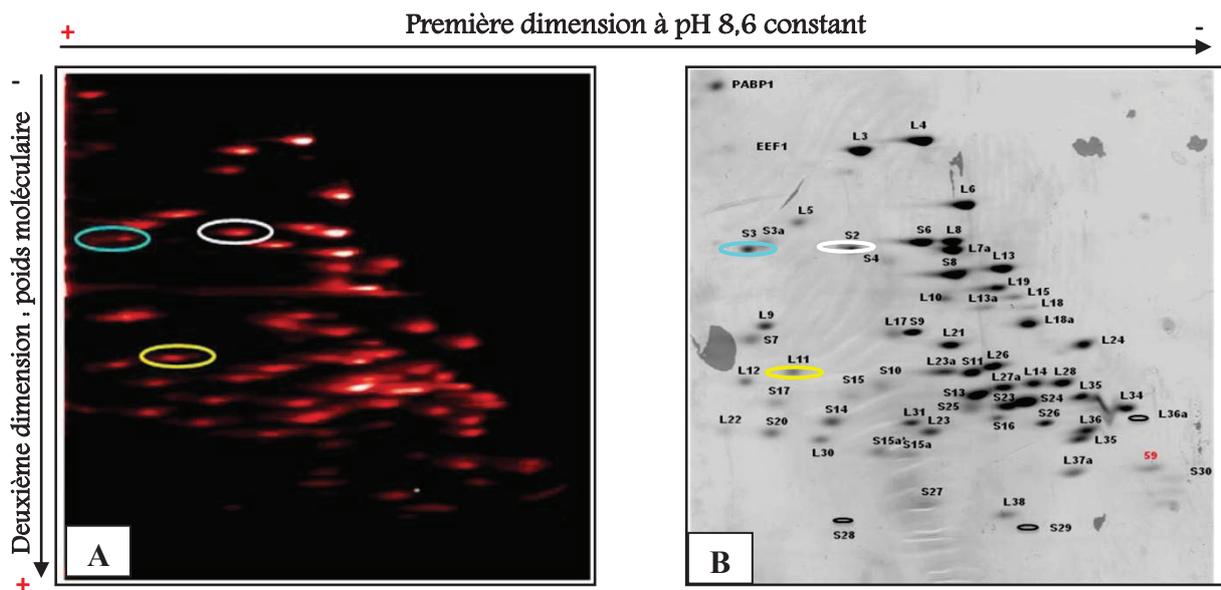
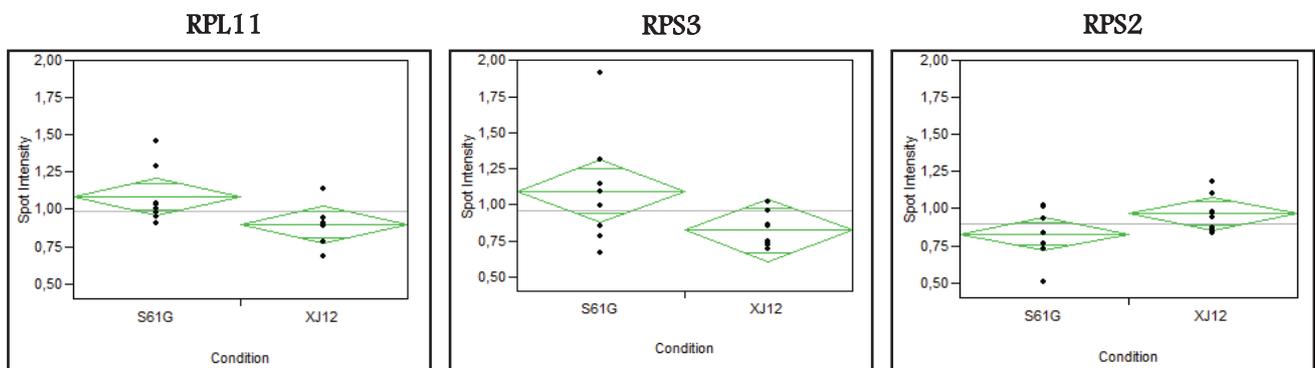
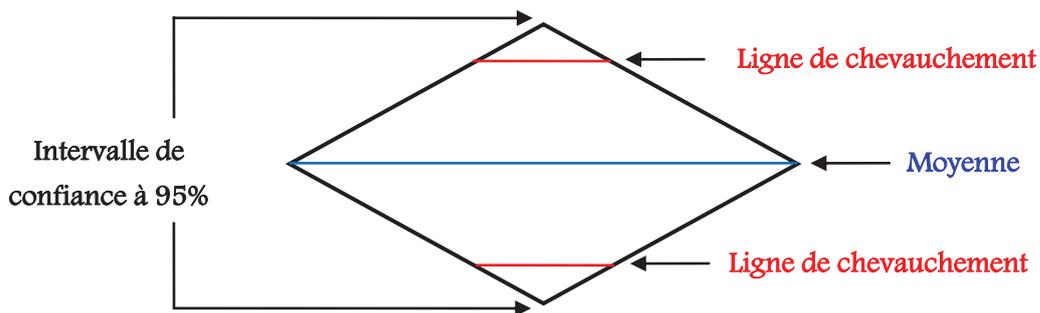


Figure 27 : Analyse de la composition des ribosomes en r-protéines par 2D-DIGE

A : Image de r-protéines marquées avec le fluorochrome CyDye 3 et séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Les spots entourés par les cercles sont ceux contenant des protéines dont le taux varie sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*.

B : Analyse des r-protéines associées aux ribosomes de T2EC séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines contenues dans les spots sont extraites et identifiées par spectrométrie de masse. (Figure extraite de l'article « Identification of human, rat and chicken ribosomal proteins by a combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry » AT. Nguyen-Lefebvre *et al*, J. Proteomics. 2011 Feb 1;74(2):167-85.



Nom de la protéine	Numéro d'accension d'UniProt	Taux de variation	> t (p value)
Putative uncharacterized protein (homolog of human RPL11)	Q5ZI56	- 1,2	0,0412
Putative uncharacterized protein (homolog of human RPS3)	Q5ZJC1	- 1,3	0,0803
40S ribosomal protein S2	Q6IPX5	1,2	0,0838

Figure 28 : Analyse de la composition des ribosomes en r-protéines par 2D-DIGE (bis)

Analyses statistiques par le test T de Student des données de 2D-DIGE (8 marquages) : trois r-protéines montrent un taux différent entre les T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G*. Les protéines RPL11 (p value : 0,0412) et RPS3 (p value : 0,0803) sont réprimées, alors que la protéine RPS2 (p value : 0,0838) est sur-exprimée dans la fraction ribosomique sous l'effet de *v-erba*.

Représentation graphique : le losange représente l'intervalle de confiance à 95%, la ligne au milieu du losange (bleue) représente la moyenne des 8 marquages, et les deux lignes (rouge) aux extrémités du losange indiquent les lignes de chevauchement. Lorsque les lignes de chevauchement de deux losanges (deux conditions à comparer) se recouvrent, le test statistique n'est pas significatif.

