



HAL
open science

Étude de l'impact de l'activité traductionnelle sur le phénotype tumoral dans le cancer du côlon

Laura Yazdani

► **To cite this version:**

Laura Yazdani. Étude de l'impact de l'activité traductionnelle sur le phénotype tumoral dans le cancer du côlon. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT031 . tel-01684226

HAL Id: tel-01684226

<https://theses.hal.science/tel-01684226>

Submitted on 15 Jan 2018

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

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

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Biologie du Cancer

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

**Institut de Génomique Fonctionnelle
CNRS UMR5203 – INSERM U1191 – Université de Montpellier**

**Etude de l'impact de l'activité traductionnelle
sur
Le phénotype tumoral dans le cancer du côlon**

**Présentée par Laura YAZDANI
Le 22 septembre 2017**

Sous la direction de Alexandre DAVID

Devant le jury composé de

Jean-Jacques DIAZ, Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Stéphane PYRONNET, Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Julie PANNEQUIN, Chargée de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier

Alexandre DAVID, Chargé de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Biologie du Cancer

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

**Unité de recherche Institut de Génomique Fonctionnelle
CNRS UMR5203 – INSERM U1191 – Université de Montpellier**

**Etude de l'impact de l'activité traductionnelle
sur
Le phénotype tumoral dans le cancer du côlon**

**Présentée par Laura YAZDANI
Le 22 septembre 2017**

Sous la direction de Alexandre DAVID

Devant le jury composé de

Jean-Jacques DIAZ, Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Stéphane PYRONNET, Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Julie PANNEQUIN, Chargée de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier

Alexandre DAVID, Chargé de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

RESUME

Avec près d'un million de nouveaux cas par an à travers le monde, le cancer colorectal est un problème de santé publique majeur. Il est la 2^{ème} cause de mortalité par cancer en France, ce fort taux de mortalité étant relié à un pourcentage important de récidives et de métastases. L'hétérogénéité tumorale, la dissémination, la résistance aux traitements et la récurrence seraient notamment dues à une population particulière de cellules tumorales appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Ces cellules sont dotées d'une capacité d'adaptation extraordinaire et la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant cette plasticité cellulaire est un objectif majeur pour concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques les ciblant spécifiquement.

La synthèse protéique joue un rôle clé dans la carcinogénèse : d'une part, une synthèse protéique élevée est nécessaire à la prolifération des cellules tumorales, d'autre part, la traduction sélective favorise l'expression de protéines pro-oncogéniques. Considéré pendant des années comme un acteur passif de la traduction, le ribosome semblerait jouer un rôle majeur dans la régulation de la synthèse protéique. En effet, des études récentes ont montré que la composition du ribosome était « flexible » et permettrait de favoriser la traduction de certains ARN messager (ARNm). De plus, l'expression de certaines protéines ribosomiques (PR) varie entre le tissu sain et le tissu cancéreux, parfois même entre la tumeur initiale et la métastase.

Ce projet vise à déterminer de quelle manière le contrôle traductionnel intervient dans plusieurs étapes clés du cancer colorectal, en se focalisant tout particulièrement sur l'acquisition ou la perte de propriétés propres aux CSC.

Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires exploités par les CSC afin de résister aux traitements et s'adapter à leur environnement. De plus, ce projet pourrait mettre en évidence un rôle exercé par certaines protéines ribosomiques dans le contrôle traductionnel, à travers la filtration des ARNm par le ribosome. A plus long terme, il pourrait déboucher sur le développement de nouveaux traitements permettant de cibler spécifiquement la machinerie translationnelle des CSC.

Mots clés : Traduction, protéines ribosomiques, cancer, cellules souches cancéreuses.

ABSTRACT

Despite significant advances in diagnostics and treatment, colorectal cancer (CRC) remains a major cause of mortality worldwide and occurrence of metastasis represents the primary cause of death. Metastasis process, chemoresistance and tumor recurrence are powered by a minor subpopulation of tumor cells endowed with self-renewal and multi-lineage differentiation ability: the cancer stem cells (CSC).

Translation of mRNA into protein is the final step in gene-expression process, which mediates the formation of the translome from genomic information. Several mechanisms, such as signaling pathways, translation factors availability, alternative open reading frame and alternative initiation pathways account for real time translome remodeling. Moreover, an emerging concept suggests that ribosome is heterogeneous and can be "reprogrammed". These "specialized ribosomes" would preferentially engage certain mRNA at the expense of others and therefore drive cell phenotype and favor cell adaptation. Many studies have correlated deregulation of both translation machinery composition and activity with cancer initiation and evolution. From that perspective, CSC might well represent a perfect model to test whether the translation apparatus takes an active part in tumor initiation, progression, and metastasis.

Our goal is to demonstrate that protein synthesis is differentially regulated depending on cancer cell subpopulation and determine whether ribosomal heterogeneity could influence tumoral evolution and plasticity. In a long run, we envision the development of novel therapies based on specific targeting of translational control in CSC.

Keywords: Translation, ribosomal proteins, cancer, cancer stem cell.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury : Jean-Jacques Diaz et Stéphane Pyronnet, qui m'ont fait l'honneur de relire cette thèse et d'en être rapporteurs, ainsi que Julie Pannequin en tant qu'examinateur. Jean-Jacques, ce fût un honneur pour moi de vous avoir comme président de ce jury et je vous remercie également de m'avoir accompagné et conseillé durant ces quatre années en tant que membre de mon comité de thèse.

Julie, je reviens tout particulièrement vers toi. Un grand merci pour m'avoir accueillie dans ton équipe afin que j'y réalise mon Master et cette thèse. Tu mets un point d'honneur à ce que règne la joie et la bonne ambiance, ne change rien. Merci pour ton soutien et nos échanges d'ordre professionnel mais aussi personnel, je te dois beaucoup (TMTC). Aujourd'hui je quitte le labo mais aussi Montpellier ; notre prochain rendez-vous est déjà fixé et j'espère qu'il y en aura encore et encore...

Je remercie également mon directeur de thèse, Monsieur Alexandre David, pour son enthousiasme et pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de développer des projets aussi bien novateurs qu'ambitieux.

Je voudrais remercier Armelle Choquet, qui a co-encadré ce travail, mais aussi mes stages de Master 1 et Master 2. J'ai évolué à tes côtés durant 6 années et, malgré ton investissement dans les enseignements, tu as toujours été là pour moi quand il le fallait. La distance et le temps n'effaceront pas le lien que nous avons créé (tu noteras que j'ai attendu ces remerciements pour arriver à te tutoyer).

Un grand merci à tous les membres de l'équipe, ceux qui sont encore là et ceux qui sont déjà parti.

Commençons par les piliers : Christopheeeeer (il faut l'imaginer crié dans le couloir avec pour réponse Yeahmen), je n'ai aucun doute sur le fait que tu as déjà trouvé quelqu'un d'autre avec qui échanger des blagues pourries. Merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et tes conseils. Jean-Marc, nous avons déjà échangé de vive voix à ce sujet et je tiens à te rappeler à quel point j'ai de l'estime pour toi. Je te remercie également pour tes conseils scientifiques et techniques (et aussi pour ta recette de Gravelax de saumon que je n'ai pas encore essayé). Philippe, je te lègue mon petit four afin que tu puisses continuer à faire des huitres gratinées, ce fût un plaisir de traverser ces années à tes côtés. Françoise, c'est aussi un peu grâce à toi si j'ai fait cette thèse, tu m'as encouragée lorsque j'hésitais à m'y engager.

Pour ceux qui sont passés par ici ou qui débutent : Louise, Térésita, Bertrand, Julie G, Jihane, mon Guigui, Olivia, Seb...

Un grand merci aux stagiaires qui ont travaillé mes côtés : Alex, Mehdi, Paul et tout particulièrement à Margaux aka Paupiette qui m'a été d'un immense soutien.

Je remercie également « les gens du bout du couloir », Philippe Jay, chef du département, François pour tes conseils et bien plus encore, Nathalie, Laure dite Pistache, qui a débuté avec nous, et Brrrrruschi qui m'a fait voyager en Italie. Spéciale dédicace à Manu qui est devenu plus qu'une « simple collègue de travail » et qui m'a (entre autres) nourrie pendant la rédaction de ce manuscrit.

Fanny, tu mérites que je te consacre un paragraphe : On a partagé un 1^{er} bureau, puis un autre bureau, puis tu m'as quittée pour aller dans l'autre pays du fromage. En tant que collègue de thèse je ne pouvais espérer mieux et en prime j'ai gagné une véritable amie... du coup merci aussi à WhatsApp qui permet de raccourcir les distances.

Passons maintenant la barrière du 1^{ère} étage Nord.

Tout d'abord je remercie Jean-Philippe Pin, directeur de l'Institut, pour son engagement à fournir un environnement de travail de qualité.

Anne, Carmen et Catherine, merci pour votre efficacité et votre disponibilité.

Merci au personnel de la laverie et « aux Eric » des services informatiques.

Du Nord au Sud : Marga, Sophie, Pedro.

Les gardiens, en poste 24/24, 7/7, 365j/an: le hérisson, le cht'i, le marseillais, le moine, Henri et Olivier. Merci pour votre compagnie et cafés durant les heures de travail décalées...

Au cours de ces années, j'ai pu échanger avec nombreuses personnes dans cet institut ; dans un souci d'équité et afin de n'oublier personne, je vous dis à tous un grand MERCI!

Sortons de l'Institut...

À ma famille, maman, papa, Momo, mes sœurs et beaux-frères préférés, ma mamie et mes neveux et nièces. Merci de m'avoir accompagnée durant ces années et de m'avoir soutenue dans tous mes projets.

Mes amis qui font partie intégrante de ma vie ; j'ai une chance inouïe d'être si bien entourée : Seb, Jess, Nine, Hélène (aka Greg ou Mamour j'te kiffe), Rapha, Nuts, Wanda, Fanny (encore toi !), Roro, Lamasse, Vero, Méline, Nono, Laure, Flo, Vince...

Dr Yazda vous remercie chaleureusement !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	21
AVANT-PROPOS : DU GENE A LA PROTEINE	23
INTRODUCTION	28
1. La traduction des ARNm par le ribosome	30
1.1. Les acteurs de la traduction	30
1.1.1. L'ARN messenger	30
1.1.2. Les ARN de transfert.....	31
1.1.3. Les facteurs de traduction	34
1.1.4. Les ribosomes	34
1.1.4.1. À la découverte des ribosomes	34
1.1.4.2. Composition et structure du ribosome	36
1.1.4.3. Biogenèse du ribosome.....	40
1.1.4.3.1. Généralités	40
1.1.4.3.2. Le nucléole : site principal de la biogenèse des ribosomes	42
1.1.4.3.3. Les grandes étapes de la biogenèse des ribosomes	46
1.1.4.3.4. La synthèse des composants du ribosome.....	46
1.1.4.3.4.1. Le traitement des pré-ARN.....	48
1.1.4.3.4.2. Les modifications covalentes	48
1.1.4.3.4.3. L'assemblage des sous-unités ribosomiques.....	48
1.1.4.3.4.4. Le transport.....	51
1.1.4.3.4.5. Le contrôle qualité et les mécanismes de surveillance.....	51
1.2. Les mécanismes généraux de la traduction	53
1.2.1. L'initiation de la traduction	53
1.2.2. L'élongation	57
1.2.3. La terminaison, la dissociation et le recyclage.....	57
2. Les mécanismes moléculaires du contrôle traductionnel	59
2.1. Les mécanismes de régulation globale de la synthèse protéique	59
2.1.1. L'initiation de la traduction : une étape hautement régulée	59
2.1.1.1. Contrôle de l'assemblage de eIF4F.....	60
2.1.1.2. Disponibilité du complexe ternaire.....	60
2.1.1.3. Contrôle de l'initiation par clivage du facteur eIF4G	61
2.1.2. Régulation de l'élongation	61
2.2. Les mécanismes de régulation spécifiques de la synthèse protéique	61
2.2.1. Les séquences régulatrices sur l'ARNm	62

2.2.1.1.	La coiffe m ⁷ GTP et la queue poly-adénosines.....	62
2.2.1.2.	Les structures en 5'UTR.....	64
2.2.1.2.1.	Sites d'entrée interne du ribosome (IRES).....	64
2.2.1.2.2.	Les structures tige-boucle.....	65
2.2.1.2.3.	Les petits cadres de lecture en amont du cadre principal	65
2.2.1.2.4.	Le ribosome shunting	66
2.2.1.2.5.	Les séquences oligopyrimidiques (TOP).....	66
2.2.1.3.	Les structures en 3'UTR.....	68
2.2.1.3.1.	Les Zipcodes.....	68
2.2.1.3.2.	Les séquences cibles des micro ARN	68
2.2.1.4.	Les modifications de l'ARN	70
2.2.2.	Les régulations exercées par le ribosome	70
2.2.2.1.	Les variations dans la composition du ribosome.....	71
2.2.2.1.1.	Hétérogénéité des protéines ribosomiques	71
2.2.2.1.1.1.	Différents profils d'expression des protéines ribosomiques.....	71
2.2.2.1.1.2.	Protéines alternatives et paralogues	74
2.2.2.1.2.	Hétérogénéité des ARN ribosomiques	75
2.2.2.1.2.1.	Modification des séquences.....	75
2.2.2.1.2.2.	Les modifications post-transcriptionnelles	76
2.2.2.2.	Les fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques	76
2.3.	Les méthodes d'étude de la traduction	78
2.3.1.	Les méthodes d'étude quantitative de la traduction.....	80
2.3.2.	Les méthodes d'étude qualitative de la traduction	82
2.3.3.	Les méthodes d'étude de la répartition spatio-temporelle de la traduction ..	85
3.	Implication du ribosome dans le cancer.....	87
3.1.	Les ribosomopathies	87
3.1.1.	Le syndrome de Treacher Collins	89
3.1.2.	L'anémie de Diamond-Blackfan.....	89
3.1.3.	La dyskeratose congénitale	90
3.2.	Augmentation de la biogenèse du ribosome	90
3.3.	Altération des profils de modifications des ARNr	91
3.4.	Fonctions extra-ribosomiques et cancer.....	92
3.5.	Dérégulation de l'expression des protéines ribosomiques	95
4.	Le cancer colorectal et les cellules souches cancéreuses.....	99
4.1.	Généralités sur le cancer colorectal	99

4.2.	L'instabilité génomique.....	99
4.3.	Organisation générale de l'épithélium intestinal.....	100
4.4.	Des cellules souches cancéreuses à l'origine du cancer colorectal ?	101
4.5.	Caractérisation et propriétés des CSC.....	102
4.5.1.	Caractérisation fonctionnelle des CSC.....	102
4.5.2.	Caractérisation phénotypique des CSC par l'utilisation de marqueurs.....	104
4.6.	Implication des CSC dans les processus métastatiques.....	104
4.7.	Implication des CSC dans la résistance aux traitements et dans la récurrence	108
4.7.1.	Le traitement du cancer colorectal.....	108
4.7.2.	Les mécanismes de résistance.....	109
CONTEXTE SCIENTIFIQUE & OBJECTIFS DE LA THESE.....		112
RESULTATS.....		118
PARTIE I. L'utilisation de certains antibiotiques inhibe la formation de sphères en culture.		120
	Introduction.....	120
	Publication.....	122
	Discussion et perspectives.....	132
PARTIE II. Etude du rôle de RPL13 dans un modèle de cancer colorectal ..		136
1.	Introduction.....	136
1.1.	Généralités sur RPL13.....	136
1.2.	RPL13 et traduction localisée.....	136
1.3.	RPL13 et cancer.....	138
2.	Résultats.....	141
2.1.	La modification de l'expression de RPL13 induit des changements morphologiques.....	141
2.2.	L'inhibition de RPL13 altère la traduction globale et spécifique.....	147
2.3.	Développement et validation de la lignée SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP ..	152
2.3.1.	Introduction au système CRISPR/Cas.....	152
2.3.1.1.	Principe de l'outil d'édition génique CRISPR/Cas.....	152
2.3.1.2.	Principe du dégron inductible par l'auxine (AID).....	155
2.3.2.	Développement de la lignée.....	157
3.	Discussion et conclusion.....	163
PARTIE III : Etude du rôle de RPL22 dans un modèle de cancer colorectal .		169
1.	Introduction.....	169
1.1.	Généralités sur RPL22.....	169

1.2.	Les fonctions spécialisées de RPL22 et de son paralogue RPL22L1	171
1.3.	Implications de RPL22 et RPL22L1 dans la tumorigenèse.....	173
2.	Résultats	175
2.1.	La diminution d'expression de RPL22 entraîne une augmentation de l'expression de son paralogue RPL22L1	175
2.2.	La diminution d'expression de RPL22 n'affecte pas la prolifération des cellules en condition adhérente	178
2.3.	La diminution d'expression de RPL22 n'affecte pas les capacités d'auto-renouvellement des cellules.....	178
2.4.	La diminution de RPL22 augmente les capacités migratoires et l'expression de marqueurs mésenchymateux.....	181
2.5.	La diminution d'expression de RPL22 n'a pas d'effet sur la traduction globale 181	
3.	Discussion et conclusion	185
	CONCLUSION & PERSPECTIVES	191
	MATERIEL & METHODES	198
	Lignées cellulaires	200
	Milieu de culture des cellules adhérentes (DMEM complet).....	200
	Milieu M11 pour culture des cellules en suspension	200
	Composition du supplément N2 (Gibco).....	200
	Liste des plasmides utilisés	201
	Séquences cibles des siRNA.....	202
	Séquences cibles des shRNA	203
	Séquences des guides	203
	Tableau des amorces de qPCR.....	204
	Amorces pour le séquençage des clones issus de la lignée CRISPR.....	204
	Liste des anticorps utilisés pour le western blot et leur dilution	204
	Conditions de culture cellulaire.....	205
	Prolifération cellulaire en condition adhérente.....	205
	Migration en chambre de Boyden.....	205
	Mesure du nombre et de la taille des sphères.....	205
	Extraction des ARN par la méthode du TRIzol	206
	Extraction d'ARN sur colonne Qiagen et RT-qPCR.....	206
	Western-Blot.....	206
	Transduction virale	207
	Transfection des cellules par siRNA.....	207
	Transfection plasmidique des cellules	207

Surface sensing of translation (SUnSET)	208
Profil de polysomes	208
Coussin de sucrose	209
Ribosome profiling	209
Analyse statistique	211
BIBLIOGRAPHIE	212
ANNEXES	245

LISTE DES ABREVIATIONS

3'UTR : 3' Untranslated Transcribed Region	IRES : Internal ribosome entry site
4E-BP : eIF4E binding protein	IRE : Iron responsive element
4EHP : eIF4E homologous proteins	IRP : Iron responsive protéin
5'UTR : 5' Untranslated Transcribed Region	ITGB4 : Integrin Subunit Beta 4
5'TOP mRNA : 5' terminal oligopyrimidine tract mRNA	m⁶A : N ⁶ -methyladenosine
ABCE1 : ATP-binding cassette sub-family E member 1	MAPK : Mitogen-activated protein kinases
ADN : Acide désoxyribonucléique	MDM2 : Mouse double minute 2 homolog
AF : Assembly factors	MDR1 : Multi-Drug Resistance 1
ALDH : Aldéhydes déshydrogénase	miRNA : Micro RNA
APC : Adenomatous polyposis coli	MMR : Mutation mismatch repair
ARN : Acide ribonucléique	MSI : Microsatellite instability
ARNm : ARN messager	mTOR : Mammalian target of rapamycin
ARNr : ARN ribosomique	NES : Nuclear exportation sequence
ARNt : ARN de transfert	NOR : Nucleolus organizer region
ARNt^{Met} : ARNt initiateur méthionine	NLS : Nuclear localization signal
ATF4 : Activating transcription factor 4	PABP : Poly(A) Binding Protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	PAF : Polypose adénomateuse familiale
BCRP : Breast cancer Resistance protein	Pgp : Glycorotéine P
CCR4 : C-C chemokine receptor type 4	PIC : Pre-initiation complex
CDS : Coding DNA sequence	Pol I : ARN polymérase I
CHC : Carcinome hépatocellulaire	Pol II : ARN polymérase II
CIN : Chromosomal instability	PR : Protéines ribosomiques
CPE : Cytoplasmic polyadénylation element	pRB : Retinoblastoma protein
CRC : Cancer colorectal	PTC : Peptidyl Transferase Center
CRM1 : Chromosomal Maintenance 1	PTEN : Phosphatase and tensin homolog
CSC : Cellules souches cancéreuses	PXR : Pregnane Xenobiotic receptor
CTC : Cellules tumorales circulantes	RISC : RNA-induced silencing complex
DBA : Diamond-Blackfan anemia	RNA-Seq : RNA sequencing
DC : Dyskeratosis congenita	RNP : Ribonucleoprotein
DCC : Deleted in colorectal cancer	RPF : RNA protected fragment
DCS : Decoding Site	RPM : Ribopuromycylation method
DFC : Dense fibrillar component	S6K : S6 kinase
DKC1 : Dyskerin Pseudouridine Synthase 1	snoRNAs : Small nucleolar RNAs
eEF : Eukaryotic elongation factors	snoRNP : Small nucleolar ribonucleoprotein particles
eEF2K : Kinase Ca ²⁺ /Calmoduline-dépendante eEF2	SRL : Sarcin-ricin loop
eIF : Eukaryotic initiation factors	SUnSET : Surface sensing of translation
EMT : Epithelial-mesenchymal transition	TCF4 : Transcription Factor 4
eRF : Eukaryotic release factors	TCOF1 : Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1
ETS : External transcribed sequences	TCS : Treacher Collins syndrom
FACS : Fluorescence-activated cell sorting	TIE : Translation inhibitory elements
FBL : 2'-O-méthylatransférase fibrillarine	TOP : Terminal oligopyrimidine tract
FC : Fibrillar center	uORF : Short upstream open reading frame
FGF1 et FGF2 : Fibroblast Growth Factor 1 et 2	VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor A
GAIT : Gamma interferon (IFN-γ)-activated inhibitor of translation	
GC : Granular component	
GDP : Guanosine diphosphate	
HNPCC : Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer	
HSP70 : Heat shock protein 70	
IFN : Interféron gamma	
IGF-1R : Insulin-like growth factor 1 receptor	
ITAF : IRES-transacting factors	
ITS1 : Internal transcribed sequences	
ISR : Integrated stress response	

AVANT-PROPOS : DU GENE A LA PROTEINE

L'expression des gènes désigne l'ensemble des processus biochimiques permettant la synthèse de molécules fonctionnellement actives (ARN et protéines) à partir de l'information génétique. On distingue deux grandes étapes :

- 1- La transcription, au cours de laquelle une portion d'ADN, correspondant à un gène, va être transcrite en ARN,
- 2- La traduction, aboutissant à la synthèse de protéines à partir de l'ARN messager (ARNm).

Bien que toutes cellules d'un organisme pluricellulaire possèdent la même information génétique (Gurdon, 1962), elles vont présenter des caractéristiques phénotypiques très variées. Cette variabilité s'explique par le fait que dans une cellule donnée, et à un instant donné, seuls certains gènes vont être exprimés. En effet, afin de répondre au besoin de la cellule ou de l'organisme, différents mécanismes vont permettre d'augmenter ou de diminuer de manière sélective la production d'ARN ou de protéines. Ces mécanismes, permettant une expression différentielle des gènes, sont fondamentaux puisque, en condition physiologiques comme pathologiques, ils interviennent dans la différenciation cellulaire, la morphogenèse et l'adaptabilité d'un organisme à son environnement. Les mécanismes de régulation, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, vont opérer à différents niveaux de l'expression des gènes, de la transcription jusqu'aux modifications post-traductionnelles (FIGURE. 1).

Le contrôle de l'activité transcriptionnelle des gènes est tout d'abord lié à des modifications d'ordre épigénétiques, dont les caractéristiques sont d'être héréditaires mais réversibles (Bird, 2007; Goldberg *et al.*, 2007). Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est complexé à des protéines histones et non-histones pour former la chromatine. Les modifications épigénétiques peuvent concerner l'ADN lui-même (méthylations) mais également les histones (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination) (Jenuwein e Allis, 2001). Elles vont avoir des conséquences directes sur la structure de la chromatine et par conséquent sur l'expression des gènes. En effet, la chromatine peut présenter plusieurs niveaux de compaction, ce qui permet de distinguer l'hétérochromatine, transcriptionnellement inactive, de l'euchromatine, compatible avec la transcription. Le remodelage de la chromatine est un élément essentiel dans l'activation de la transcription

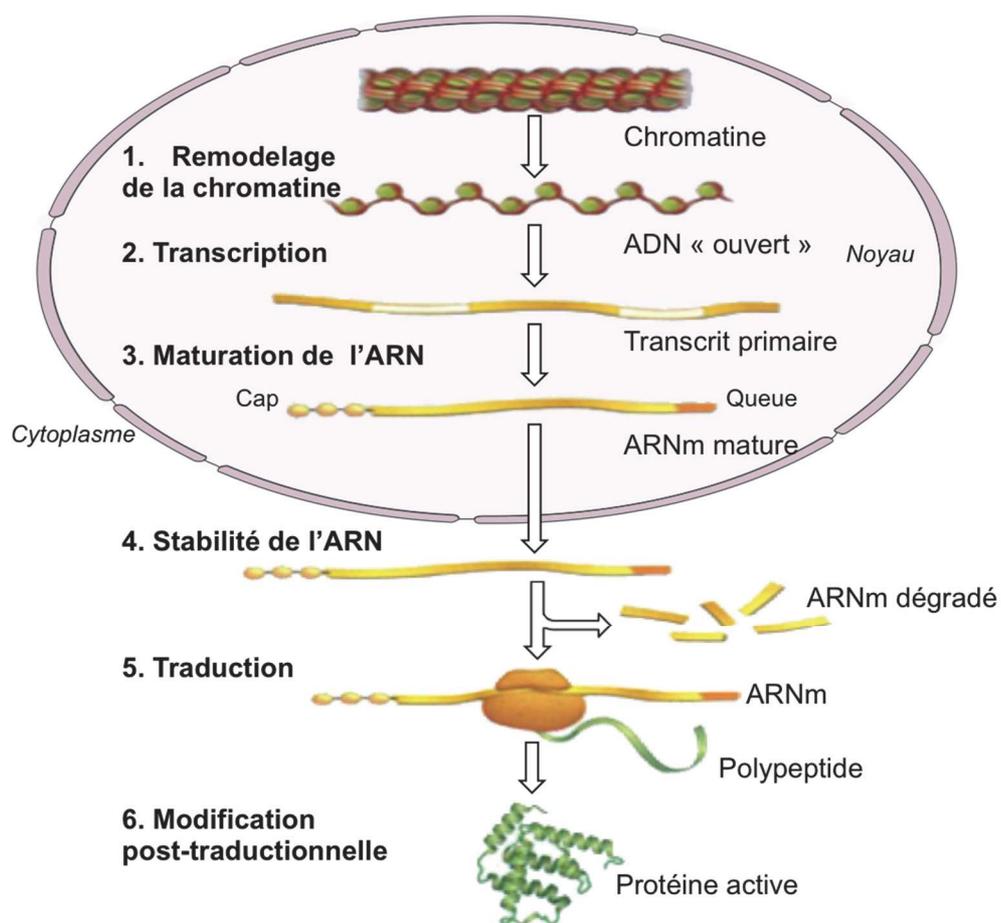


Figure 1 : Le contrôle de l'expression de gènes. Le contrôle de l'expression des gènes intervient à tous les niveaux de la voie d'expression : du gène jusqu'à la protéine fonctionnelle. Il s'exerce par **(1)** le remodelage de la chromatine, **(2)** l'assemblage des complexes de transcription, **(3)** l'épissage, **(4)** la stabilité/dégradation de l'ARNm, **(5)** la régulation traductionnelle et **(6)** les modifications post-traductionnelles.

Adapté de Pearson Education, Inc. 2011

puisque'il permet l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription ainsi qu'aux complexes initiateurs (Kouzarides, 2007).

Les facteurs de transcription constituent des éléments trans-régulateurs qui vont se fixer directement sur l'ADN au niveau des séquences régulatrices auxquelles appartiennent les régions promotrices. Ils peuvent être généraux s'ils ont une activité globale, ou spécifique s'ils augmentent le taux de transcription dans certaines cellules ou en réponse à certains signaux, et ce sont ces facteurs spécifiques que l'on suppose être responsables de la régulation différentielle de l'expression des gènes. Ils vont se fixer sur des séquences de l'ADN dites cis-régulatrices, qui peuvent être activatrices (séquences « enhancer »), inhibitrices (séquences « silencer ») ou isolantes (séquences « insulator »). Ces séquences cis-régulatrices sont classiquement situées en amont du promoteur, mais elles peuvent également se situer dans un intron ou à l'extrémité 3' d'un gène.

Une fois synthétisés, les transcrits primaires vont subir un ensemble de modifications post-transcriptionnelles permettant la maturation des ARN pré-messagers (pré-ARNm) en ARNm matures. La maturation débute par l'ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine triphosphate (m^7GTP) en 5' et d'une queue poly-adénosines (poly-A) en 3'. Ces structures augmentent la stabilité de l'ARNm en empêchant sa dégradation par les exonucléases, facilitent son export vers le cytoplasme et jouent également un rôle fondamental dans l'initiation de la traduction.

Ensuite, lors du processus d'épissage, les introns présents dans les pré-ARNm sont éliminés afin de ne conserver que les exons. L'épissage alternatif, permet de conserver ou d'éliminer certains exons selon diverses combinaisons. Ce processus aboutit à la formation de différents ARNm matures, issus d'un même pré-ARNm, donnant lieu à la synthèse de différents variants protéiques.

Les ARNm matures sont alors exportés dans le cytoplasme où différents éléments vont permettre de contrôler leur stabilité, leur localisation subcellulaire ainsi que leur efficacité de traduction. Par exemple, l'association de facteurs régulateurs agissant en trans à des éléments cis-régulateurs de l'ARNm peut entraîner, soit le recrutement d'une machinerie de dégradation, soit le recrutement de la machinerie de traduction.

Une fois traduites, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles influençant leur stabilité, leur structure, leur fonction et leur localisation. Il peut s'agir de l'addition de groupements fonctionnels (acétylation, glycosylation, méthylation, phosphorylation), d'un groupe peptidique (ubiquitination) ou de l'établissement de ponts disulfures.

La régulation de l'expression des gènes est un processus complexe, intervenant à différents niveaux et impliquant de nombreux acteurs cellulaires.

Pendant des années, l'analyse des transcrits s'est imposée comme étant le reflet de l'expression génique et les études se sont principalement focalisées sur le contrôle transcriptionnel, sans tenir compte des mécanismes de régulations post-transcriptionnelles. Pourtant, afin de maintenir l'équilibre entre régulation dynamique et efficacité énergétique, 60% des protéines exprimées dans une cellule sont contrôlées au niveau traductionnel (Schwanhausser *et al.*, 2011).

Aujourd'hui, il apparaît clair que la régulation traductionnelle est une étape cruciale de l'expression des gènes permettant de contrôler finement l'expression protéique de manière quantitative, qualitative et spatio-temporelle, dans diverses situations biologiques, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques (Kuersten e Goodwin, 2003).

INTRODUCTION

1. La traduction des ARNm par le ribosome

La traduction est un processus fortement conservé au cours de l'évolution, qui consiste à transposer la séquence en nucléotides de l'ARNm en séquence d'acides aminés constituant les protéines. Cette étape de l'expression génique se déroule soit dans le cytosol, soit au niveau du réticulum endoplasmique rugueux; bien que peu documentée et controversée, la synthèse protéique nucléaire a toutefois été décrite (Iborra *et al.*, 2001; Herbert *et al.*, 2002; David *et al.*, 2012). La mitochondrie représente également un autre site de traduction, mais elle ne sera pas abordée dans ce manuscrit. Tous les ARNm sont lus dans le sens 5' vers 3' et les chaînes polypeptidiques sont synthétisées de l'extrémité amine (N-terminale) vers l'extrémité carboxyle (C-terminale). Chaque acide aminé est codé par un codon correspondant à trois bases de l'ARNm.

La traduction comporte trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison ; ce processus fait intervenir une machinerie très élaborée dans laquelle plus de 200 macromolécules sont impliquées (Merrick e Hershey, 1996). Parmi ces acteurs, nous trouvons,

- 1- l'ARNm, portant la séquence codant pour la protéine,
- 2- les ARN de transfert (ARNt), couplés à un acide aminé (Aminoacyl-ARNt) permettant de décoder chaque codon,
- 3- les facteurs protéiques qui assistent les différentes étapes
- 4- le ribosome qui décode l'information portée par l'ARNm et qui catalyse la liaison peptidique entre chaque acide aminé,

Puisqu'il a été au centre de ce travail de thèse, nous détaillerons particulièrement le cœur de la machinerie traductionnelle : le ribosome.

1.1. Les acteurs de la traduction

1.1.1. L'ARN messenger

L'ARNm est une molécule linéaire orientée qui se lit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Elle est constituée de nucléotides, Elle comprend une région codante, *coding DNA sequence*

(CDS), également appelée cadre de lecture ouvert, *open reading frame* (ORF), qui correspond à la portion de l'ARNm qui va être traduite en protéine; la région codante débute par un codon initiateur et se termine par un codon stop. Celle-ci est encadrée par deux régions non codantes, l'une en amont du codon initiateur, appelée *5' Untranslated Transcribed Region* (5'UTR) et l'autre située en aval du codon stop, appelée *3' Untranslated Transcribed Region* (3'UTR) (FIGURE 2).