Expérience d'immunoprécipitation

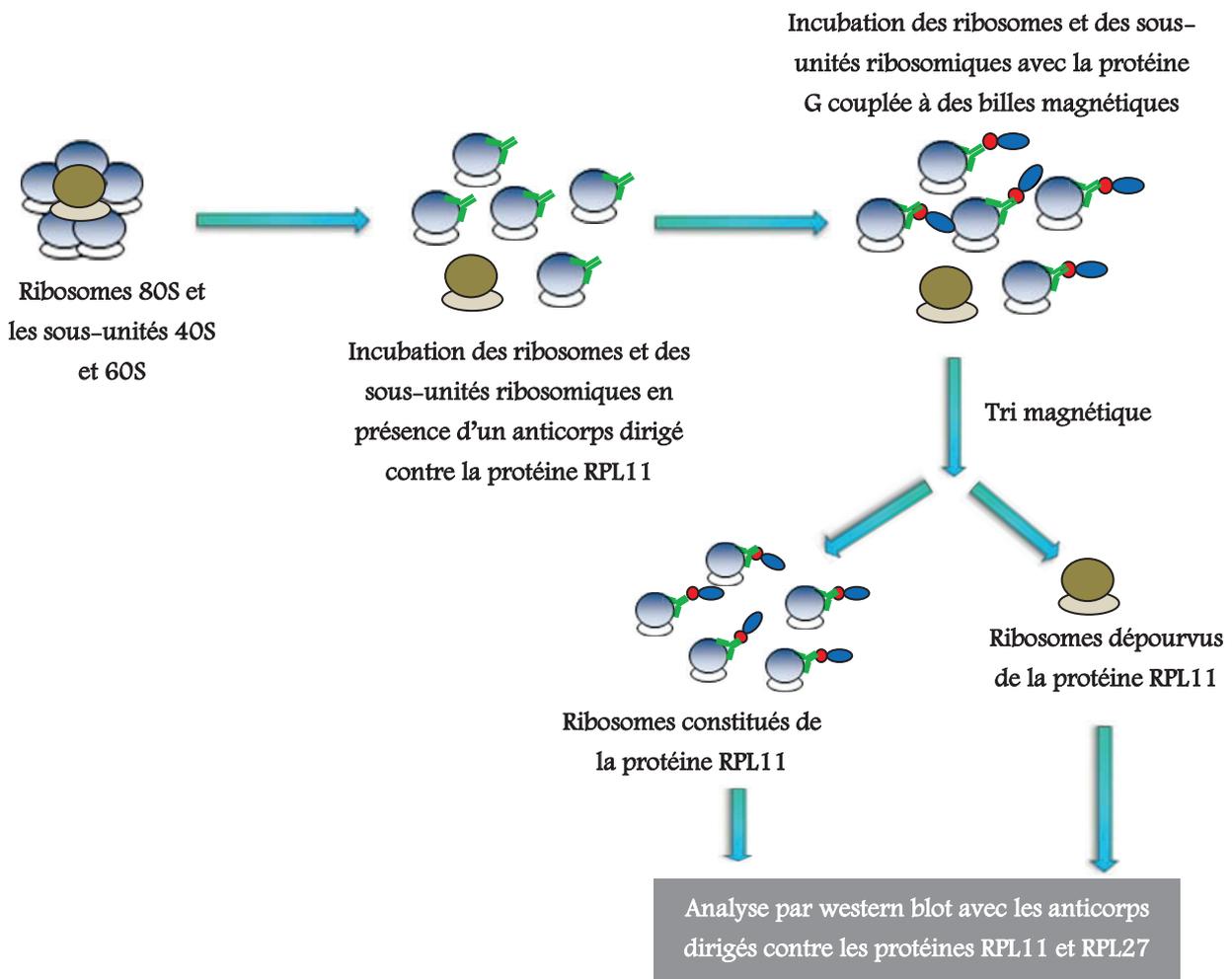
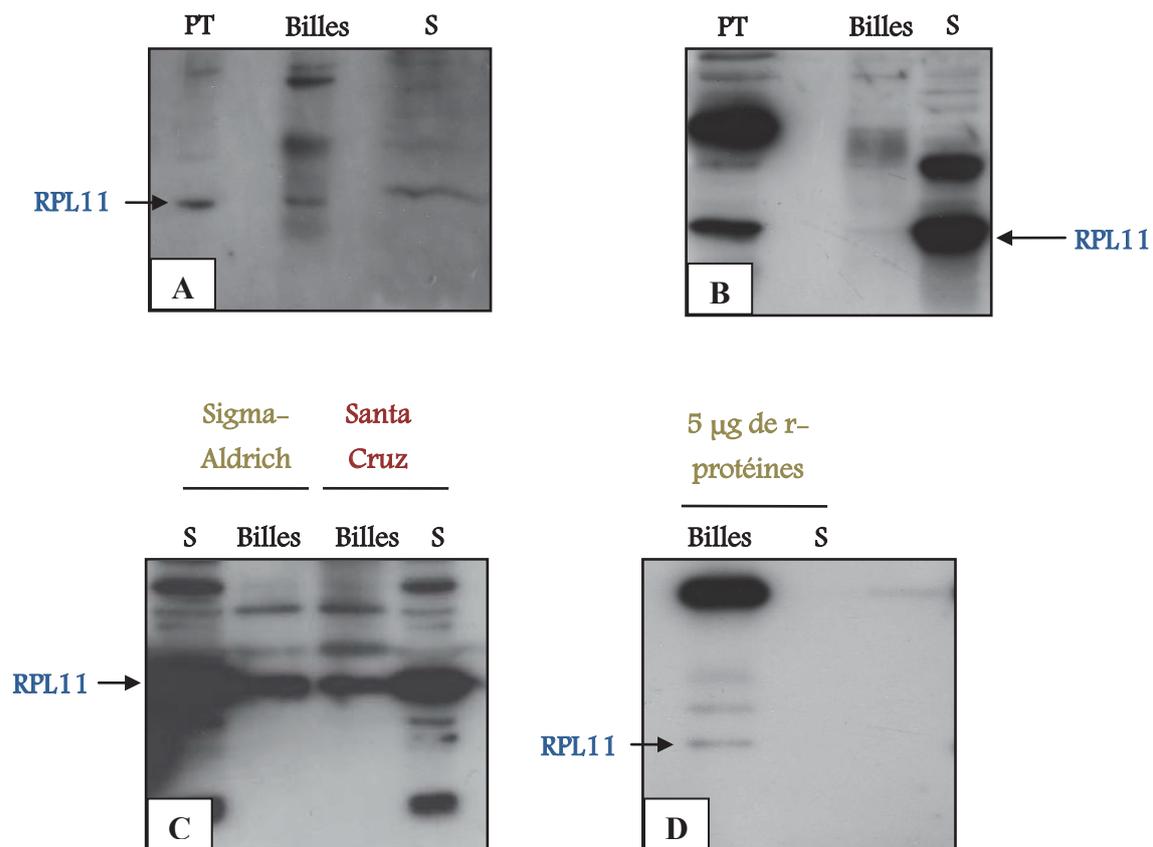


Figure 29 : Différentes étapes de l'immunoprécipitation permettant de séparer les ribosomes constitués de la protéine ribosomique L11 et dépourvus de la protéine ribosomique L11

Les ribosomes 80S et les sous-unités ribosomiques 40S et 60S sont extraits des T2EC exprimant *v-erbA* ou *S61G*. Ces ribosomes et sous-unités ribosomiques sont incubés avec l'anticorps dirigé contre la protéine RPL11, avant d'être mis en présence des protéines G couplées à des billes magnétiques. Une étape de tri magnétique permet ensuite de séparer les ribosomes et sous-unités 60S constitués de la protéine RPL11 de ceux dépourvus de cette protéine. Les fractions contenant des ribosomes et des sous-unités contenant ou dépourvus de la protéine RPL11 sont analysées par western blot avec des anticorps dirigés contre les protéines RPL11 et RPL27. Le signal obtenu avec l'anticorps dirigé contre la protéine RPL27 permet la mise en évidence de la présence de ribosomes sans RPL11.



PT : Fraction des protéines totales provenant de T2EC
Billes : Fraction associée aux billes magnétiques
S : Fraction associée au surnageant

Figure 30 : Mise au point des conditions d'immunoprécipitation

Les sous-unités ribosomiques et ribosomes ont été purifiés selon le protocole publié (AT. Nguyen-Lefebvre *et al*) et repris dans différents tampons avant d'être incubés avec des anticorps dirigés contre la protéine RPL11 et ensuite avec des protéines G couplées à des billes magnétiques. Ces particules sont ensuite triées afin de séparer des sous-unité ribosomiques et des ribosomes contenant la protéine RPL11 (fraction associée aux billes) ou dépourvus de la protéine RPL11 (fraction du surnageant). La fraction associée aux billes et la fraction du surnageant ont été analysées par western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine RPL11.

A : Les sous-unités ribosomiques et les ribosomes sont repris dans le tampon RIPA

B : Les sous-unités ribosomiques et les ribosomes sont repris dans le tampon de purification des ribosomes publié dans l'article Nguyen-Lefebvre *et al*.