La région 5'UTR, constituée de 100 à 200 nucléotides (Mignone *et al.*, 2002), porte la coiffe m⁷GTP et ses caractéristiques structurales ont un rôle majeur dans le contrôle de la traduction. Les protéines très régulées, telles que les facteurs de transcription, les proto-oncogènes ou celles impliquées dans les processus de développement, présentent souvent des régions 5'UTR plus longues que la moyenne (Kozak, 1987a). La région 3'UTR, située en aval de la région codante et faisant suite au codon stop, représente en moyenne 800 nucléotides et son extrémité 3' est poly-adénylée formant ainsi la queue polyA. La région 5'UTR contient les séquences régulant la traduction et notamment l'accessibilité à l'AUG initiateur. La région 3'UTR, dont la taille varie fortement avec la complexité du vivant, passant de 200 nucléotides chez la levure à plus de 500 nucléotides chez l'Homme, est quant à elle impliquée dans la régulation de la traduction, de la stabilité, de la dégradation, de la localisation et du stockage des ARNm (Barrett *et al.*, 2012).

1.1.2. Les ARN de transfert

Les ARN de transfert (ARNt) sont des acides ribonucléiques simples brins longs d'environ 70 à 80 nucléotides. Ce sont les ARN non codant les plus abondants, car ils représentent 4 à 10% des ARN cellulaires totaux (Kirchner e Ignatova, 2015). Les ARNt sont des molécules dont la structure tridimensionnelle ressemble à une feuille de trèfle organisée en 4 parties distinctes : le bras accepteur qui permet le chargement d'un acide aminé, la boucle T, la boucle D et la boucle anticodon qui porte le triplet anticodon reconnaissant le codon correspondant au niveau de l'ARNm (Cooper, 2000) (FIGURE 3). Ils sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase III sous forme de pré-ARNt, et vont subir plusieurs modifications avant d'être exportés dans le cytoplasme sous forme d'ARNt matures. Parmi les modifications on retrouve la maturation de l'extrémité 5' par la ribonucléase P, la maturation de l'extrémité 3', qui implique plusieurs ribonucléases, l'épissage des introns et l'addition des résidus CCA à l'extrémité 3' (Phizicky e Hopper, 2010). Les ARNt vont également subir plusieurs modifications au niveau des nucléotides, qui vont jouer un rôle majeur dans leur stabilité, mais également dans la fidélité de la traduction et la maintenance

du cadre de lecture (Hou *et al.*, 2015; Kirchner e Ignatova, 2015). Les ARNt constituent une composante fondamentale du mécanisme de traduction puisque ce sont eux qui délivrent les acides aminés au ribosome. Plusieurs aminoacyl-ARNt synthétases (nucléaires ou cytoplasmiques) vont transférer différents acides aminés sur les ARNt pour former les aminoacyl-ARNt qui seront recrutés sur le ribosome.

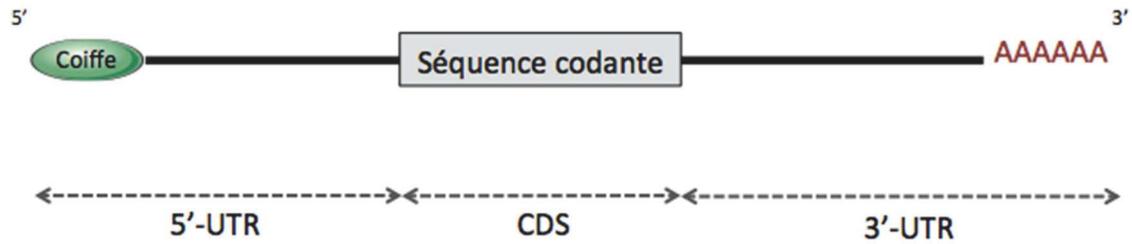


Figure 2 : Représentation schématique d'un ARN messager (ARNm). L'ARNm est une molécule simple brin linéaire orientée de 5' vers 3'. De part et d'autre de la séquence codante (CDS) se trouvent les régions non codantes 3'UTR et 5'UTR. À l'extrémité 5' se trouve la coiffe m^7GTP et à l'extrémité 3' la queue polyA.

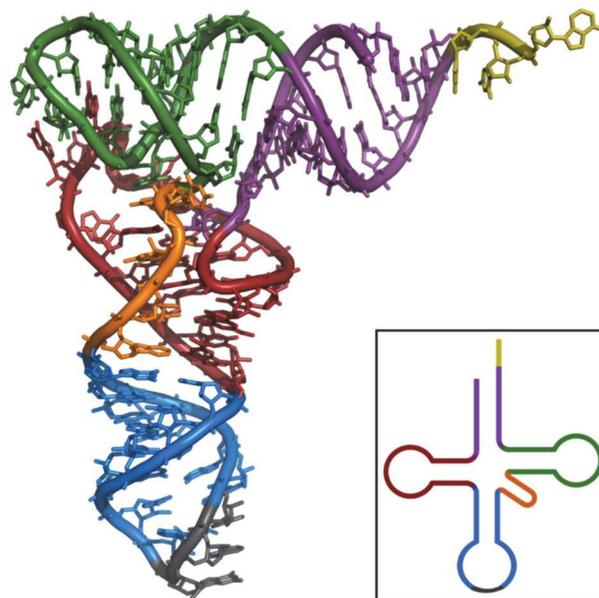


Figure 3 : Structure tridimensionnelle et représentation schématique en forme de feuille de trèfle d'un ARN de transfert (ARNt). En jaune, le bras accepteur; en vert, la boucle T; en rouge la boucle D; en bleu, la boucle de l'anticodon; en gris, l'anticodon.

D'après Yikrazuul 2010

1.1.3. Les facteurs de traduction

Il existe trois types de facteurs de traduction: les facteurs d'initiation de la traduction, *eukaryotic initiation factors* (eIF), qui assistent les deux premières étapes, les facteurs d'élongation, *eukaryotic elongation factors* (eEF), qui interviennent lors de l'allongement des chaînes polypeptidiques, et les facteurs de terminaison, *eukaryotic release factors* (eRF), qui contribuent à l'arrêt et au détachement du ribosome de la protéine néo-synthétisée (Safer, 1989). Les facteurs de traduction sont donc présents à chaque étape du processus, mais c'est principalement au cours de la phase d'initiation qu'ils exercent un rôle important dans la régulation traductionnelle (Dever, Thomas E., 2002; Dever, T. E., 2002; Dever e Green, 2012).

1.1.4. Les ribosomes

1.1.4.1. À la découverte des ribosomes

C'est en 1955, par l'observation de cellules de rat et de poulet au microscope électronique, que Georges Emil Palade mit en évidence dans leur cytosol, un composant particulaire, de petite dimension (100 à 150 Å) et de densité élevée. Ce nouveau composant, présent en abondance dans les cellules glandulaires et dans les cellules à prolifération rapide, se trouve à la fois sur le réticulum endoplasmique et libre dans le cytoplasme ; ainsi sont nées les particules de Palade (Palade, 1955).

Parallèlement, plusieurs études menées par Palade et d'autres scientifiques ont montré que les fractions microsomales étaient constituées de complexes ribonucléoprotéiques associés à des fragments de réticulum endoplasmique, et que ceux-ci étaient impliqués dans la synthèse protéique (Allfrey *et al.*, 1953; Palade e Siekevitz, 1956b; a) ; (Mcquillen *et al.*, 1959).

La technique de fractionnement par centrifugation différentielle, mise au point par A. Claude (Claude, 1941); (Claude, 1946) a ensuite été optimisée afin de permettre d'isoler une fraction riche en ARN, appelée « ultramicrosome » (Barnum e Huseby, 1948) ou « macromolécule de nucléoprotéines » (Petermann e Hamilton, 1952).

En 1958, au cours du 1^{er} symposium de la société de biophysique, Richard B. Roberts proposa le terme « ribosome » pour désigner les particules ribonucléoprotéiques issus de la

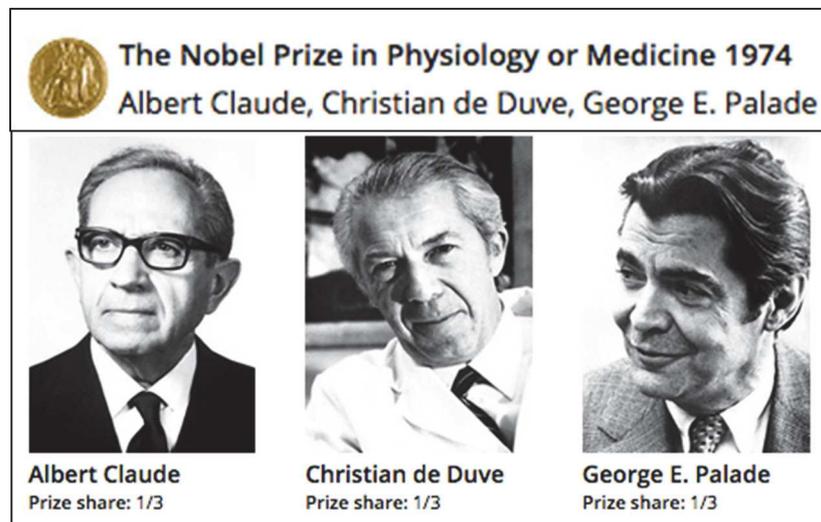


Figure 4 : Le prix Nobel de médecine ou physiologie 1974. Le prix Nobel de médecine ou physiologie a été décerné à Albert Claude, Christian de Duve et George Emil Palade, pour leurs découvertes concernant l'organisation fonctionnelle et structurelle de la cellule.

fraction microsomale (Biophysical Society. Symposium Cambridge e Roberts, 1958). C'est à l'occasion de ce congrès que Mary Petermann fut nommée « the mother of the particle » en hommage à ses travaux consacrés à l'étude des ribosomes (Petermann e Hamilton, 1952; Petermann *et al.*, 1953; Petermann, 1954; Petermann *et al.*, 1954; Petermann e Hamilton, 1957; Hamilton e Petermann, 1959). En 1974, Georges Emil Palade s'est vu attribué le prix Nobel de médecine, pour la découverte des ribosomes (FIGURE 4).

1.1.4.2. Composition et structure du ribosome

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique dont le rôle est de traduire le code génétique en protéines ; chez les eucaryotes, il est composé de 45% d'ARN ribosomiques (ARNr) et de 55% de protéines ribosomiques (PR). Bien que sa taille et sa composition présentent quelques variations au sein des différents domaines du vivant, son organisation générale y est identique. Avec une masse moléculaire comprise entre 3,5 MDa chez la levure et jusqu'à 4,3 MDa chez les organismes supérieurs, le ribosome eucaryote est environ 40 à 50% plus volumineux que son homologue procaryote dont la masse moléculaire est de 2,3 MDa (Melnikov *et al.*, 2012) (TABLEAU 1).

La majorité des ARNr et des protéines ribosomiques qui constituent le ribosome procaryote est conservée chez les eucaryotes et peut être considérée comme le noyau du ribosome (FIGURE 5A ET 5B). L'étude des ribosomes au sein des différentes espèces révèle qu'au cours de l'évolution, des protéines ribosomiques supplémentaires, ainsi que des segments d'expansion au niveau des ARNr ont été ajoutés sans que le noyau préexistant soit modifié (FIGURE 5C ET 5D). Chez les métazoaires, le ribosome gagne encore en complexité par l'ajout d'une protéine ribosomique et de nouveaux segments d'expansion d'ARNr, donnant lieu à deux couches structurelles supplémentaires, avec une couche interne bien organisée recouverte d'une couche externe plus souple (Anger *et al.*, 2013) (FIGURE 5E ET 5F).

Le ribosome eucaryote présente un coefficient de sédimentation de 80 unités *svedberg*, c'est pourquoi il est aussi appelé 80S (70S chez les procaryotes). Les études menées in-vitro montrent qu'en abaissant la concentration du milieu en Mg^{2+} , le ribosome se dissocie en deux sous-unités : une grande 60S (50S chez les procaryotes) et une petite 40S (30S chez les procaryotes) (Chao e Schachman, 1956; Tissieres e Watson, 1958) (FIGURE 6).

Tableau 1 : Composition et caractéristiques générales du ribosome humain.

	Ribosome	Petite sous-unité	Grande sous-unité
Coefficient de sédimentation	80S	40S	60S
Masse moléculaire (Da)	4,3.10 ⁶	2,8.10 ⁶	1,4.10 ⁶
Protéines ribosomiques	80	33	47
ARN ribosomiques	4	18S (1869 nt)	5S (5070 nt) 5,8S (156 nt) 28S (121 nt)

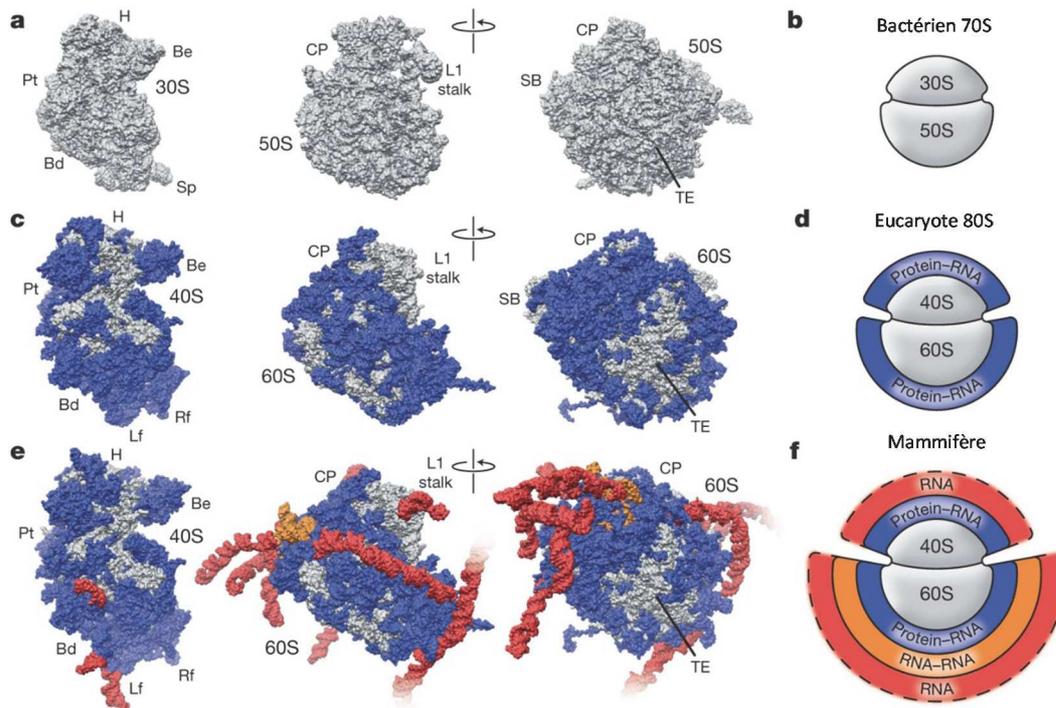


Figure 5 : Modèle d'évolution du ribosome eucaryote. Représentation de la surface (a, c, e) et schématique (b,d,f) du (a,b) ribosome bactérien 70S de *T.thermophilus*, (c,d) ribosome 80S de *S. cerevisiae* avec sa couche protéine-ARN spécifique aux eucaryotes et (e,f) ribosome mammifère de *H. sapiens* avec ses deux couches additionnelles ARN-ARN et ARN seul. Le noyau gris représente le ribosome bactérien, en bleu sont représentées les couches supplémentaires présentes sur le ribosome eucaryote unicellulaire et en rouge et orange les couches spécifiques des ribosomes eucaryotes supérieurs.

Adapté de Anger et al. 2013

La petite sous-unité 40S, composée de l'ARNr 18S et de 33 protéines ribosomiques, contient le centre de décodage de l'ARNm (TABLEAU 1). La structure générale de la sous-unité 40S comprend une tête, un corps et une plateforme. La tête possède un bec, et le corps une épaule ainsi qu'un pied droit et un pied gauche (FIGURE 8). Sur la face de contact avec la grande sous-unité, se trouve l'hélice 44 de l'ARNr 18S qui contient le site de décodage de l'ARNm, *Decoding Site* (DCS) (Spahn *et al.*, 2001).

La grande sous-unité 60S, portant l'activité peptidyl-transférase, catalysant les liaisons peptidiques entre les acides aminés, se compose de l'ARNr 5S, 5.8S, 28S et de 47 protéines ribosomiques (Wool, 1979) (tableau 1). Sa structure générale comprend une protubérance centrale ainsi que la tige L1 et la tige P (FIGURE 8). L'activité peptidyltransférase, aboutissant à la formation des liaisons peptidiques, est portée par l'ARNr 28S au niveau du site catalytique de transfert des groupes peptidiques, *Peptidyl Transferase Center* (PTC). L'ARNr 28S, de par son activité enzymatique est qualifié de ribozyme.

Le ribosome 80S présente trois sites distincts de fixation de l'ARNt: le site A (pour aminoacyl-ARNt), occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique ; le site P (pour peptidyl-ARNt), occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé lié à la chaîne polypeptidique naissante ; le site E (pour *exit*), permettant la libération de l'ARNt désacylé (FIGURE 7).

Depuis plus de 50 ans, les ribosomes ont fait l'objet d'études structurales ayant révolutionné notre compréhension du mécanisme de biosynthèse des protéines.

La forme du ribosome bactérien et son organisation en deux sous-unités asymétriques ont été observées pour la première fois à partir d'image de microscopie électronique à coloration négative (Vasiliev, 1974; Lake, 1976).

Par la suite, les approches par cryo-microscopie électronique (Frank *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 1995; Agrawal *et al.*, 1996; Agrawal *et al.*, 1999; Frank, 2017) et plus récemment par cryo-microscopie électronique à une particule ont permis d'obtenir de précieuses informations sur la structure, les modes de liaisons et les changements de conformation du ribosome au cours de son cycle de travail (Schmeing e Ramakrishnan, 2009).

La détermination de la structure atomique du ribosome a été un véritable défi compte tenu de sa taille et de sa grande complexité. En 2001, la première structure haute-résolution par cristallographie au rayon X du ribosome fonctionnel de *Thermus thermophilus*, a permis la visualisation de l'interface et du contact entre les deux sous-unités, du cheminement pris par l'ARNm et de la position des ARNt (Yusupov *et al.*, 2001; Yusupova *et al.*, 2001). Celle

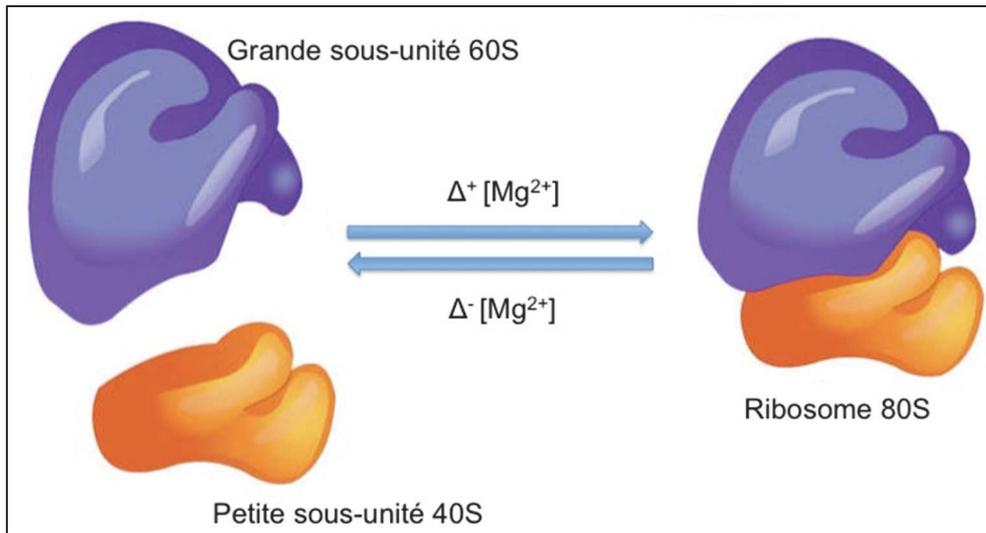


Figure 6: Représentation schématique de la structure du ribosome en sous-unités et influence de la concentration en magnésium. Les deux sous-unités ribosomiques, dont les constantes de sédimentation sont respectivement de 40S et de 60S, s'associent pour former le ribosome dont la constante de sédimentation est de 80S. Cette association est réversible et dépendante de la concentration en ions magnésium Mg^{2+} .

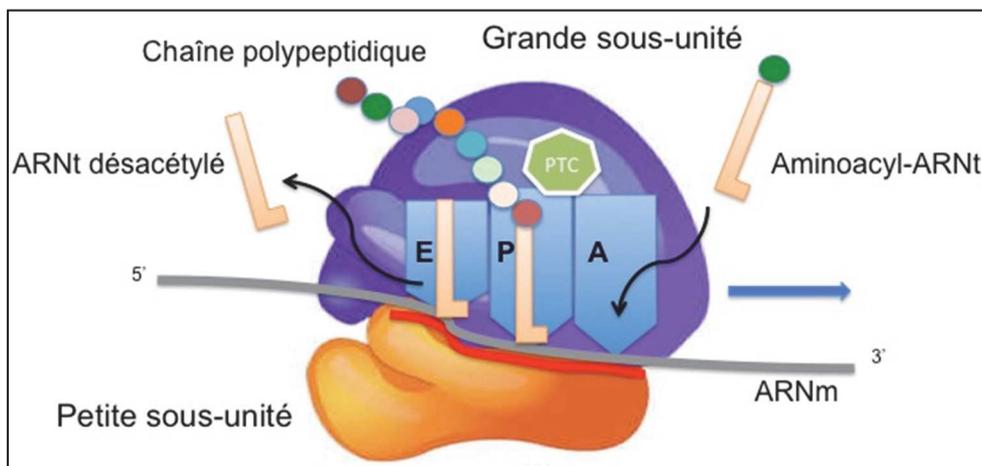


Figure 7: Représentation schématique du ribosome en cours de traduction incluant les sites fonctionnels. Au niveau de la petite sous-unité ribosomique se trouve le site de décodage de l'ARNm (en rouge). La grande sous-unité ribosomique comprend le site catalytique de transfert des groupes peptidiques (PTC) (représenté par un losange vert), ainsi que le site A dans lequel se positionne l'aminoacyl-ARNt qui entre dans le ribosome, le site P dans lequel se trouve l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et le site E dans lequel se trouve l'ARNt désacétylé avant qu'il ne se dissocie de l'ARNm et du ribosome.

de son homologue eucaryote a été plus difficile à obtenir, et c'est après de longs travaux de purification et de stabilisation, qu'une équipe de chercheurs français a obtenu en 2010 la structure atomique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Ben-Shem *et al.*, 2010). Ils confirmèrent l'existence de mouvements au sein des sous-unités du ribosome, mais également l'une par rapport à l'autre, révélant la dynamique de pivotement à l'origine du mécanisme de synthèse des protéines. La structure du ribosome humain, à une résolution quasi-atomique, a pu être obtenue en 2015 grâce à l'utilisation de la cryo-microscopie électronique à une particule associée à des outils de reconstruction 3D (Khatter *et al.*, 2015) (FIGURE 8). Cette étude a fourni des détails sans précédent sur des régions fonctionnellement clés telles que le site catalytique de transfert des groupes peptidiques, *peptidyl transferase center* (PTC) et la région de décodage de l'ARNm (Khatter *et al.*, 2015).

1.1.4.3. Biogenèse du ribosome

1.1.4.3.1. Généralités

La biogenèse des ribosomes est un processus très hiérarchisé, qui comprend de nombreuses étapes, incluant la production des quatre ARN ribosomiques (5S, 5.8S, 18S et 28S), leur assemblage aux 80 protéines ribosomiques (PR), et qui aboutit à la formation des deux sous-unités ribosomiques.

Elle mobilise une quantité substantielle des ressources énergétiques de la cellule; par exemple, chez la levure en prolifération, la synthèse des ARNr représente 60% des transcrits totaux, et 50% de la transcription effectuée par l'ARN polymérase II (Pol II) est dédiée aux protéines ribosomiques (Warner, 1999). De plus, les étapes d'assemblage et de maturation font intervenir près de 200 facteurs protéiques (Woolford e Baserga, 2013) (jusqu'à 4500 chez l'Homme (Ahmad *et al.*, 2009)) dont des enzymes consommatrices d'énergie telles que des GTPase, des protéines kinases, des hélicases dépendantes de l'ATP et des ATPase (Strunk e Karbstein, 2009). Ce processus, essentiellement réalisé dans le nucléole, doit être effectué avec un rendement considérable, puisqu'il conduit à l'assemblage de plus de 2000 ribosomes en une minute (Warner, 1999).

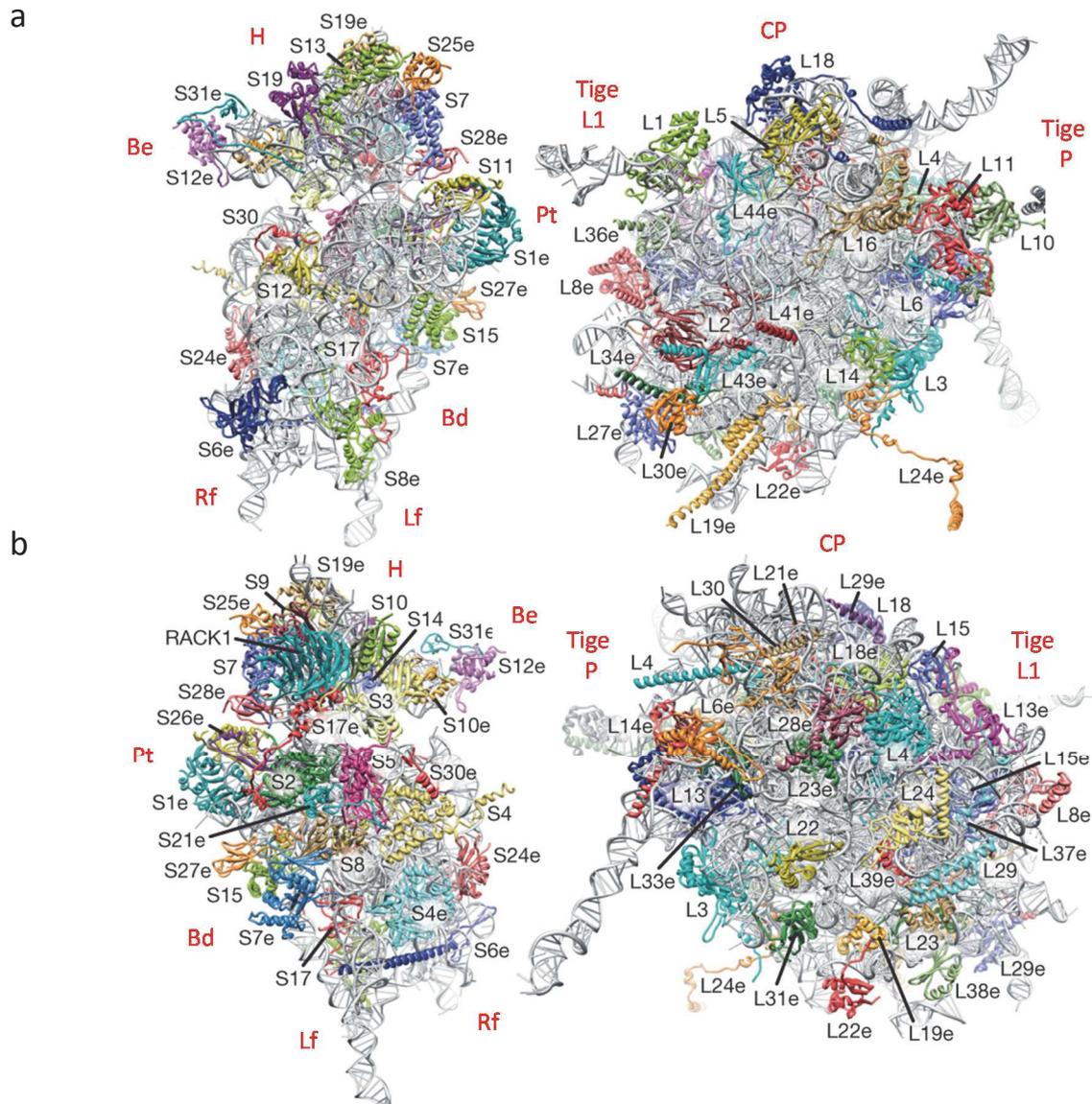


Figure 8 : Structure cristallographique des sous-unités du ribosome humain. (a) Vue de l'interface et (b) vue du solvant de la grande sous-unité à gauche et de la petite sous-unité à droite. Les domaines sont indiqués en rouge avec pour la grande sous-unité, la tête (H), le bec (Be), la plateforme (Pt), l'épaule (Bd), le pied gauche (Lf), le pied droit (Rf), et pour la petite sous-unité, la protubérance centrale (CP) et les tiges L1 et P.

Adapté de Anger et al. 2014

Les études concernant l'assemblage des ribosomes ont débuté au début des années 70, par la reconstitution *in vitro* des sous-unités du ribosome bactérien à partir des protéines et des ARN ribosomiques (Held *et al.*, 1973; Nierhaus e Dohme, 1974). Concernant les ribosomes eucaryotes, au cours des 25 dernières années, la biogenèse a été principalement étudiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui est un modèle d'étude présentant de nombreux avantages de par la facilité de mise en œuvre des études biochimiques, génétiques, moléculaires et cellulaires. Les récentes études menées chez le mammifère ont montré que les mécanismes impliqués dans la biogenèse des ribosomes eucaryotes sont globalement bien conservés (Ben-Shem *et al.*, 2010; Wild *et al.*, 2010; Khatter *et al.*, 2015) ; il existe toutefois des différences entre la levure et les eucaryotes supérieurs, tant au niveau structural que des acteurs requis : nombre de protéines ribosomiques, taille des ARNr, structure du nucléole (Shaw, 2001), protéome nucléolaire (Wild *et al.*, 2010; Mullineux e Lafontaine, 2012; Tafforeau *et al.*, 2013).

La biogenèse des ribosome est un mécanisme fondamental, indispensable à toute forme de vie, étroitement régulé et intimement lié aux conditions de croissance cellulaire ainsi qu'aux stress environnementaux (Warner, 1999). Toute dérégulation dans ce processus va avoir des conséquences majeures sur la cellule ou sur l'organisme puisqu'il peut conduire au développement de pathologies appelées ribosomopathies (Freed *et al.*, 2010; Narla e Ebert, 2010). Ces graves maladies humaines résultent de mutations dans les protéines ribosomiques (PR) ou dans les facteurs d'assemblages des ribosomes, *assembly factors* (AF). Ces pathologies sont caractérisées par des anomalies hématologiques, des problèmes au niveau du squelette et une susceptibilité accrue au cancer. Cet aspect pathologique sera développé en détail ultérieurement (*chapitre 3.1*).

1.1.4.3.2. Le nucléole : site principal de la biogenèse des ribosomes

En raison de sa densité importante et de son indice de réfraction, le nucléole a été un des premiers compartiments subcellulaires découvert par les microscopistes du 19^{ème} siècle. Plus tard, le développement des techniques de coloration histologique a permis de révéler que la composition chimique du nucléole était distincte de celle du nucléoplasme environnant puisqu'il contient de l'ARN. Puis, au milieu des années 60, des expériences d'hybridation *in-situ* ont révélé la présence de gènes codant pour les ARNr (ADNr) au niveau du nucléole

(Nurnberger; Perry, 1962; Ritossa e Spiegelman, 1965). En se basant sur ces résultats ainsi que sur la caractérisation biochimique des composants nucléolaires, il a été proposé que le nucléole est le site principal de la biogenèse des ribosomes (Brown e Gurdon, 1964; Rothblum, 1986). En dehors de cette fonction, le nucléole est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que dans l'activité du facteur de transcription et suppresseur de tumeur p53 (Visintin e Amon, 2000).

Le nucléole est un sous-compartiment du noyau, non délimité par une membrane et dont le nombre, l'organisation et la taille sont directement liés à l'espèce et à l'activité métabolique des cellules (Popp e Wachtler, 1983; Mélése e Xue, 1995). Il s'agit d'une structure dynamique, visible au cours de l'interphase chez les eucaryotes supérieurs, et qui disparaît pendant la mitose ; chez la levure, le nucléole est présent tout au long du cycle cellulaire.

Les nucléoles s'organisent autour d'une région chromosomique, appelée région organisatrice du nucléole, *nucleolus organizer region* (NOR), contenant les unités ribosomiques correspondant aux gènes codant pour les ARNr 5.8S, 18S et 28S (Mcclintock, 1934). Il s'agit de gènes répétés en tandem dont le nombre varie de 100 à plusieurs centaines chez les mammifères ; chez l'Homme, il existe 400 copies qui sont regroupées sur les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 (Birch e Zomerdiik, 2008).

Chez les eucaryotes supérieurs, l'observation au microscope électronique des nucléoles permet de distinguer trois composants principaux : le centre fibrillaire, *fibrillar center* (FC) entouré par le composant fibrillaire dense, *dense fibrillar component* (DFC), ces deux composants étant eux même enchâssés dans le composant granulaire, *granular component* (GC). Chez la levure, nous retrouvons une organisation bipartite, le nucléole étant dépourvu de centre fibrillaire (Thiry e Lafontaine, 2005) (FIGURE 9).

Chaque compartiment occupe une fonction bien définie: la transcription des ARNr a lieu à la frontière entre le FC et le DFC, le traitement précoce et l'assemblage se déroulent dans le DFC, puis les particules pré-ribosomiques rejoignent le GC (Milkereit *et al.*, 2001; Cheutin *et al.*, 2002; Lei e Silver, 2002).