C : Les sous-unités ribosomiques et les ribosomes sont repris dans le même tampon de purification des ribosomes qu'en B mais **sans DTE**. Les expériences d'immunoprécipitation sont réalisées avec les anticorps dirigés contre la protéine RPL11, commercialisés par Sigma-Aldrich (HPA002734) et Santa Cruz Biotechnology (sc-25931).

D : Les sous-unités ribosomiques et les ribosomes sont repris dans le même tampon de purification des ribosomes qu'en B mais **sans DTE**. Les expériences d'immunoprécipitation sont réalisées avec l'anticorps dirigé contre la protéine RPL11(FL-178), commercialisé par Santa Cruz Biotechnology. Le résultat le plus stringent est obtenu avec 5 µg de r-protéines incubées avec 2 µg d'anticorps anti-RPL11 et 50 µl de protéines G couplées à des billes magnétiques.

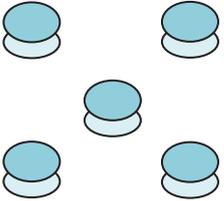
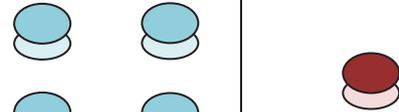
	Hypothèse 1 Absence de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11		Hypothèse 2 Existence de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11	
	Fraction des billes magnétiques	Fraction du surnageant	Fraction des billes magnétiques	Fraction du surnageant
Immunoprécipitation des ribosomes avec l'anticorps dirigé contre la protéine RPL11				
Analyse par western Blot				
Anticorps anti-RPL11	+	-	+	-
Anticorps anti-RPL27	+	-	+	+

Figure 31 : Deux hypothèses testées par des expériences d'immunoprécipitation

Les sous-unités ribosomiques et les ribosomes présents dans la fraction des billes ou du surnageant sont analysés par western blot avec les anticorps dirigés contre les protéines RPL11 et RPL27. Le ratio des signaux RPL11/RPL27 dans la fraction du surnageant permettra de confirmer l'une des deux hypothèses.

Hypothèse 1 : Il n'existe pas de ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*.

Hypothèse 2 : Il existe des ribosomes dépourvus de la protéine RPL11 sous l'effet de l'oncogène *v-erbA*.

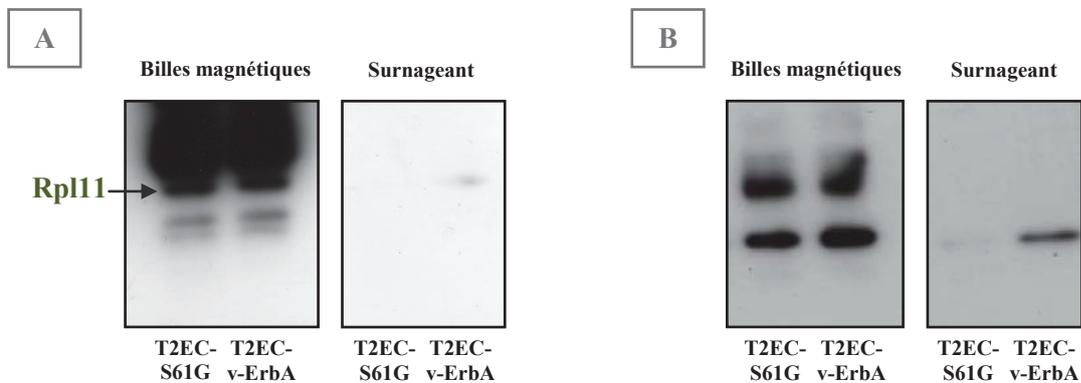


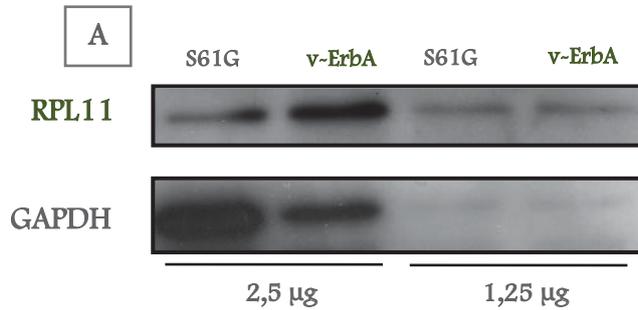
Figure 32 : Analyse des fractions obtenues après immunoprécipitation des ribosomes et des sous-unités ribosomiques avec un anticorps dirigé contre la protéine ribosomique L11 à partir de T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G*

Les ribosomes et sous-unités ribosomiques ont été purifiés à partir de $5 \cdot 10^6$ TEC exprimant *v-erba* ou *S61G*. Dix microgrammes de ribosomes et sous-unités ribosomiques ont été incubés en présence d'anticorps dirigé contre la protéine RPL11. Les protéines G couplées à des billes magnétiques sont ensuite ajoutées aux ribosomes et sous-unités ribosomiques. Un tri magnétique a été réalisé permettant ainsi de séparer les ribosomes et sous-unités 60S constitués de la protéine RPL11 (associés aux billes magnétiques) des ribosomes et sous-unités dépourvus de la protéine RPL11 (dans le surnageant).

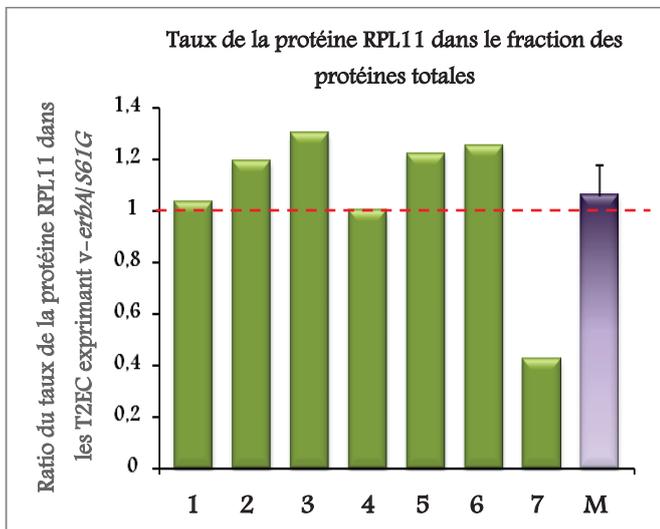
A : Analyse des deux fractions (fraction associée aux billes magnétiques et le surnageant) par western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine RPL11. La majorité des ribosomes et sous-unités 60S constitués de la protéine RPL11 se retrouvent dans la fraction associée aux billes magnétiques.

B : Analyse des deux fractions par western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine RPL27.

N = 7 expériences indépendantes



B



C

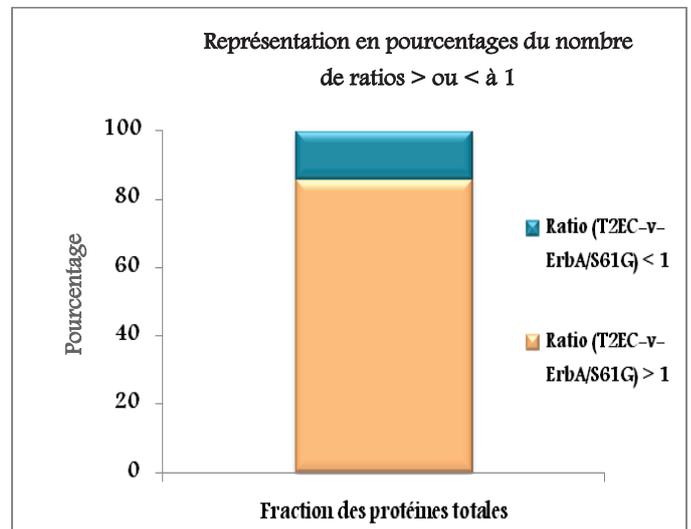
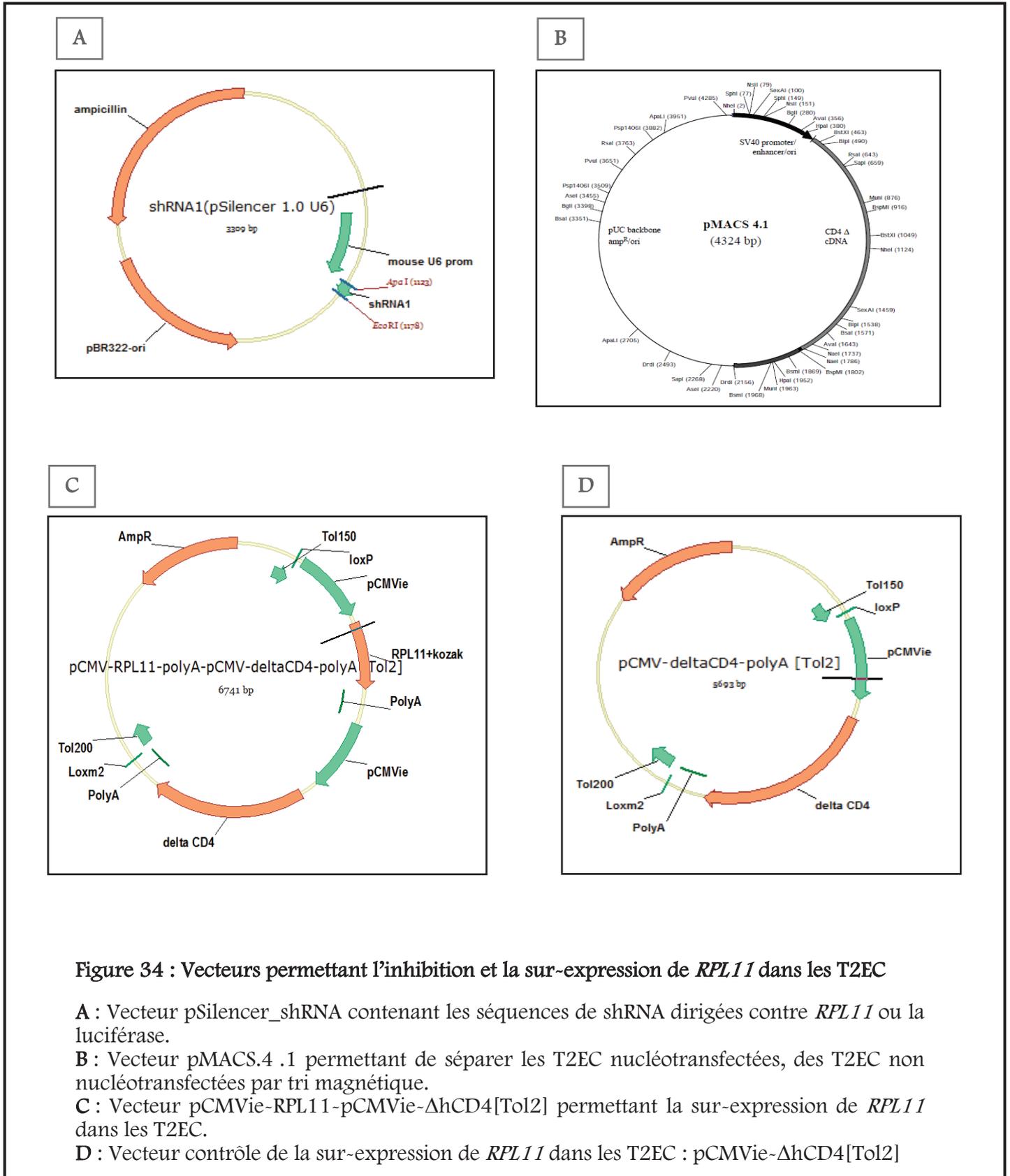


Figure 33 : Analyse du taux de la protéine ribosomique L11 dans la fraction des protéines totales

A : Les protéines totales ont été extraites à partir de T2EC exprimant *v-erbA* ou sa forme mutée, non transformante, *S61G*. Différentes quantités (2,5 µg et 1,25 µg) de protéines totales ont été analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines RPL11 et GAPDH. La protéine GAPDH sert de témoin de charge. Le résultat d'une seule expérience représentative de 7 expériences indépendantes est représenté ici.

B : Les ratios du taux de la protéine RPL11, normalisé par rapport à celui de GAPDH, dans les T2EC exprimant *v-erbA* par rapport à *S61G*, pour les 7 expériences, sont représentés par les histogrammes verts. La moyenne des ratios de ces 7 expériences est représentée par l'histogramme violet. La moyenne est de 1,064 avec une erreur standard de 0,114.

C : Représentation en pourcentage du nombre d'expériences montrant un ratio (T2EC-*v-erbA*/T2EC-*S61G*) du taux de la protéine RPL11 inférieur à 1 (en bleu : 14,3%) et supérieur à 1 (en orange clair : 85,7%).



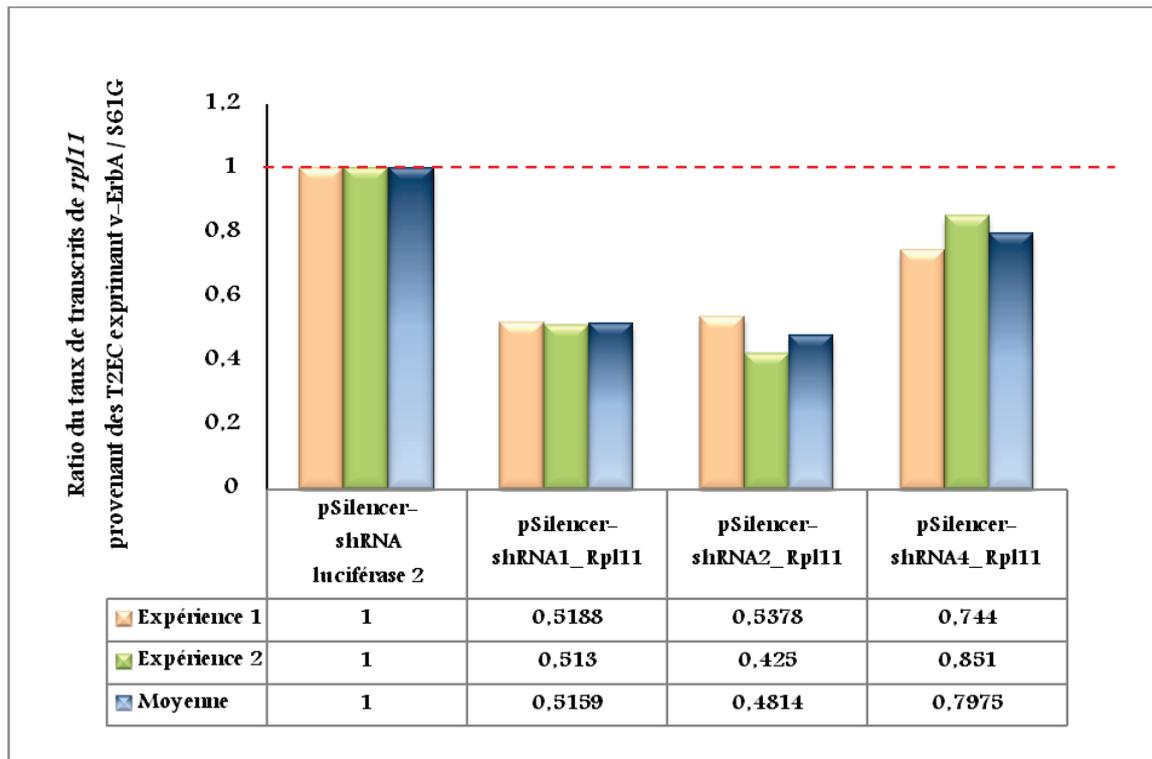
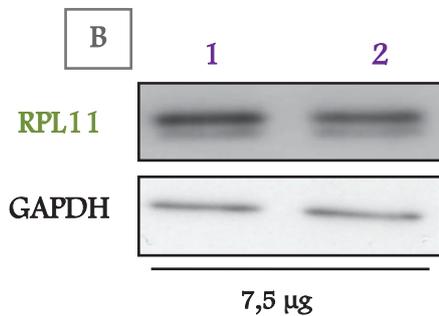
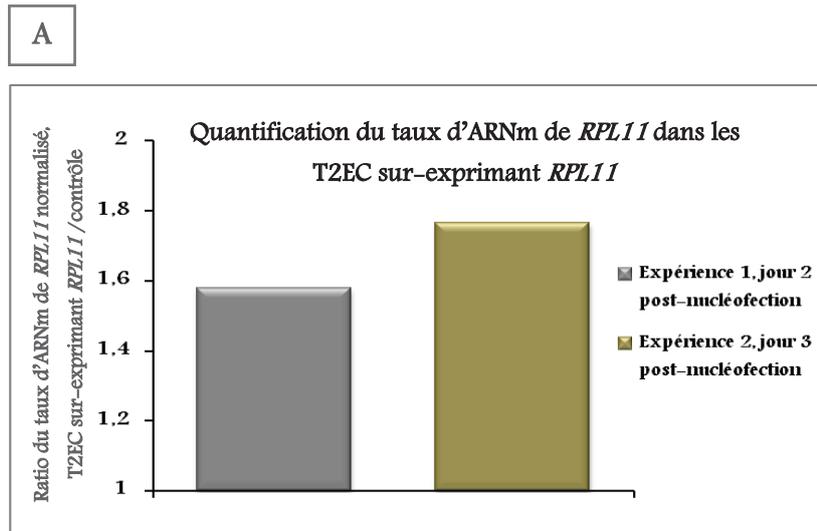