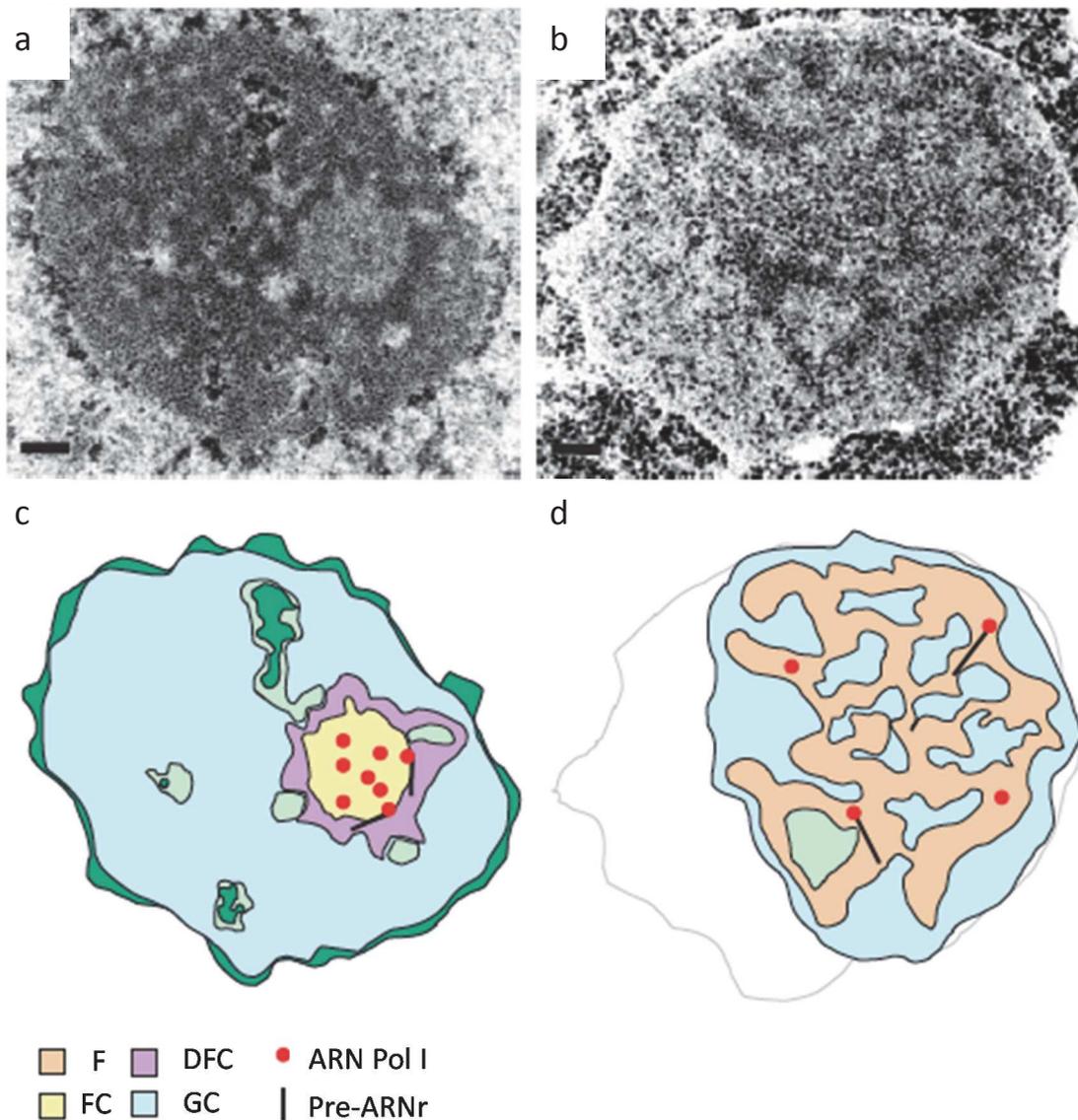


Figure 9 : Comparaison de l'organisation du nucléole de la cellule humaine et de la levure *S. cerevisiae*. Observation réalisée en microscopie électronique. **(a)** Nucléole humain. **(b)** Noyau et nucléole de *S. cerevisiae*. Echelle : 0,2 μ m. **(c)** et **(d)** Représentation schématique de l'organisation nucléolaire de la cellule humaine et de la levure. F : composant fibrillaire ; FC : centre fibrillaire ; DFC : composant fibrillaire dense ; GC : composant granulaire ; l'ARN polymérase I est représentée par le point rouge ; le pré-ARNr 35S est représenté par une barre noire ; sur la partie (d) l'enveloppe nucléaire est représentée par une ligne grise.

Adapté de Thiry and Lafontaine 2005

Les altérations de la biogenèse des ribosomes peuvent induire un stress nucléolaire, se traduisant par une réorganisation du nucléole avec perte de la compartimentation. Les altérations de l'aspect du nucléole sont retrouvées dans plusieurs maladies humaines et notamment le cancer (Orsolich *et al.*, 2016).

1.1.4.3.3. Les grandes étapes de la biogenèse des ribosomes

Chez les eucaryotes, à l'exception de l'ARNr 5S, le processus de biogenèse commence par la synthèse du précurseur des ARNr (pré-ARNr) dans le nucléole, où il va être modifié, replié et traité. Ces étapes sont catalysées par de petits ARN nucléolaires, *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) qui sont les éléments actifs des petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires, *small nucleolar ribonucleoprotein particles* (snoRNP). Tous les composants sont ensuite assemblés et exportés vers le cytoplasme. Tout au long du processus il existe des étapes de contrôle qualité (Lafontaine, 2010).

La biogenèse des ribosomes peut donc être divisée en six étapes importantes : la synthèse des composants, le traitement des pré-ARN, les modifications covalentes, l'assemblage, le transport et le contrôle qualité (FIGURE 10).

1.1.4.3.4. La synthèse des composants du ribosome

Les composants nécessaires à la biogenèse des ribosomes sont les ARN ribosomiques (ARNr), les protéines ribosomiques (PR), les facteurs d'assemblage, *assembly factors* (AF) et les petits ARN nucléolaires, *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) ; dans ce processus, les trois sortes d'ARN polymérase (Pol I, II et III) interviennent.

Comme nous l'avons vu précédemment, au cœur des ribosomes eucaryotes nous trouvons quatre sortes d'ARNr : le 28S, le 18S, le 5.8S et le 5S. Les trois premiers sont issus de la maturation d'un même précurseur polycistronique appelé 47S chez l'Homme (37S chez la levure), synthétisé dans le nucléole par l'ARN polymérase (Pol) I (Mullineux e Lafontaine, 2012). L'ARNr 5S, quant à lui, est transcrit séparément dans le noyau par l'ARN Pol III et les gènes codant les 80 PR et les AF sont transcrits par la Pol II.

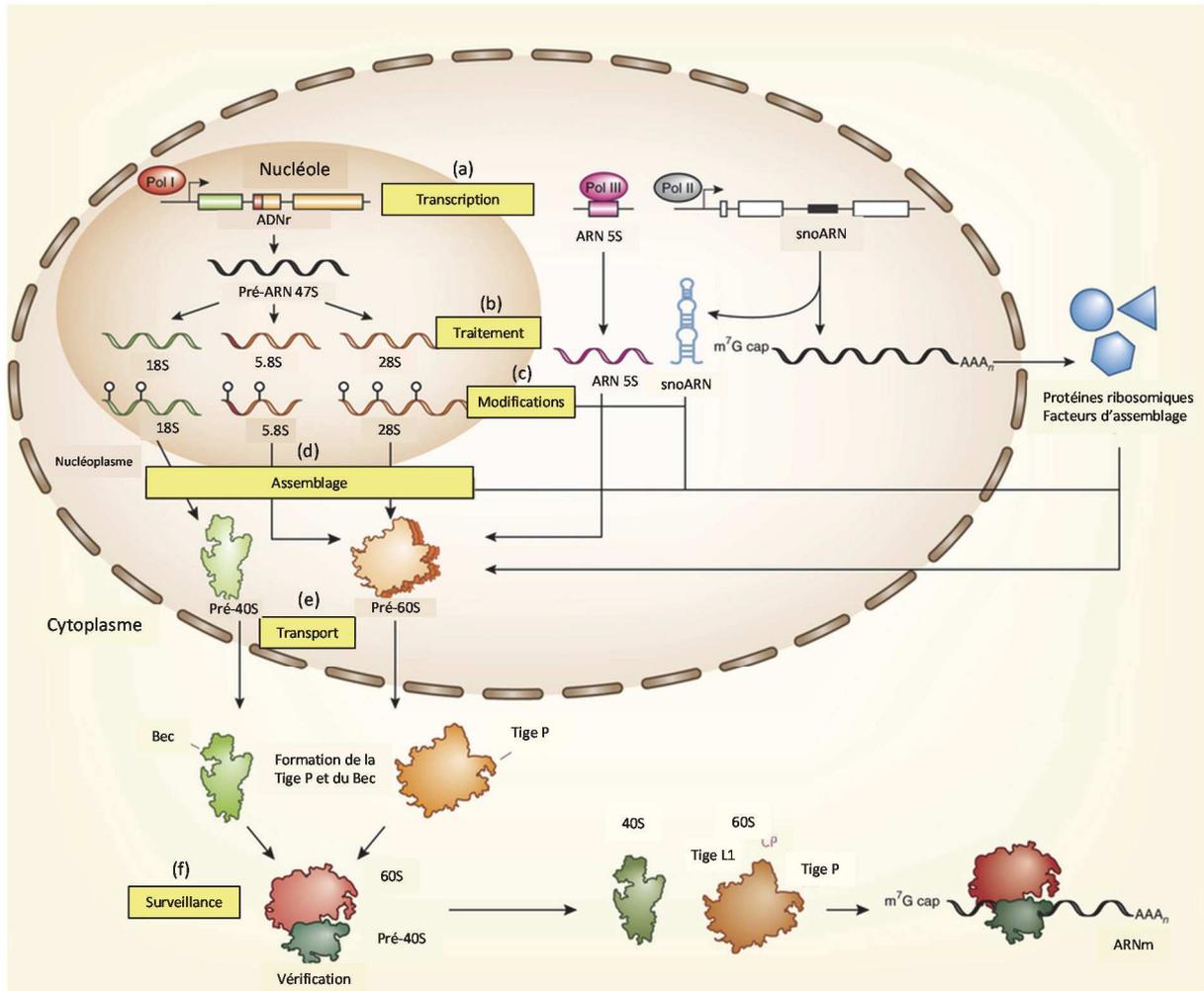


Figure 10 : Représentation schématique des six grandes étapes de la biogenèse des ribosomes. (a) Transcription des composants (ARNr, ARNm codant les protéines ribosomiques (PR), les facteurs d'assemblage (FA), et les snoARN) ; (b) Traitement (clivages des pré-ARNr) ; (c) Modification des pré-ARNr, RP et FA ; (d) Assemblage ; (e) Transport (Import nucléaire des PR et FA ; Export des pré-ribosomes dans le cytoplasme) ; (f) Contrôle qualité et surveillance.

Adapté de Lafontaine 2014

1.1.4.3.4.1. Le traitement des pré-ARN

Sur le précurseur 47S on retrouve, dans les régions non codantes, les espaceurs externes en 5' et 3', *external transcribed sequences* (5'-ETS et 3'-ETS), et les espaceurs interne 1 et 2, *internal transcribed sequences* (ITS1 et ITS2). Le traitement du transcrit primaire 47S comprend une succession de clivages endonucléolytiques et exonucléolytiques afin de donner naissance aux ARNr matures. Dans les cellules humaines, le traitement du transcrit primaire 47S peut suivre deux voies différentes (FIGURE 11).

1.1.4.3.4.2. Les modifications covalentes

Au cours de leur maturation, les pré-ARNr subissent de nombreuses modifications. Sur les ARNr humains, 95 pseudo-uridylation, 105 méthylations de riboses et 10 méthylations de bases nucléotidiques ont été répertoriées (Decatur e Fournier, 2002). Ces modifications sont majoritairement localisées à proximité des sites fonctionnels du ribosome.

Les pseudo-uridylation et les méthylations des riboses sont catalysées par la dyskérine et la fibrillarine, et guidées par les snoARN au sein de complexes RNP (Watkins e Bohnsack, 2012). Les méthylations des bases nucléotidiques des ARNr 18S et 28S sont catalysées par des enzymes ne nécessitant pas la présence de snoARN.

Les PR subissent également des modifications post-traductionnelles ; il peut s'agir de méthylations, acétylations, phosphorylations ou hydroxylations. Chez la levure, au moins 16 PR sont méthylées ou acétylées (Lee *et al.*, 2002), et chez l'Homme au moins 11 protéines, appartenant à la grande sous-unité (Odintsova *et al.*, 2003), ainsi que la plupart des protéines de la petite sous-unité, sont soumises à des modifications post-traductionnelles (Yu *et al.*, 2005).

1.1.4.3.4.3. L'assemblage des sous-unités ribosomiques

L'assemblage des ribosomes eucaryotes débute dans le nucléole et se termine dans le cytoplasme après export et maturation finale des deux sous-unités 40S et 60S.

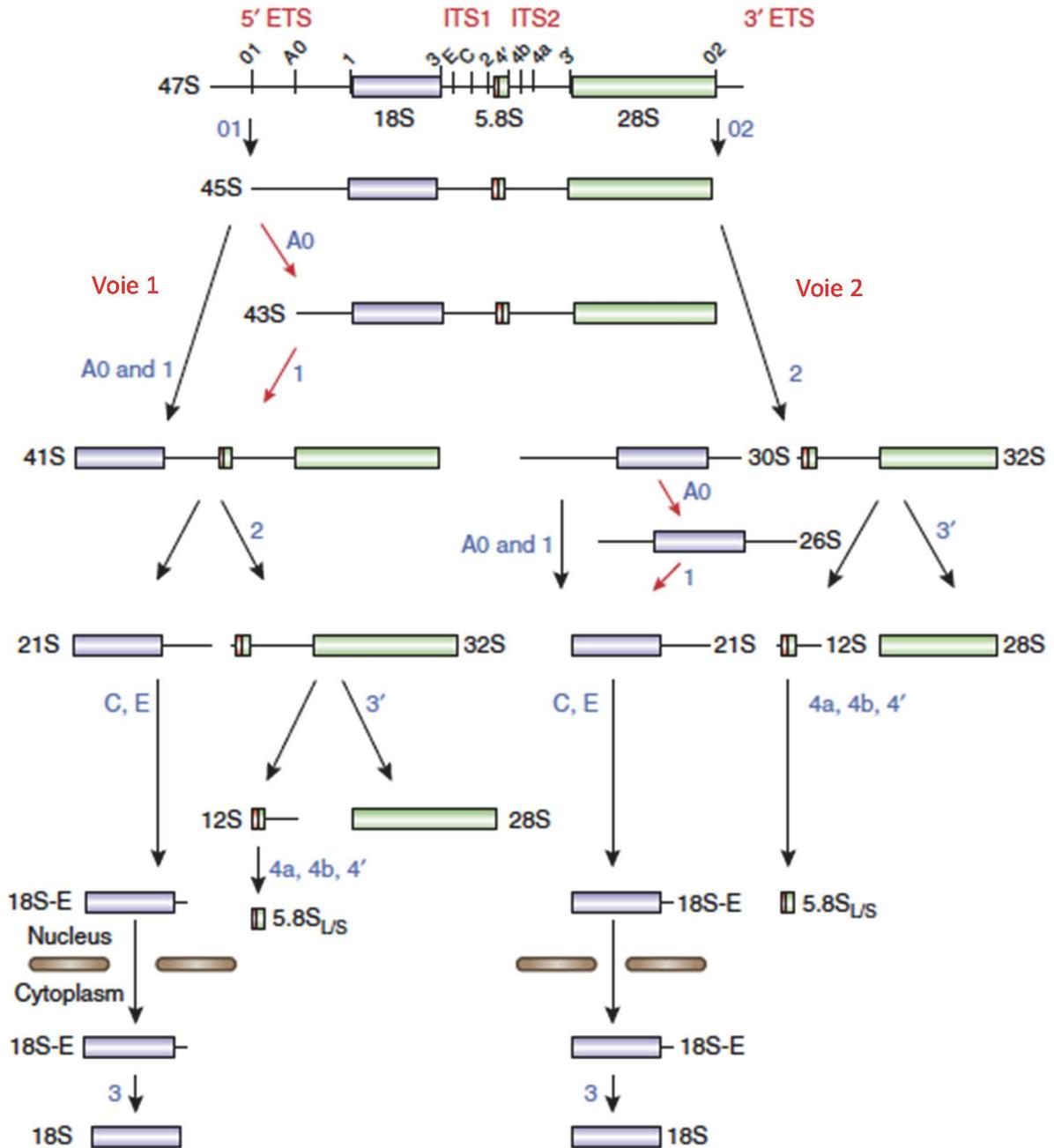


Figure 11 : Représentation schématique des voies de maturation des pré-ARNr dans les cellules humaines. Les ARNr 8S, 5.8S et 28S sont produits à partir d'un seul transcrite (47S). Les séquences des ARNr matures sont flanquées des espaceurs externes (5'-ETS et 3'-ETS) et internes (ITS1 et ITS2). Les sites de clivage sont indiqués en noir sur le précurseur 47S et les étapes de clivage sont notées en bleu. Le précurseur 47S est clivé au niveau des sites 01 et 02 situé de part et d'autre de la molécule pour générer le pré-ARNr 45S qui peut être traité selon deux voies (voie 1 et voie 2), la voie 1 représente la voie mineure.