Figure 35 : Analyse du taux d'ARNm de *RPL11* dans les T2EC transfectées avec des vecteurs portant les shRNA dirigés contre *RPL11* ou contre la *luciférase* (contrôle) par PCR quantitative

Les ARN totaux ont été extraits des T2EC nucléofectées avec les vecteurs portant les différents shRNA (2 expériences indépendantes : histogrammes oranges et verts). Une rétrotranscription et une PCR quantitative ont été réalisées pour quantifier le niveau d'expression de *RPL11* dans les cellules transfectées. Ici, le taux de *RPL11*, normalisé par rapport au gène standard *ATP synthase sous-unité beta*, dans les T2EC transfectées avec le vecteur pSilencer_shRNA_Luciférase est ramené à 100%. Le taux de *RPL11* dans les T2EC transfectées avec le vecteur pSilencer_shRNA (1-2-4)_RPL11 est ramené en pourcentage par rapport au contrôle : une répression moyenne de 48%, 52% et 20% de l'expression de *RPL11* a été observée avec les shRNA1, shRNA2 et shRNA4 respectivement (histogrammes bleus).



1 : T2EC transfectedées avec le vecteur pCMVie-Rpl11-pCMVie-ΔhCD4[Tol2]

2 : T2EC transfectedées avec le vecteur contrôle pCMVie-ΔhCD4[Tol2]

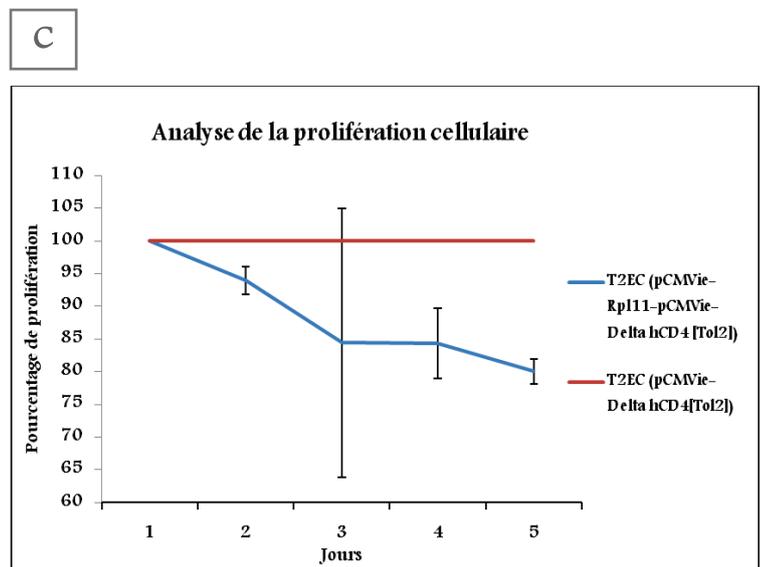


Figure 36 : Etude de la sur-expression de *RPL11* dans les T2EC

A : Les T2EC ont été transfectedées avec les vecteurs pCMVie-*RPL11*-pCMVie-ΔhCD4[Tol2] ou pCMVie-ΔhCD4[Tol2]. Les ARN totaux provenant des cellules transfectedées ont été extraits à J2 (Expérience 1) et à J3 (Expérience 2) post-nucléofection et une RT-PCR quantitative a été réalisée. Ici, le ratio du taux de *RPL11*, normalisé par rapport au gène standard *ATP synthase sous-unité beta*, provenant des T2EC sur-exprimant *RPL11* par rapport aux T2EC transfectedées par le vecteur contrôle est représenté pour 2 expériences indépendantes : une augmentation significative du taux d'ARNm de *RPL11* a été observée dans les 2 cas.

B : Les protéines totales ont été extraites à partir de T2EC transfectedées. 7,5 μg de protéines totales ont été analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines *RPL11* et *GAPDH*. La protéine *GAPDH* sert de témoin de charge.

C : Courbes représentant le taux de prolifération cellulaire des T2EC sur-exprimant *RPL11* ou transfectedées avec le vecteur de contrôle. Le taux de prolifération a été déterminé en comptant les cellules vivantes au bleu de Trypan. La courbe moyenne de trois expériences indépendantes pour chaque condition est représentée ici. Les barres verticales représentent les écart-types.

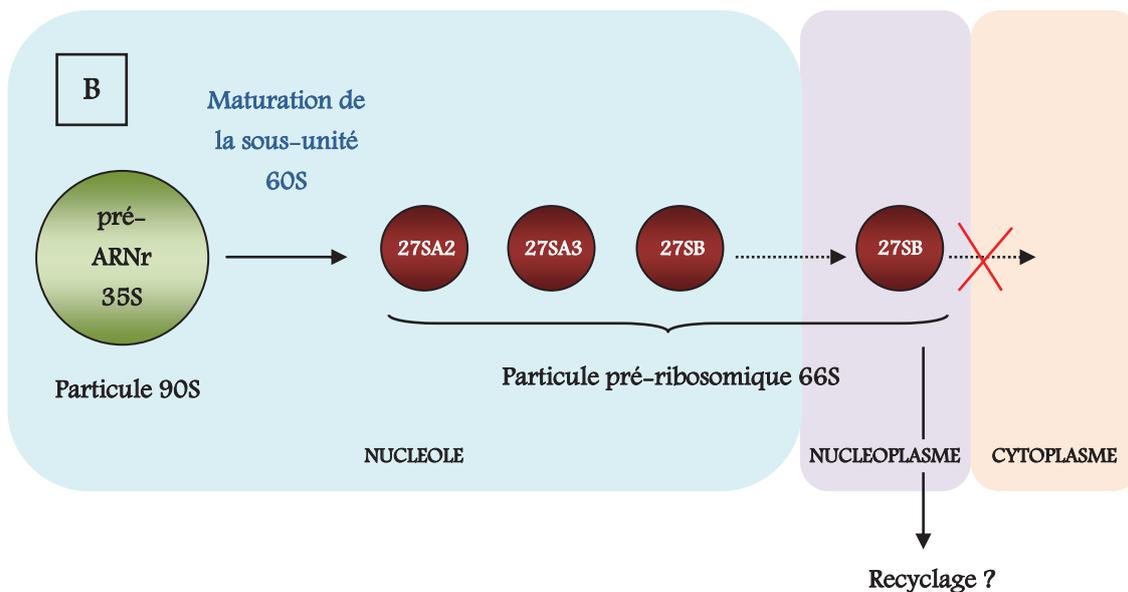
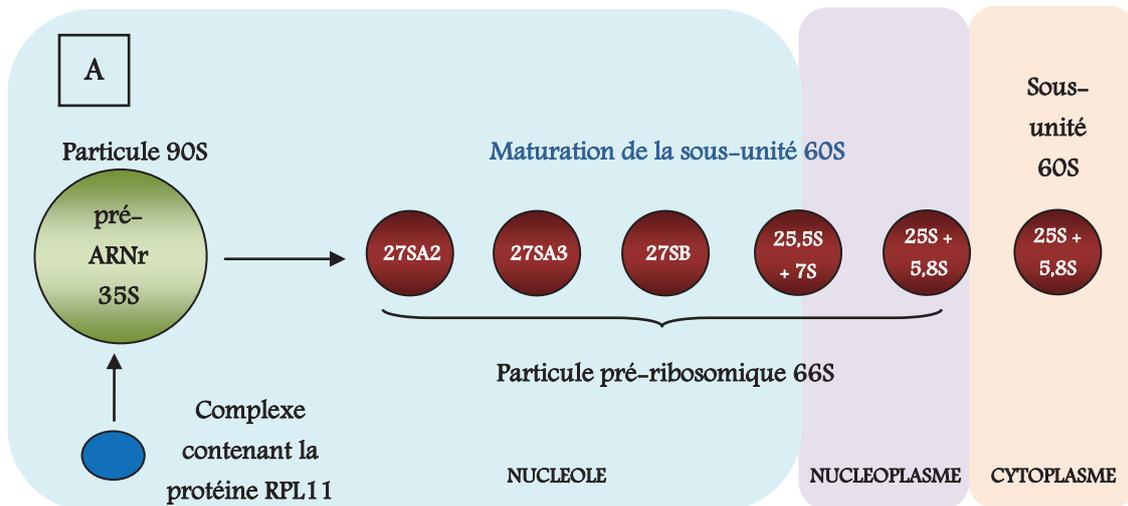