Adapté de Lafontaine 2014

Les PR, qui participent à la structure du ribosome, et les facteurs trans, qui assistent la formation des sous-unités, sont importés du cytoplasme vers le nucléole pour être assemblés au pré-ARN au cours de sa transcription (Gallagher *et al.*, 2004). Il en résulte une particule présentant un coefficient de sédimentation de 90S, correspondant à un précurseur commun aux deux sous-unités (Trapman *et al.*, 1975). Cette particule est ensuite clivée pour produire deux particules 43S et 66S, précurseurs des sous-unités matures 40S et 60S, qui vont subir des voies de maturation distinctes.

Après traitement des pré-ARNr dans le noyau, la sous-unité pré-60S, contenant les ARNr matures 28S, 5.8S et 5S, est exportée vers le cytoplasme où elle va subir une maturation cytoplasmique. Enfin, la sous-unité cytoplasmique pré-60S doit être libérée des protéines non ribosomales qui lui sont associées afin d'aboutir à une sous-unité 60S fonctionnelle.

La maturation de la sous-unité pré-40S est moins complexe, celle-ci est rapidement exportée dans le cytoplasme, au niveau duquel les dernières étapes de maturation du pré-ARN 18S ont lieu (Léger-Silvestre *et al.*, 2004).

La majorité des facteurs trans qui s'associent aux particules pré-ribosomiques lors des étapes précoces de la biogénèse sont libérés et recyclés avant l'exportation nucléaire. Cependant, certains facteurs restent associés aux particules lorsqu'ils entrent dans le cytoplasme. La libération et le recyclage de ces facteurs, l'assemblage des quelques protéines ribosomiques restantes, ainsi que le traitement final des ARNr constituent les étapes de maturation cytoplasmique (Zemp e Kutay, 2007).

L'assemblage des PR sur l'ARNr suit une séquence précise et des groupes de PR ont pu être établis sur la base de leur assemblage à des étapes précoces, intermédiaires ou tardives (O'donohue *et al.*, 2010; De La Cruz *et al.*, 2015). Des études menées chez la levure et chez l'Homme ont permis de mettre en évidence le rôle majeur joué par les PR dans le traitement des pré-ARNr et la maturation des sous-unités ribosomiques. En effet, dans le cas où l'association des PR à l'ARNr est compromise il va y avoir, en fonction de la PR considérée, une accumulation des pré-ARN à différents stades de maturation, accompagnée dans certains cas d'altérations visibles du nucléole (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Robledo *et al.*, 2008; Nicolas *et al.*, 2016).

1.1.4.3.4.4. Le transport

L'importation nucléaire des protéines ribosomiques, ainsi que celle des facteurs d'assemblage, est dépendante de la reconnaissance du signal de localisation nucléaire, *nuclear localization signal* (NLS) par des protéines de la famille des importines. Les importines interagissent avec les nucléoporines, composants du complexe de pore nucléaire, pour permettre le passage du complexe importine-cargo du cytoplasme vers le noyau (Rout *et al.*, 1997).

Au cours de leur maturation, les sous-unités ribosomiques quittent le nucléole puis passent à travers les complexes de pores nucléaires pour rejoindre le cytoplasme. L'exportation des particules pré-ribosomiques 40S et 60S dépend de la GTPase RAN et du récepteur d'exportation nucléaire CRM1/Exportin1 qui reconnaît une séquence signal d'exportation nucléaire, *nuclear exportation sequence* (NES) pouvant être portée par la molécule cargo elle-même ou par un facteur trans établissant l'interaction entre le récepteur et la molécule cargo.

Il a été montré chez la levure comme chez les vertébrés, que l'export du pré-ribosome 60S était dépendant de l'interaction entre la protéine NMD3, qui lui est associée, et le récepteur CRM1 (Ho *et al.*, 2000; Robledo *et al.*, 2008).

Chez la levure, l'export du pré-ribosome 40S dépend deux facteurs d'interaction trans contenant la séquence NES, Ltv1p et Dim2p (Ho *et al.*, 2000); cependant, chez les vertébrés la protéine adaptatrice n'a pour l'heure pas été identifiée.

1.1.4.3.4.5. Le contrôle qualité et les mécanismes de surveillance

Le ribosome est une macromolécule dont le fonctionnement est étroitement lié à sa structure et toute variation dans sa composition va entraîner des altérations de ses fonctions. L'apparition de graves pathologies a pu être corrélée à des modifications de la biogenèse des ribosomes (Freed *et al.*, 2010). Sachant qu'une cellule en croissance est amenée à synthétiser des milliers de ribosomes par minute (Warner, 1999), la présence de mécanismes de surveillance est indispensable afin d'assurer l'intégrité des ribosomes et une traduction fidèle des ARNm en protéines.

Ces mécanismes de contrôle qualité et de surveillance sont retrouvés tout au long du processus de biogenèse des ribosomes.

Pour être transportés dans le cytoplasme, les précurseurs doivent avoir atteint un certain stade de maturation; le contrôle de cette maturation est assuré en partie par l'assemblage des PR (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Le pré-ribosome 40S ne peut être exporté du noyau que lorsque les protéines constituant la tête sont assemblées sur la particule (Léger-Silvestre *et al.*, 2004). Quant à l'export du pré-ribosome 60S, il est dépendant de la formation du tunnel de sortie (Bradatsch *et al.*, 2012), ainsi que celle de la boucle sarcine-ricine, *sarcin-ricin loop* (SRL), région essentielle à la fonction du facteur d'élongation eEF2, et à la liaison de la protéine adaptatrice NMD3 (Sengupta *et al.*, 2010).

Du côté cytoplasmique, afin d'empêcher une traduction prématurée par les précurseurs des sous-unités, les facteurs d'assemblage vont bloquer les interactions entre les sous-unités d'une part et entre les sous-unités et les ARNm et ARNt d'autre part (Demoinet *et al.*, 2007; Panse e Johnson, 2010). Il a également été suggéré que l'association de facteurs trans, présentant des homologies avec les facteurs de traduction, permettrait de contrôler l'intégrité structurale des sites de liaison avant que les ribosomes ne s'engagent en traduction (Senger *et al.*, 2001).

Le contrôle qualité va aussi s'exercer par la dégradation des ribosomes matures et intermédiaires identifiés comme non fonctionnels (Lafontaine, 2010). Les ribosomes matures défectueux vont rester bloqués sur l'ARNm, induisant ainsi l'activation des voies de dégradation (Shoemaker e Green, 2012). Ces voies sont incapables de distinguer un ribosome mal assemblé d'un ARNm défectueux, ce qui va entraîner la dégradation concomitante de l'ARNm.

1.2. Les mécanismes généraux de la traduction

La traduction comporte plusieurs processus biochimiques intervenant dans la formation d'une chaîne protéique au cours du décodage de l'ARNm. Ces processus sont complexes, ils font intervenir les ribosomes qui se déplacent le long de l'ARNm, depuis un signal marquant le début du processus, jusqu'à un autre signal au niveau duquel le ribosome se détache de l'ARNm avant de se dissocier en deux sous-unités, libérant ainsi la chaîne protéique qu'il vient de synthétiser. Chaque cycle de traduction peut ainsi être divisé en quatre étapes (Kapp e Lorsch, 2004) (FIGURE 12):

- 1- L'initiation, au cours de laquelle les sous-unités ribosomiques s'assemblent sur l'ARNm et se positionnent sur le site d'initiation,
- 2- L'élongation, durant laquelle la protéine est synthétisée,
- 3- La terminaison libérant la protéine néosynthétisée,
- 4- La dissociation et le recyclage des sous-unités ribosomiques.

1.2.1. L'initiation de la traduction

Parce qu'elle est l'étape limitante de la traduction, et que la plupart des mécanismes de régulation interviennent à ce niveau, l'initiation a été l'objet de nombreuses études. Chez les eucaryotes, la voie classique d'initiation est celle dite dépendante de la coiffe (FIGURE 13) ; cependant un second mécanisme, indépendant de la coiffe, peut être utilisé par la cellule pour initier la traduction d'ARNm au niveau de sites particuliers permettant l'entrée interne du ribosome, *internal ribosome entry site* (IRES).

Dans ce chapitre, nous aborderons uniquement l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe, la voie alternative par entrée interne des ribosomes sera abordée ultérieurement (*chapitre 2.2.1.2.1*).

L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe débute par le recrutement du complexe d'initiation eIF4F en 5'UTR des ARNm (FIGURE 13). Ce complexe protéique est composé de trois sous-unités : eIF4A, eIF4E et eIF4G. La sous-unité eIF4E interagit directement avec la coiffe m⁷GTP, la sous-unité eIF4A élimine les structures secondaires de l'ARNm grâce à ses fonctions hélicases et ATPase, quant à eIF4G il assure la cohésion entre les différents

éléments (Gingras *et al.*, 1999). eIF4G interagit également avec la protéine de liaison à la Poly(A), *Poly(A) Binding Protein* (PABP) et eIF3 (Korneeva *et al.*, 2000). La fixation de plusieurs PABP sur la queue poly-A, et son interaction avec eIF4G permettent la circularisation de l'ARNm, le rendant apte à la traduction (FIGURE 13A).

La présence d'eIF4F permet le recrutement du complexe de pré-initiation, *pre-initiation complex* (PIC) 43S sur l'ARNm. Le PIC est composé de la petite sous-unité 40S, des facteurs eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 ainsi que du complexe ternaire, formé par l'interaction de l'ARNt initiateur méthionine (ARNt^{Met}) avec eIF2-GTP (Sokabe e Fraser, 2014) (FIGURE 13B).

Le complexe de pré-initiation 48S ainsi formé, balaye la région 5'UTR de l'ARNm à la recherche du codon initiateur (FIGURE 13C,D); chez les eucaryotes, la présence de la séquence consensus de Kozak favorise l'initiation (Kozak, 1987b) cependant, contrairement à la séquence Shine Dalgarno chez les procaryotes, celle-ci n'est pas indispensable. La reconnaissance du codon AUG initiateur au niveau du site P du ribosome par l'anticodon de l'ARNt^{Met} entraîne l'hydrolyse par eIF5 du GTP lié à eIF2, libérant ainsi les facteurs d'initiation du complexe 48S. Le facteur eIF2 quitte la sous-unité 40S complexé avec le GDP (eIF2-GDP), puis sera recyclé grâce à l'action du facteur eIF2B ; le recyclage consiste à échanger le GDP lié à eIF2 en GTP (Jackson *et al.*, 2010) (FIGURE 13E).

La grande sous-unité 60S peut alors s'associer à la petite sous-unité 40S, par l'intermédiaire des facteurs eIF5 et eIF5B, pour former le ribosome actif 80S (FIGURE 13E).

Une fois le complexe 80S formé, la phase d'élongation peut commencer (Jackson *et al.*, 2010).

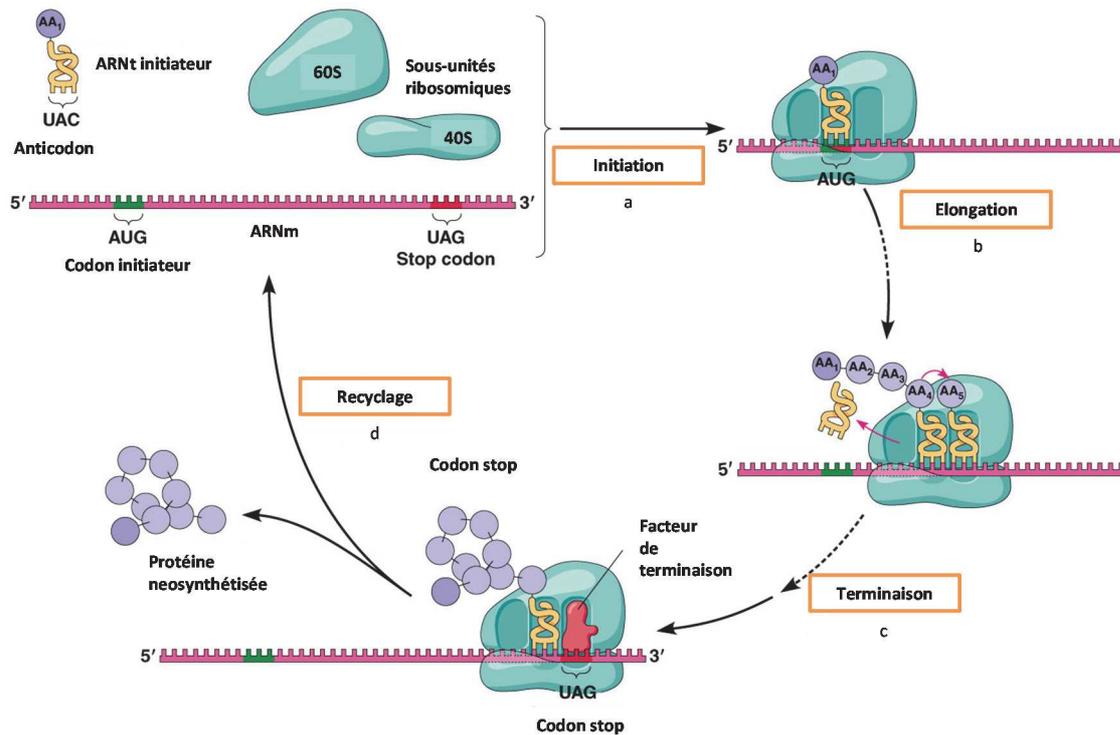


Figure 12 : Les étapes de traduction chez les eucaryotes. La traduction des ARNm en protéines comprend quatre étapes : **(a)** l'initiation au cours de laquelle les sous-unités ribosomiques s'assemblent sur l'ARNm et un l'ARNt initiateur apporte le premier acide aminé au niveau du codon initiateur AUG ; **(b)** l'élongation au cours de laquelle les acides aminés sont apportés par les ARNt sur l'ARNm et ajouté un par un à la chaîne protéique naissante ; **(c)** Au cours de la terminaison, le codon stop est reconnu par le facteur de terminaison entraînant la libération du ribosome et de la protéine neosynthétisée ; **(d)** Le recyclage des composants de la machinerie traductionnelle.

Adapté de Pearson Education, Inc. 2012

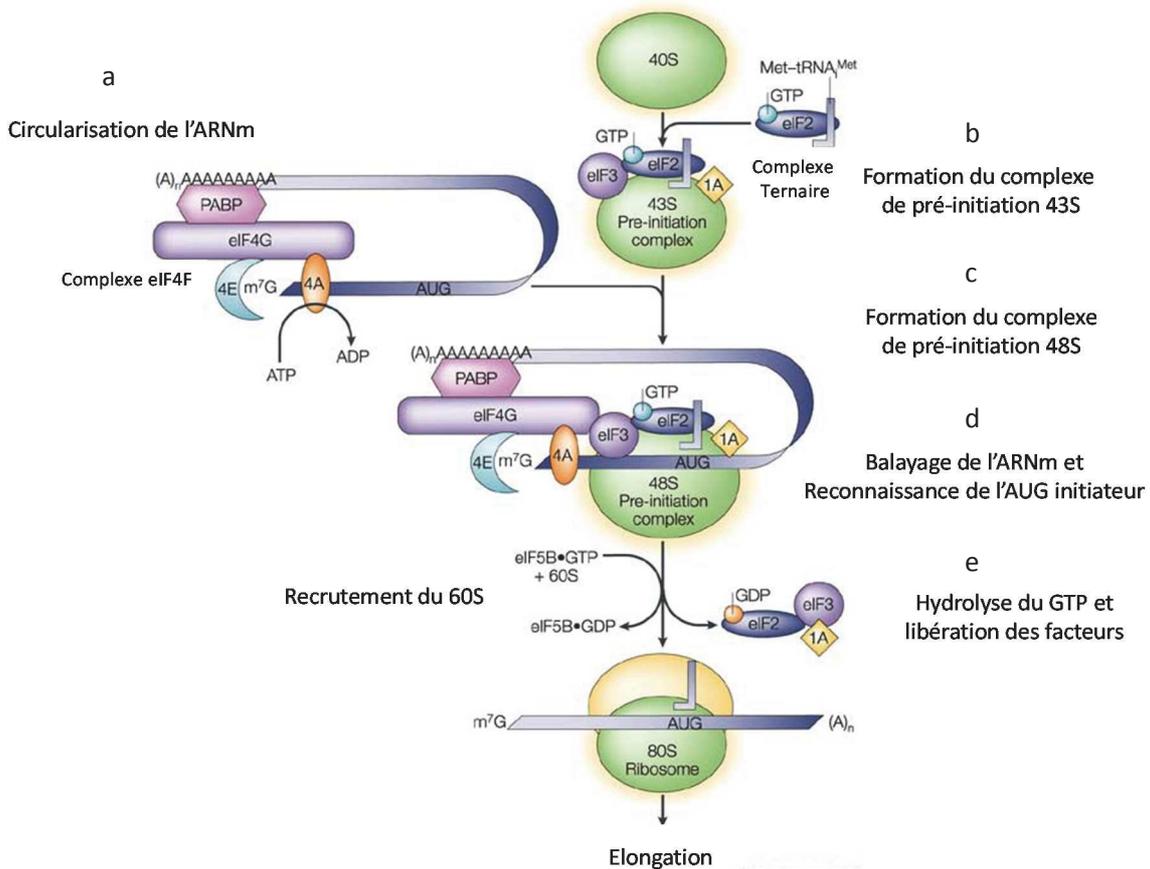


Figure 13 : L'initiation de la traduction chez les eucaryotes. (a) L'initiation commence par la circularisation de l'ARNm suite au recrutement du complexe eIF4F au niveau de l'extrémité 5'UTR de l'ARNm. (b) Parallèlement, le complexe ternaire s'associe à la sous-unité 40S ainsi qu'à d'autres facteurs tels que eIF3 et eIF1A pour former le complexe 43S. (c) Celui-ci est recruté au niveau de l'ARNm pour former le complexe 48S qui (d) balaye l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur AUG qui induit l'hydrolyse du GTP et la libération des facteurs d'initiation. (e) La grande sous-unité 60S peut alors s'associer à la petite sous-unité 40S pour former le ribosome actif 80S.

Adapté de Klann et Dever 2004

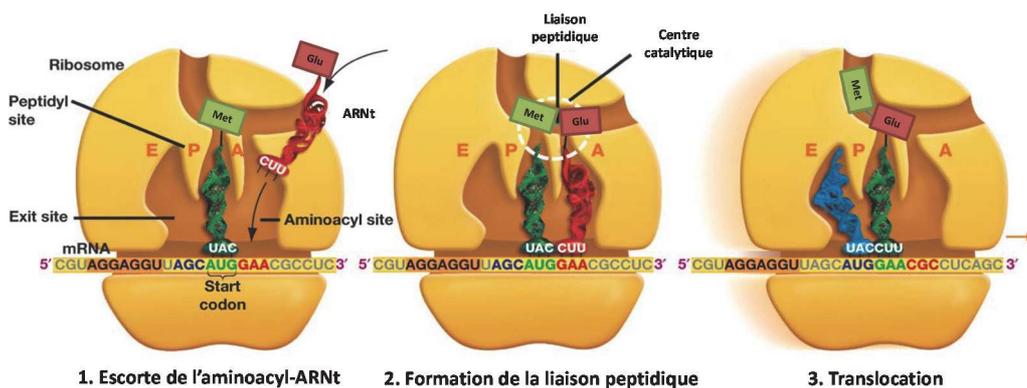


Figure 14 : Le cycle d'élongation chez les eucaryotes. L'élongation est un cycle comprenant trois étapes. 1. L' aminoacyl-ARNt est escorté au niveau du site A par le facteur eEF1 α ; 2. Lors de la formation de la liaison peptidique, la chaîne polypeptidique est transférée au niveau de l'acide aminé apporté par l'ARNt au site A ; 3. Au cours de la translocation, le ribosome se déplace, l'ARNt desacylé se trouve au site E, le peptidyl-ARNt au site P et le site A est vide prêt à accueillir un nouveau aminoacyl-ARNt.

Adapté de Pearson Education, Inc 2011

1.2.2. L'élongation

La traduction se poursuit ensuite par l'élongation de la chaîne polypeptidique par ajout successif d'acides aminés au peptide en cours de synthèse. Au cours de ce processus, l'ARNt occupe successivement les sites A, P et E du ribosome. Il s'agit d'un processus répétitif, divisé en trois étapes catalysées par le ribosome et deux GTPases eE1 α et eEF2 (Cooper, 2000) (FIGURE 14).

Premièrement, au cours de l'étape de décodage, l'aminoacyl-ARNt est escorté au ribosome par eE1 α complexé au GTP, formant ainsi un complexe ternaire. Lorsque la boucle anticodon de l'aminoacyl-ARNt est complémentaire du codon de l'ARNm, le GTP est hydrolysé en GDP, et lors de la dissociation du complexe ternaire, l'aminoacyl-ARNt est inséré dans le site A du ribosome (Cooper, 2000).

La deuxième étape, consiste à transférer la chaîne peptidique naissante, portée par le peptidyl-ARNt présent au site P, à l'acide aminé porté par l'aminoacyl-ARNt au site A; cette réaction est réalisée par le centre catalytique de la peptidyl-transférase. Le ribosome est alors dans un état pré-translocationnel, avec l'ARNt désacylé dans le site P et un peptidyl-ARNt dans le site A (Cooper, 2000).

L'étape finale du cycle d'élongation est la translocation, qui amène le ribosome dans un état post-translocationnel, avec un site A vide, un peptidyl-ARNt dans le site P et un ARNt désacylé dans le site E. La translocation est catalysée par la liaison de l'eEF2 et l'hydrolyse de la GTP qui en découle (Frank *et al.*, 2007). Pendant la translocation, le mouvement de l'ARNt est accompagné d'un déplacement du ribosome de trois nucléotides le long de l'ARNm, positionnant ainsi le codon suivant au niveau du site A afin qu'il puisse être décodé à son tour (Frank *et al.*, 2007; Dever e Green, 2012).

1.2.3. La terminaison, la dissociation et le recyclage

La terminaison de la traduction a lieu lorsque le ribosome atteint la fin de la séquence codante et qu'un codon stop entre dans le site A (UAA, UGA ou UAG). Contrairement aux

étapes précédentes, le codon stop n'est pas reconnu par un ARNt mais par des protéines. En effet, cette étape est catalysée par deux facteurs protéiques, eRF1 et son partenaire eRF3. Ces deux facteurs s'associent pour former un complexe qui se fixe au site A du ribosome. Le facteur eRF3, qui appartient à la famille des GTPase, escorte eRF1 jusqu'au site A du ribosome et stimule son activité de façon dépendante du GTP (Eyler *et al.*, 2013). Le facteur eRF1 reconnaît le codon stop et active le PTC du ribosome qui va catalyser l'hydrolyse de la liaison entre la chaîne polypeptidique et l'ARNt du peptidyl-ARNt situé dans le site P, libérant ainsi la chaîne polypeptidique néosynthétisée (Frolova *et al.*, 1994).

A ce stade, le ribosome reste fixé à l'ARNm, avec l'ARNt désacylé dans son site P et le facteur eRF1 dans son site A. Le facteur eRF1 doit être libéré du ribosome et le ribosome doit se dissocier en sous-unités afin de permettre un nouveau cycle de traduction.

Le recyclage du ribosome est médié par le complexe ABCE1, une ATPase membre de la famille des *ATP-binding cassettes*, qui vient s'associer au facteur eRF1 pour permettre la dissociation des sous-unités ribosomiques (Pisarev *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2012).

Cette dernière étape accomplie, le ribosome peut de nouveau initier la traduction d'un nouvel ARNm.

La traduction des ARNm en protéines est un mécanisme complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs travaillant de concert. En conditions physiologiques comme pathologiques, la cellule dispose de nombreux moyens pour moduler l'expression des protéines de manière quantitative, qualitative et spatio-temporelle.

Dans le chapitre suivant, nous passerons en revue les principaux mécanismes du contrôle traductionnel.

2. Les mécanismes moléculaires du contrôle traductionnel

En réponse à des signaux endogènes ou exogènes, la régulation traductionnelle permet de contrôler finement l'expression des protéines, à la fois dans le temps et dans l'espace, et ce dans de nombreuses situations biologiques (développement embryonnaire, différenciation cellulaire, métabolisme...) (Sonenberg *et al.*, 2000; Kuersten e Goodwin, 2003).

Certains mécanismes vont affecter la traduction de la plupart des ARNm, d'un sous-groupe d'ARNm, ou d'un seul ARNm. On distingue alors la régulation globale et la régulation spécifique. Dans le premier cas, la plupart des ARNm sont régulés de la même manière, sur la base de l'activation ou l'inhibition d'un ou plusieurs composant(s) de la machinerie traductionnelle. Dans le second cas, la traduction d'un groupe défini d'ARNm est modulée sans que la synthèse protéique globale ne soit affectée; celle-ci est fréquemment liée à l'action de protéines agissant en trans ou de micro-ARN reconnaissant des éléments cis présents le plus souvent en 5' et/ou 3'UTR de l'ARNm cible.

Après avoir passé en revue différents mécanismes de régulation de la traduction, nous porterons un intérêt particulier aux régulations exercées par le ribosome, puisqu'il est non seulement le cœur de la machinerie traductionnelle, mais également au centre de ce travail. Nous aborderons ensuite les moyens techniques permettant de mettre en lumière ces mécanismes.

2.1. Les mécanismes de régulation globale de la synthèse protéique

2.1.1. L'initiation de la traduction : une étape hautement régulée

Comme nous venons de le voir, la traduction est divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Bien que les trois étapes soient soumises à des régulations, c'est au cours de l'initiation qu'interviennent la plupart de ces mécanismes (Jackson *et al.*, 2010).

2.1.1.1. Contrôle de l'assemblage de eIF4F

Le taux d'initiation de la traduction est principalement déterminé par la reconnaissance de la coiffe par le complexe eIF4F (Gingras *et al.*, 1999). La liaison de eIF4F avec la coiffe est contrôlée par la protéine de liaison à eIF4E, *eIF4E binding protein* (4E-BP) qui séquestre eIF4E empêchant ainsi son association à eIF4G. Il en résulte une inhibition de l'association du complexe de pré-initiation 43S avec l'ARNm et par conséquent une répression de la traduction.

L'hyperphosphorylation de 4E-BP, déclenchée par divers stimuli (mitogènes, facteurs de croissances, hormones), via l'activation de la voie *mammalian target of rapamycin* (mTOR), entraîne la libération de eIF4E ; celui-ci se lie alors à eIF4G permettant ainsi d'initier la traduction (Gingras *et al.*, 2001).

2.1.1.2. Disponibilité du complexe ternaire

Un autre mécanisme utilisé par la cellule eucaryote pour contrôler l'initiation de la traduction est la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2. Comme nous l'avons vu plus haut (*chapitre 1.2.1*), eIF2 fait partie du complexe ternaire et s'associe avec la petite sous-unité 40S sous sa forme couplée au GTP. Ce GTP est hydrolysé lors de la reconnaissance du codon d'initiation AUG, eIF2 se retrouvant alors couplé au GDP. Afin que le complexe ternaire soit de nouveau fonctionnel pour un nouveau cycle d'initiation, le GDP doit être échangé avec un GTP, et cette réaction est catalysée par eIF2B. La phosphorylation de la sous-unité α de eIF2 bloque la réaction d'échange du GTP en réduisant la capacité de dissociation de eIF2 à eIF2B (Yang e Hinnebusch, 1996). eIF2B se trouvant séquestré, l'échange GDP-GTP ne peut avoir lieu et la traduction des ARNm est inhibée.

La phosphorylation de eIF2 peut être catalysée par une famille de quatre kinases, *PKR-like ER kinase* (PERK), *protein kinase double-stranded RNA-dependent* (PKR), *general control non-derepressible-2* (GCN2) et *heme-regulated inhibitor* (HRI), qui vont être activées sous différentes conditions de stress (Donnelly *et al.*, 2013).

2.1.1.3. Contrôle de l'initiation par clivage du facteur eIF4G

Le contrôle global de la synthèse protéique est généralement lié à des changements dans le statut de phosphorylation des facteurs de la traduction ou des régulateurs qui interagissent avec eux. Cependant, il peut également s'exercer via la dégradation par protéolyse des facteurs de traduction. Par exemple, lors de l'induction de l'apoptose, l'activation de la caspase-3 entraîne le clivage spécifique du facteur eIF4G, générant ainsi un fragment qui, à l'instar de 4E-BP, séquestre eIF4E et bloque l'assemblage du complexe eIF4F (Wang *et al.*, 2014). Les facteurs étant dégradés, l'inhibition de l'initiation de la traduction est irréversible ce qui conduit la cellule à la mort.

2.1.2. Régulation de l'élongation

Bien que moins documentée que l'initiation, la phase d'élongation est également impliquée dans le mécanisme de contrôle de la synthèse protéique. Parmi les différentes modifications que subissent les facteurs d'élongation, la phosphorylation de eEF2 par la kinase Ca^{2+} /Calmoduline-dépendante eEF2 (eEF2K) est probablement le mécanisme de régulation de l'élongation le plus important. Le site de phosphorylation se situe dans le domaine de liaison au GTP, empêchant eEF2 de se lier au ribosome et de ce fait elle aboutit à l'inhibition de l'élongation (Ryazanov e Davydova, 1989). Différentes voies permettent de contrôler l'activité de la kinase eEF2K (Wang *et al.*, 2014).

2.2. Les mécanismes de régulation spécifiques de la synthèse protéique

En réponse à divers stimuli, différents mécanismes vont permettre de contrôler la stabilité, la localisation subcellulaire ainsi que l'efficacité de traduction d'ARNm spécifiques. En effet, l'association de facteurs régulateurs, agissant en trans, à des éléments cis de l'ARNm va entraîner soit le recrutement d'une machinerie de dégradation, soit le recrutement de la machinerie de traduction. Les éléments cis-régulateurs se situent le plus souvent dans les régions non traduites situées aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm (FIGURE 15).

2.2.1. Les séquences régulatrices sur l'ARNm

2.2.1.1. La coiffe m⁷GTP et la queue poly-adénosines

La coiffe m⁷GTP située en 5'UTR, et la queue poly-A située en 3'UTR, sont des structures communes à tous les ARNm qui peuvent être la cible de mécanismes de régulations spécifiques.

La reconnaissance de la coiffe par le complexe eIF4F est la première étape de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante ; au sein de ce complexe, c'est eIF4E qui rentre en interaction avec la coiffe. Des protéines homologues à eIF4E, *eIF4E homologous proteins* (4EHP), peuvent inhiber la traduction en entrant en compétition avec eIF4E, empêchant ainsi sa liaison à la coiffe (Rosettani *et al.*, 2007). Chez *D. melanogaster*, le contrôle traductionnel exercé par 4EHP est impliqué dans la mise en place d'un gradient protéique essentiel au plan d'organisation de l'embryon (Cho *et al.*, 2005). Chez le mammifère, 4EHP a été montré comme impliqué dans le contrôle de la traduction de l'ARNm du gène homéotique HOXB4 (Villaescusa *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la queue poly-A, la polyadénylation est impliquée dans la stabilité des ARNm puisqu'elle intervient dans la protection contre la dégradation par les exoribonucléases (Newbury, 2006). La longueur de la queue poly-A est variable d'un ARNm à un autre ; un ARNm présentant une queue poly-A longue sera peu dégradé et donc plus traduit, c'est le cas par exemple de l'hémoglobine dans les érythrocytes. A l'inverse, ceux dépourvus de queue poly-A, comme les ARNm des histones, sont très rapidement dégradés (Jalkanen *et al.*, 2014).

Le contrôle traductionnel peut donc s'exercer par modulation de la longueur de la queue poly-A. Ce mécanisme est largement décrit chez les invertébrés et les vertébrés au cours de l'ovogenèse et des premières étapes de l'embryogenèse (Newbury, 2006). Chez *X. laevis*, les ARNm hérités de la mère, et codant pour des protéines essentielles à la maturation des ovocytes et à l'embryogenèse, restent silencieux ou « masqués » ; lorsqu'ils sont masqués, leur queue poly-A est courte. L'exposition à des signaux spécifiques va entraîner l'allongement de la queue poly-A et l'activation de la traduction de ces ARNm (Meric *et al.*, 1996). Le masquage et l'activation de ces ARNm sont régulés par l'élément de polyadénylation cytoplasmique, *cytoplasmic polyadénylation element* (CPE) (Mendez e Richter, 2001).

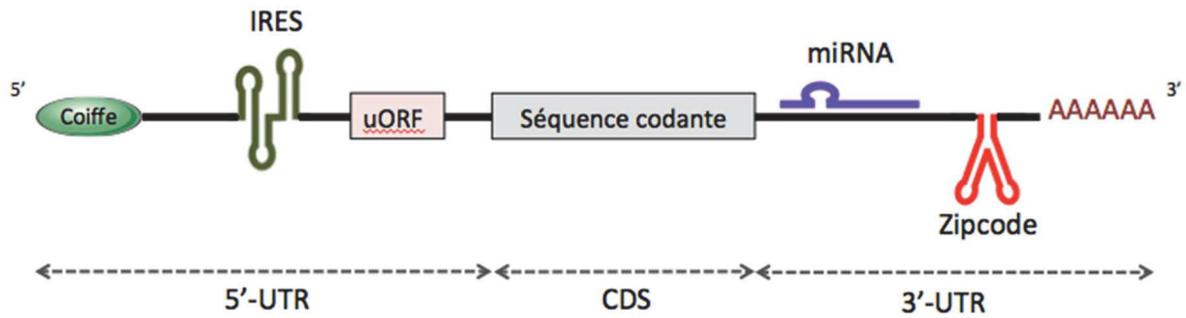
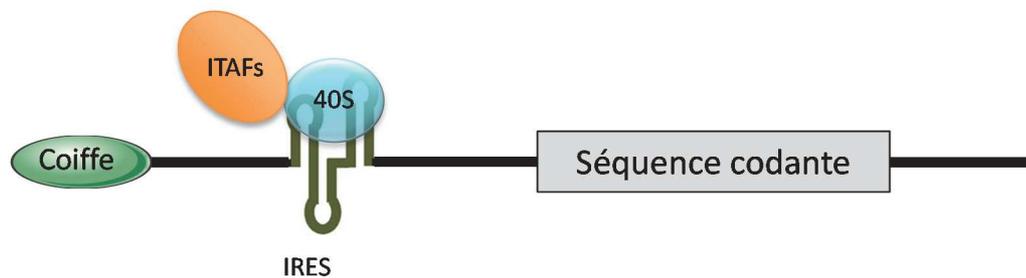


Figure 15 : Les séquences régulatrices sur l'ARNm. Représentation schématique de l'ARNm avec les éléments fonctionnels. De part et d'autre de la séquence codante nous retrouvons les régions non traduites 5'UTR et 3'UTR. Au niveau de la région 5'UTR se trouvent la coiffe m⁷GTP, les IRES et les uORF. Au niveau de la région 3'UTR se trouvent les séquences de liaison au miRNA, les Zipcodes et la queue poly-A.