Figure 37 : Modèle de maturation de la sous-unité 60S chez *S. cerevisiae*

Figure extrait et modifié de l'article « Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recuit 5S rRNA and ribosomal proteins Rpl5 and RPL11 into nascent ribosomes ». J. Zhang *et al.* Genes Dev. 2007 Oct 15 ;21(20) : 2580-92.

A : Le complexe constitué de protéines RPL5, RPL11 et d'ARNr 5S est recruté par les protéines Rpf2 et Rrs1 dans la particule pré-ribosomique 90S. Toutes ces protéines sont essentielles pour les différentes étapes de la maturation de la grande sous-unité 60S.

B : Lorsqu'une de ces protéines est absente, la maturation des particules pré-66S se déroule malgré tout normalement jusqu'au pré-ARNr 27SA3. Cependant, la maturation du pré-ARNr 27SB est bloquée et les particules pré-ribosomiques 66S constituées du pré-ARNr 27SB sont relarguées dans le nucléoplasme et ne seront pas exportées vers le cytoplasme.

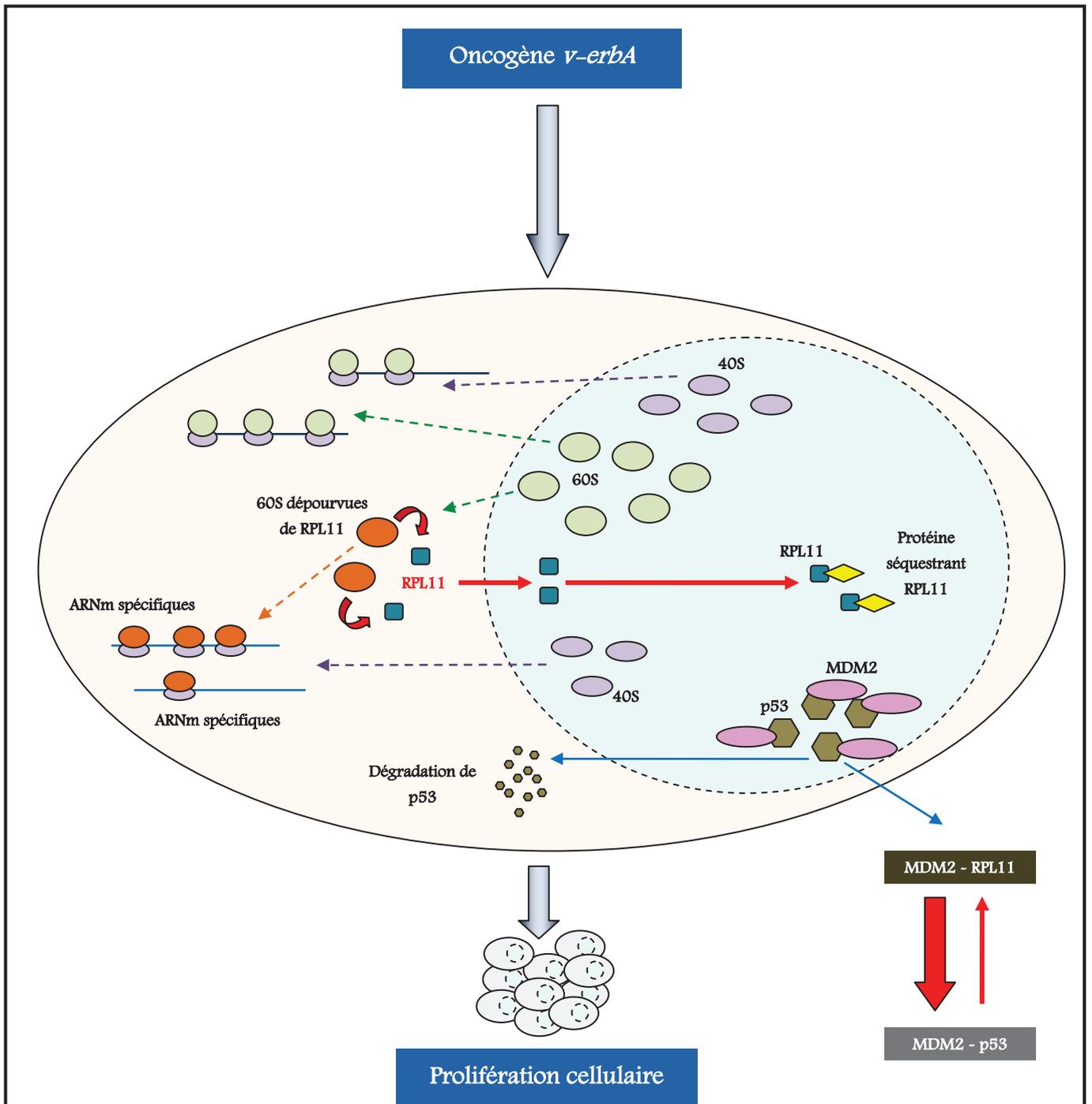


Figure 38 : Modèle expliquant l'effet biologique observé dans les T2EC exprimant *v-erbA*

L'oncogène *v-erbA* induit dans les T2EC, la biogenèse des ribosomes dépourvus de la protéine RPL11. Ces ribosomes non conventionnels favoriseraient la traduction d'ARNm spécifiques pouvant avoir un rôle dans le processus de transformation induit par l'oncogène *v-erbA*. Les protéines RPL11 non associées aux ribosomes sont alors séquestrées par des protéines différentes de MDM2 et qui restent à être identifiées, empêchant ainsi son interaction avec MDM2. En conséquence, les protéines MDM2 sont disponibles pour ubiquitiner les protéines p53, conduisant à leur dégradation et permettant ainsi la prolifération cellulaire..

Protéines ribosomiques	Rat (aa)	Être humain (aa)	% d'homologie	Protéines ribosomiques	Rat (aa)	Être humain (aa)	% d'homologie
RPSA	295	295	99%	RpP0	317	317	98%
RPS2	293	293	99%	RpP1	114	114	98%
RPS3	243	243	99%	RpP2	115	115	97%
RPS3a	264	264	99%	RPL3	403	403	99%
RPS4X	263	263	100%	RPL4	421	427	90%
RPS5	204	204	98%	RPL5	297	297	99%
RPS6	249	249	100%	RPL6	298	288	86%
RPS7	194	194	100%	RPL7	260	248	97%
RPS8	208	208	100%	RPL7a	266	266	100%
RPS9	194	194	100%	RPL8	257	257	100%
RPS10	165	165	99%	RPL9	192	192	99%
RPS11	158	158	100%	RPL10	214	214	100%
RPS12	132	132	99%	RPL10a	217	217	100%
RPS13	151	151	100%	RPL11	178	178	100%
RPS14	151	151	99%	RPL12	165	165	99%
RPS15	145	145	100%	RPL13	211	211	97%
RPS15a	130	130	100%	RPL13a	203	203	96%
RPS16	146	146	100%	RPL14	214	215	94%
RPS17	135	135	99%	RPL15	204	204	100%
RPS18	152	152	100%	RPL17	184	184	99%
RPS19	145	145	99%	RPL18	188	188	97%
RPS20	119	119	100%	RPL18a	176	176	99%
RPS21	83	83	95%	RPL19	196	196	100%
RPS23	143	143	100%	RPL21	160	160	98%
RPS24	133	133	100%	RPL22	128	128	98%
RPS25	125	125	100%	RPL23	140	140	100%
RPS26	127	115	82%	RPL23a	156	156	100%
RPS27	84	84	100%	RPL24	157	157	100%
RPS27a	156	156	99%	RPL26	145	145	99%
RPS28	69	69	100%	RPL27	136	136	100%
RPS29	56	56	100%	RPL27a	148	148	97%
RPS30	59	59	100%	RPL28	137	137	96%
				RPL29	156	159	87%
				RPL30	115	115	100%
				RPL31	125	125	100%
				RPL32	135	135	100%
				RPL34	117	117	86%
				RPL35	123	123	98%
				RPL35a	110	110	99%
				RPL36	105	105	99%
				RPL36a	106	106	100%
				RPL37	97	97	100%
				RPL37a	92	92	100%
				RPL38	70	70	100%
				RPL39	51	51	100%
				RPL40	128	128	100%
				RPL41	25	25	100%

Tableau 1 : Homologies de séquences des protéines ribosomiques du rat et de l'être humain

Les séquences protéiques des r-protéines entre le rat et l'être humain sont très conservées. La conservation varie entre 82% et 100%. Les séquences sont obtenues à partir de la base UniProtKB en 2012.

Pathologie	Caractéristiques cliniques	Gènes mutés	Fonctions des gènes mutés
Pathologies congénitales avec insuffisance médullaire			
Anémie de Diamond-Blackfan	Erythroblastopénie, malformations congénitales, prédisposition au cancer	<i>RPS19, RPS17, RPS24, RPS7, RPS26, RPS10, RPS27, RPS27A, RPS15, RPL5, RPL11, RPL35A, RPL36</i> et <i>RPL26</i>	Protéines ribosomiques
Dyskératose congénitale	Aplasia médullaire, anomalies de la pigmentation de la peau, leucoplasies des muqueuses, troubles des phanères, retard staturo-pondéral, fibrose pulmonaire, prédisposition au cancer	<i>dkc1</i> (Dyskérine) + autres gènes de composants de la télomérase	Pseudo-uridyl synthase, composants des snoRNP et de la télomérase
Syndrome de Shwachman-Diamond	Neutropénie, aplasia médullaire, insuffisance pancréatique exocrine, dysostose métaphysaire, retard staturo-pondéral, prédisposition au cancer	<i>sdfs</i>	Maturation de la grande sous-unité ribosomique 60S
Hypoplasie cartilage-cheveux	Anémie, anomalies du cartilage et du squelette, retard staturo-pondéral (voire nanisme), anomalie des cheveux, déficit immunitaire, troubles gastro-intestinaux, prédisposition au cancer	<i>rmp</i>	Composant ARN de la ribonucléase MRP : clivage du pré-ARN ribosomique
Pathologie congénitale sans insuffisance médullaire			
Syndrome de Treacher Collins	Anomalies cranio-faciales	<i>tcof1</i> (code Treacle)	Phosphoprotéine nucléolaire Treacle : transcription de l'ADNr
Pathologie acquise			
Syndrome 5q-	Anémie, anomalie des mégacaryocytes, risque d'évolution rapide vers une leucémie aiguë myéloïde, Myélodysplasie acquise	<i>RPS14</i>	Protéine ribosomique

Tableau 2 : Pathologies liées à la mutation de gènes codant les protéines ribosomiques ou des facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes

Tableau extrait et modifié de l'article « Anémie de Diamond-Blackfan : le côté obscur de la biogenèse des ribosomes », A. H. Aguisa-Touré *et al*, Médecine/Sciences 2009 ; 25 : 69-76. Pour la dyskératose congénitale, 4 autres gènes impliqués dans le complexe de la télomérase peuvent être mutés.

Protéine ribosomique	Fonction extra-ribosomique
Recrutements des bactériophages	
RPS1	Q β réplacase
RPS10, RPS4	Complexe NUS; Anti-terminaison
Auto-régulation de la synthèse des r-protéines chez les procaryotes	
RPL4	Inhibition de la traduction des ARNm polycistroniques Inhibition de la transcription de l'opéron S10; Partenaire de l'ARNase E et régulateur de son activité
Auto-régulation de la synthèse des r-protéines chez les eucaryotes	
RPL30 (<i>S. cerevisiae</i>)	Inhibition de l'épissage de leur propre ARNm
RPS14 (<i>S. cerevisiae</i>)	Inhibition de l'épissage de leur propre ARNm
RPL2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Raccourcissement de la demi-vie de leur propre ARNm
RPS28 (<i>S. cerevisiae</i>)	Raccourcissement de la demi-vie de leur propre ARNm
RPL12 (and others?) (<i>C. elegans</i>)	Inhibition de l'épissage de leur propre ARNm
RPS14 (<i>H. sapiens</i>)	Inhibition de l'épissage de leur propre ARNm
Sentinelles de la biogenèse des ribosomes chez les mammifères	
RPL5	Séquestration de M/HDM2
RPL11	Séquestration de M/HDM2; Séquestration de <i>c-myc</i>
RPL23	Séquestration de M/HDM2
RPS7	Séquestration de M/HDM2
RPL26	Induction de la traduction de <i>TP53</i>
RPL23	Séquestration de la nucléophosmine pour empêcher sa liaison avec Miz1
Autres fonctions extra-ribosomiques	
RPL7 (Archaea)	SnoRNP
RACK1	Signalisation cellulaire
RPL13a	Inhibition de la traduction des ARNm (Complexe GAIT)
RPS3	Endonucléase d'ADN ; Partenaire de NFKB
RPL10 (<i>A. thaliana</i>)	Fonction anti-virale
RPL10 (<i>H. sapiens</i>)	Partenaire de <i>c-jun</i>
Implications supposées	
RPS20 (<i>S. cerevisiae</i>)	Régulateur de la transcription par la Pol III
RPL6 (<i>S. cerevisiae</i>)	Régulateur de la transcription par la Pol III
RPL22 (and others) (<i>D. melanogaster</i>)	Partenaire de l'histone H1 (Affectation de la transcription?)
RPL22 (<i>H. sapiens</i>)	Partenaire de l'ARN EBER-1 (du virus EB)
RPS26 (<i>H. sapiens</i>)	Susceptibilité aux diabètes (?)

Tableau 3 : Protéines ribosomiques avec des fonctions extra-ribosomiques

Tableau extrait et modifié de l'article « How common are Extra-ribosomal Functions of Ribosomal Proteins ? », J. R. Warner & K. B. McIntosh, Mol Cell. 2009 April 10 ; 34(1) : 3-11.

Protéine ribosomique	Fonctions
RPS3	Co-régulateur de NFκB et partenaire de Hsp90/70
RPS3a	Partenaire du facteur de transcription CHOP et régulateur de l'érythropoïèse ; Partenaire de la protéine EBNA5 (virus Epstein Barr)
RPS13	Régulateur négatif de l'épissage de son propre ARNm
RPS14	Inhibiteur de la transcription de son propre gène
RPL6	Augmente la fixation de la protéine HTLV-1 Tax à l'ADN
RPL7	Co-régulateur du complexe de récepteurs nucléaires VDR-RXR et régulateur la traduction de transcrits spécifiques, y compris le sien
RPL22	Partenaire et inhibiteur du petit ARN EBER1 (virus Epstein Barr) dans les cellules B infectées
RPL13a	Inhibiteur de la traduction de l'ARNm de <i>ceruloplasmine</i>
RPL26	Induction de la traduction des transcrits de <i>TP53</i> après une irradiation
RPL11	Inhibiteur de la trans-activation médiée par c-Myc
RPL23	Régulateur négatif indirect de la trans-activation dépendante de Miz1 à travers les protéines nucléaires chaperones NPM/B23
RPL11, RPL5, RPS7, RPL23, RPL26	Partenaire de MDM2 et inhibiteur de l'activité ligase E3 de MDM2 sur la protéine p53

Tableau 4 : Protéines ribosomiques avec des fonctions extra-ribosomiques impliquées dans les régulations de la transcription et de la traduction des gènes

Tableau extrait et modifié de l'article « Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation », M. S. Lindström. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ; 2009 ; 379 : 167-170.

Type de cancers	Protéines ribosomiques
Oesophage, Estomac	RPL15 (1), RPL14 (2)
Gastro-intestinal	RPL15 (3), RPL6 (4,5), RPL13 (6)
Foie	RPL13 (6), RPP0 (7), RPL36a (8), RPL12, RPS8, RPL23a & RPL30 (9),
Colorectal	RPS11 & RPL7 (10), RPS3, RPS6, RPS8, RPS12, RPL5 & RPP0 (11)
Prostate	RPS2 (12), RPL19 (13), RPL37 & RPL7a (14),
Sein	RPL19 (15), RPP0 (7)
Poumons	RPL14 (16), RPS3a (17)
Adénome et adénocarcinomes	RPS3 (18), RPS2, RPS12, RPS27a, RPL5, RPL7a & RPL10a (19)
Col de l'utérus	RPS12 (20)

Tableau 5 : Cancers associés à une sur-expression des protéines ribosomiques

Ce tableau montre quelques exemples de cancers qui sont corrélés avec une augmentation de l'expression d'une ou d'un groupe de r-protéines.

1. **Wang, Q.**, Yang, C., Zhou, J., Wang, X., Wu, M. and Liu, Z. (2001) *Gene*, **263**, 205-209.
2. **Huang, X.P.**, Zhao, C.X., Li, Q.J., Cai, Y., Liu, F.X., Hu, H., Xu, X., Han, Y.L., Wu, M., Zhan, Q.M. *et al.* (2006) *Gene*, **366**, 161-168.
3. **Wang, H.**, Zhao, L.N., Li, K.Z., Ling, R., Li, X.J. and Wang, L. (2006) *BMC Cancer*, **6**, 91.
4. **Wu, Q.**, Gou, Y., Wang, Q., Jin, H., Cui, L., Zhang, Y., He, L., Wang, J., Nie, Y., Shi, Y. *et al.* (2011) *PLoS One*, **6**, e26401.
5. **Gou, Y.**, Shi, Y., Zhang, Y., Nie, Y., Wang, J., Song, J., Jin, H., He, L., Gao, L., Qiao, L. *et al.* (2010) *Biochem Biophys Res Commun*, **393**, 788-793.
6. **Kobayashi, T.**, Sasaki, Y., Oshima, Y., Yamamoto, H., Mita, H., Suzuki, H., Toyota, M., Tokino, T., Itoh, F., Imai, K. *et al.* (2006) *Int J Mol Med*, **18**, 161-170.
7. **Chang, T.W.**, Chen, C.C., Chen, K.Y., Su, J.H., Chang, J.H. and Chang, M.C. (2008) *Oncogene*, **27**, 332-338.
8. **Kim, J.H.**, You, K.R., Kim, I.H., Cho, B.H., Kim, C.Y. and Kim, D.G. (2004) *Hepatology*, **39**, 129-138.
9. **Kondoh, N.**, Shuda, M., Tanaka, K., Wakatsuki, T., Hada, A. and Yamamoto, M. (2001) *Anticancer Res*, **21**, 2429-2433.
10. **Kasai, H.**, Nadano, D., Hidaka, E., Higuchi, K., Kawakubo, M., Sato, T.A. and Nakayama, J. (2003) *J Histochem Cytochem*, **51**, 567-574.
11. **Pogue-Geile, K.**, Geiser, J.R., Shu, M., Miller, C., Wool, I.G., Meisler, A.I. and Pipas, J.M. (1991) *Mol Cell Biol*, **11**, 3842-3849.
12. **Wang, M.**, Hu, Y. and Stearns, M.E. (2009) *J Exp Clin Cancer Res*, **28**, 6.
13. **Bee, A.**, Ke, Y., Forootan, S., Lin, K., Beesley, C., Forrest, S.E. and Foster, C.S. (2006) *Clin Cancer Res*, **12**, 2061-2065.
14. **Vaarala, M.H.**, Forvari, K.S., Kyllonen, A.P., Mustonen, M.V., Lukkarinen, O. and Vihko, P.T. (1998) *Int J Cancer*, **78**, 27-32.
15. **Henry, J.L.**, Coggin, D.L. and King, C.R. (1993) *Cancer Res*, **53**, 1403-1408.
16. **Shriver, S.P.**, Shriver, M.D., Tirpak, D.L., Bloch, L.M., Hunt, J.D., Ferrell, R.E. and Siegfried, J.M. (1998) *Mutat Res*, **406**, 9-23.
17. **Slizhikova, D.K.**, Vinogradova, T.V. and Sverdlov, E.D. (2005) *Bioorg Khim*, **31**, 195-199.
18. **McDoniels-Silvers, A.L.**, Nimri, C.F., Stoner, G.D., Lubet, R.A. and You, M. (2002) *Clin Cancer Res*, **8**, 1127-1138.
19. **Lu, B.**, Xu, J., Zhu, Y., Zhang, H. and Lai, M. (2007) *Clin Chim Acta*, **378**, 42-47.
20. **Cheng, Q.**, Lau, W.M., Chew, S.H., Ho, T.H., Tay, S.K. and Hui, K.M. (2002) *Br J Cancer*, **86**, 274-281.

Protéines identifiées dans la fraction cytosolique			
Protein name	Numéro d'accension d'UniProt	Taux de variations	p value
78 kDa Glucose Regulated Protein (GRP78)	Q90593	1,48	0,0643
Heat Shock Protein 70 (HSP70)	B3VHV2	1,57	0,0769
Putative Uncharacterized Protein (chicken homolog of 52 kDa FK506 binding protein by comparison of sequences)	Q5ZJT4	- 1,41	0,0211
Putative Uncharacterized Protein (chicken homolog of NSAP1 by comparison of sequences)	Q5ZLH7	- 1,85	0,0139
Aspartate Amino Transferase Cytoplasmic (AATC)	P00504	- 1,75	0,0821
L-lactate Dehydrogenase B chain (LDHB)	P00337	- 1,4	0,0751

Protéines identifiées dans la fraction nucléaire			
Protein name	Numéro d'accension d'UniProt	Taux de variations	p value
GTP-Binding nuclear protein Ran	P42558	- 2,56	0,0568
Actin cytoplasmic 1 or Beta-actin	P60706	- 2,04	0,0061
Protein syndesmos	Q9IAY5	1,92	0,0985

Tableau 6 : Identification des protéines avec un niveau d'expression différentielle entre les T2EC exprimant *v-erba* ou *S61G*

Les tableaux montrent les protéines cytosoliques et nucléaires qui sont différentiellement exprimées entre les T2EC-*v-erba* et les T2EC-*S61G*. Ces protéines ont été identifiées après comparaison des fractions cytoplasmique et nucléaire par électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse. Lorsque le taux de variation est positif, la protéine d'intérêt est sur-exprimée, alors que quand il est négatif, la protéine d'intérêt est sous-exprimée dans les T2EC exprimant *v-erba* en comparaison à celles exprimant *S61G*. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test T de Student.