Adapté de Hamed et al.2011

a



b

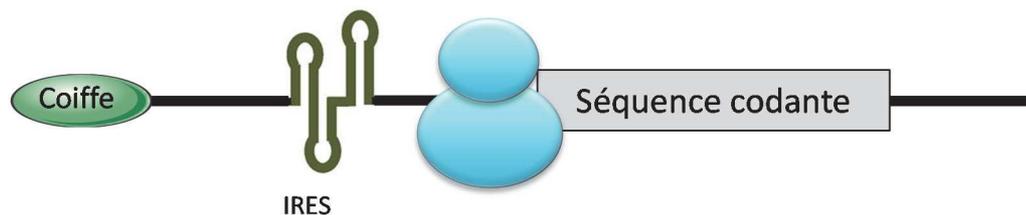


Figure 16 : L'initiation de la traduction par entrée interne du ribosome (IRES). (a) La présence d'une séquence IRES au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm permet le recrutement direct de la sous-unité 40S. Ce mécanisme peut être assisté par des facteurs agissant en trans (ITAF). (b) Le ribosome fonctionnel se forme directement au niveau du codon initiateur et la traduction peut débiter.

Un autre effecteur majeur de ce type de régulation est le complexe de désadénylation CCR4. Celui-ci va être recruté par une protéine de liaison à l'ARN, qui va reconnaître une séquence spécifique sur l'ARNm. La réduction de la longueur de la queue poly-A de cet ARNm va induire une inhibition de sa traduction. Ce mécanisme, décrit chez *D. melanogaster*, intervient notamment dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur lors du développement embryonnaire (Chicoine *et al.*, 2007).

2.2.1.2. Les structures en 5'UTR

2.2.1.2.1. Sites d'entrée interne du ribosome (IRES)

Pendant longtemps, le mode d'initiation *cap-dépendant* a été considéré comme la seule voie possible par laquelle la traduction des ARNm eucaryotes pouvait être initiée.

Au début des années 70, l'étude de la réplication du poliovirus a révélé que les ARNm viraux étaient structurellement différents des ARNm cellulaires, puisqu'ils ne contiennent pas de coiffe à leur extrémité 5' (Nomoto *et al.*, 1976) ; l'extrémité 5' des ARNm viraux est également particulièrement longue et riche en structures secondaires (Pilipenko *et al.*, 1989). En 1988, il a été montré que suite à l'infection par le poliovirus la traduction de la cellule hôte est inhibée sans que la traduction virale ne soit altérée (Etchison *et al.*, 1982). Cette observation suggéra l'existence d'un autre mécanisme d'initiation de la traduction par lequel le ribosome peut se lier à l'ARNm viral dans une position interne plutôt qu'à l'extrémité 5'. Cette même année, il a été montré que la traduction de l'ARNm du poliovirus est initiée par la liaison du ribosome à une séquence interne située dans la région non codante 5' : le premier IRES viral avait été caractérisé (Pelletier e Sonenberg, 1988). Peu de temps après, l'existence du mécanisme d'initiation de la traduction par entrée interne des ribosomes a également été mise en évidence dans les cellules eucaryotes (Macejak e Sarnow, 1991). Depuis, de nombreux ARNm eucaryotes présentant des éléments IRES ont été répertoriés (Mokrejs *et al.*, 2010).

La traduction IRES-dépendante est favorisée lorsque la traduction cap-dépendante est compromise et ce, dans différentes situations physiologiques, physiopathologiques ou de stress. C'est le cas notamment lors de l'apoptose, de la mitose, des processus infectieux, des chocs thermiques, de l'hypoxie ou d'une carence nutritive (Spriggs *et al.*, 2008). Dans ce cas, la traduction des ARNm débute par le recrutement de la sous-unité 40S directement sur

la séquence IRES, avec le concours de facteurs agissant en trans, *IRES-transacting factors* (ITAF), et parfois celui des facteurs de la voie canonique (Komar e Hatzoglou, 2011) (FIGURE 16).

2.2.1.2.2. Les structures tige-boucle

La présence de structures en tige-boucle au niveau de la région 5'UTR des ARNm a pour effet de diminuer la traduction en empêchant le recrutement du complexe 43S. Un exemple de l'utilisation de ce mécanisme est celui de la régulation de l'homéostasie cellulaire du fer. Dans les cellules le taux de fer libre est très régulé, il est stocké sous une forme complexée à une protéine de stockage, la ferritine. L'expression de la ferritine est donc très contrôlée et dépend du taux de fer libre dans la cellule. Le contrôle s'exerce au niveau de l'ARNm de la ferritine et fait intervenir une protéine régulatrice, la protéine de réponse au fer, *iron responsive protein* (IRP) et une structure en tige-boucle située dans la région 5'UTR de l'ARNm de la ferritine, appelée élément de réponse au fer, *iron responsive element* (IRE). En l'absence de fer dans la cellule, le facteur IRP bloque l'initiation de la traduction en se fixant sur la séquence IRE situé à 40 nucléotides de la coiffe, bloquant ainsi le recrutement du complexe 43S (Gray e Hentze, 1994). Lorsque le taux de fer augmente, un complexe contenant du fer se lie à IRP empêchant sa liaison à la séquence IRE et permettant la traduction de l'ARNm. Ainsi, la ferritine n'est traduite que lorsque le niveau de fer libre est trop important dans la cellule.

2.2.1.2.3. Les petits cadres de lecture en amont du cadre principal

Les petits cadres de lectures en amont du cadre principal, short *upstream open reading frame* (uORF), sont des éléments de régulation fréquents puisqu'on les retrouve sur 47% des ARNm humains (Gray e Hentze, 1994). Trois mécanismes connus vont déterminer l'efficacité de traduction de l'ORF principal situé en aval des uORF : le « *leaky scanning* » (Rossi *et al.*, 2010), la ré-initiation (Gunišová e Valášek, 2014) ou l'arrêt du ribosome (Ishimura *et al.*, 2014). Le leaky scanning et la ré-initiation vont augmenter l'efficacité de traduction de l'ORF principal, alors que le blocage du ribosome va l'inhiber.

Les facteurs de transcription ATF4 (chez les mammifères) et GCN4 (chez la levure) sont responsables de l'induction d'un programme d'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress, *integrated stress response* (ISR) (Starck *et al.*, 2016). En condition normale, l'expression de ces facteurs protéiques est réprimée par les uORF ; en condition de

stress, notamment lié à une carence en acides aminés, on observe une diminution de la traduction globale alors que la traduction spécifique des ARNm codant pour ATF4 ou GCN4 augmente. Cet effet est lié à une baisse de la disponibilité des complexes ternaires, en lien avec l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 induite lors de la réponse au stress. La faible quantité du complexe ternaire diminue la probabilité de ré-initiation au niveau de l'uORF inhibitrice favorisant ainsi la traduction de l'ORF principal (Vattem e Wek, 2004) (FIGURE 17).

2.2.1.2.4. Le ribosome shunting

Le balayage discontinu par la sous-unité ribosomique 40S, appelé également saut du ribosome ou *ribosome shunting*, se produit lorsqu'une structure en tige-boucle stable ne parvient pas à inhiber la traduction. Le ribosome se lie à la coiffe, commence à scanner la région 5'UTR, puis un élément agissant en cis va entraîner sa translocation directe au niveau du codon initiateur. En permettant de s'affranchir de la nécessité de dérouler les structures présentes en 5'UTR, ce mécanisme permet d'initier la traduction tout en diminuant la dépendance au facteur eIF4F. Il permet donc la traduction sélective d'ARNm ayant la capacité d'être traduit même lorsque l'activité d'eIF4F est altérée.

Le *ribosome shunting* est décrit pour certains ARNm viraux (Schärer-Hernández e Hohn, 1998; Xi *et al.*, 2005) et cellulaires comme l'ARNm de la protéine de choc thermique 70, *heat shock protein 70* (HSP70) (Yueh e Schneider, 2000).

Dans les cellules, le stress généré par une augmentation de la température entraîne une diminution de la synthèse protéique globale ; cependant, la protéine de choc thermique HSP70, qui est une protéine chaperonne dont le rôle est de replier les peptides dénaturés par la chaleur, va continuer à être traduite de manière sélective grâce à ce mécanisme.

2.2.1.2.5. Les séquences oligopyrimidiques (TOP)

Certains ARNm contiennent à leur extrémité 5' une séquence oligopyrimidique, *5' terminal oligopyrimidine tract mRNA* (5'TOP mRNA), composée de 6 à 12 pyrimidines. Ces ARNm codent pour des composants de la machinerie traductionnelle, tels que les protéines ribosomiques et les facteurs d'élongation. La traduction de ces ARNm, très sensible au stress et aux conditions de croissance, est sous contrôle de la voie mTOR qui, lorsqu'elle est activée, favorise l'expression de ces protéines (Fonseca *et al.*, 2015).

2.2.1.3. Les structures en 3'UTR

2.2.1.3.1. Les Zipcodes

La localisation des ARNm dans les compartiments subcellulaires permet de réguler l'expression des gènes avec une grande finesse spatio-temporelle, puisqu'elle permet de synthétiser les protéines directement au niveau de leur site de fonction.

En règle générale, la localisation des transcrits est contrôlée par des séquences régulatrices situées dans la région 3'UTR, appelées zipcodes (Weis *et al.*, 2013). Ces séquences vont être spécifiquement reconnues par des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui vont s'assembler sous forme de granules afin de transporter l'ARNm à sa destination finale grâce à des protéines motrices se déplaçant le long des filaments du cytosquelette (Tekotte e Davis, 2002). Ces ARNm peuvent également diffuser passivement puis être ancrés dans un compartiment spécifique de la cellule.

La localisation des ARNm dans le cytoplasme est indispensable à la polarisation cellulaire, aux processus de développement tels que la division asymétrique, à la migration cellulaire, à la maturation des neurones et au plan d'organisation de l'embryon (Medioni *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2015).

2.2.1.3.2. Les séquences cibles des micro ARN

Les micro ARN (miRNA) sont de petits ARN régulateurs non codants, d'environ 22 nucléotides, provenant de la maturation d'un long précurseur (Shukla *et al.*, 2011). Les miRNA sont capables d'inhiber l'expression d'un ARNm cible en se liant à des séquences situées dans sa région 3'UTR. La répression de la traduction par les miRNA peut se faire par différents mécanismes : désadénylation, protéolyse, blocage de l'initiation ou blocage de l'élongation (Filipowicz *et al.*, 2008) (FIGURE 18).

On estime que les miRNA régulent la traduction de plus de 60% des gènes codant pour des protéines. Ils sont impliqués dans la régulation de nombreux processus tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et le développement. Alors que certains miRNA régulent l'expression d'une cible spécifique unique, d'autres vont être capables de réguler l'expression de centaines de gènes simultanément et donc de contrôler des processus complexes (He e Hannon, 2004).

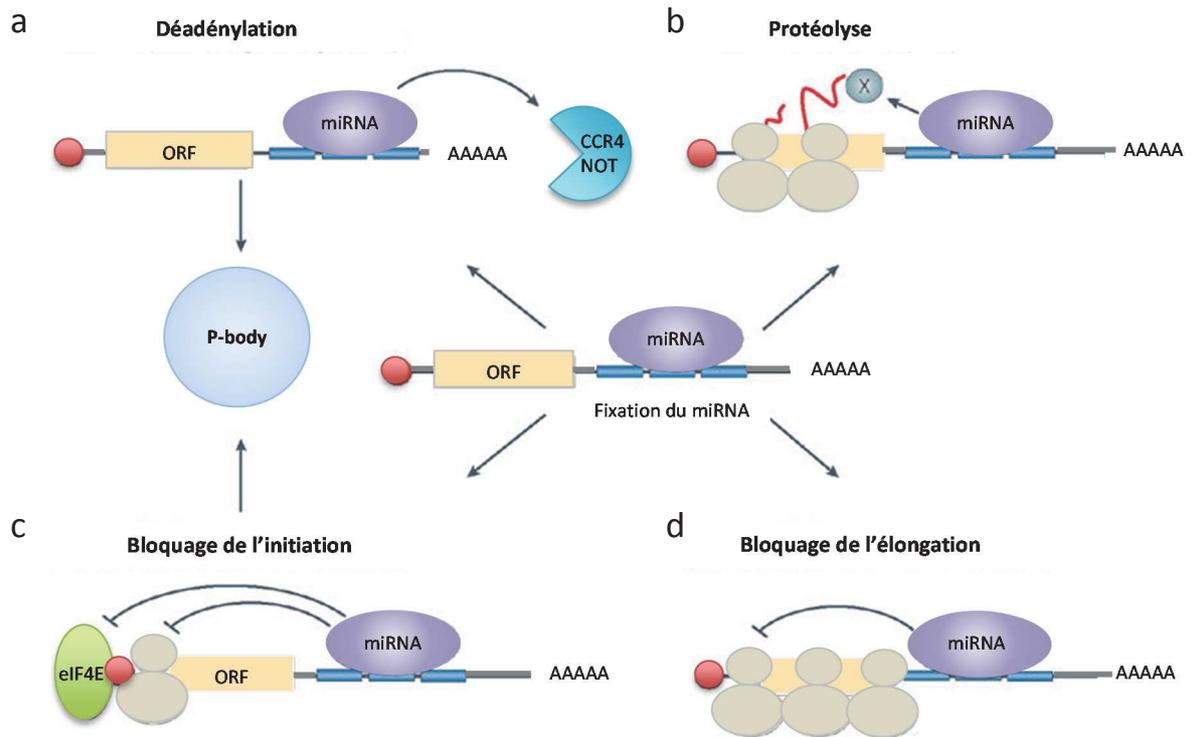


Figure 18 : Mécanismes de régulation exercés par les micro ARN (miRNA). Lorsque le miRNA interagit avec une séquence cible située en 3'UTR de l'ARNm, celui-ci peut entraîner **(a)** sa déadénylation suivie de l'élimination de la coiffe et sa dégradation, **(b)** la dégradation de la protéine en cours de synthèse par protéolyse, **(c)** le bloquage de l'initiation par inhibition de la reconnaissance de la coiffe ou du recrutement de la sous-unité 60S, **(d)** le bloquage de l'élongation par ralentissement ou décrochage du ribosome.

D'après Filipowicz et al. 2008

2.2.1.4. Les modifications de l'ARN

De la même manière que l'ADN est méthylée ou que la protéine est phosphorylée, l'ARNm va subir des modifications chimiques dynamiques et réversibles.

La méthylation de l'adénosine sur la position N6, aboutit à la formation de la N⁶-methyladenosine (m⁶A) ; cette modification, retrouvée sur 20% des transcrits, est enrichie dans la région 3'UTR et à proximité des codons stop (Meyer *et al.*, 2012). Il semblerait également que la m⁶A intervienne préférentiellement en amont des sites de liaison aux miRNA et que leur présence intervienne dans la régulation de cette modification (Chen *et al.*, 2015). La modification m⁶A représente un niveau supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes par différents mécanismes tels que le contrôle de la stabilité de l'ARNm et le recrutement de la machinerie traductionnelle (Wang *et al.*, 2015).

Une autre modification que peut subir l'ARNm est la méthylation de l'adénosine sur la position N1, aboutissant à la formation de la N¹-methyladenosine (m¹A). Celle-ci est présente sur environ 20% des transcrits humains et elle est enrichie autour du codon stop, en amont du premier site d'épissage. La m¹A est située préférentiellement dans les régions les plus structurées autour des sites d'initiations de traduction canoniques et alternatifs. Cette modification dynamique est corrélée positivement à la traduction des protéines. (Dominissini *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

2.2.2. Les régulations exercées par le ribosome

Pendant longtemps, le ribosome a été considéré comme un complexe macromoléculaire dénué de capacité régulatrice ; cependant, ce paradigme s'est effondré ces dernières années avec la publication de résultats soulignant la possibilité d'une hétérogénéité ribosomique.

C'est au début des années 1970, par l'étude comparative de ribosomes de bactéries mises en croissance dans différentes conditions de culture, que l'hétérogénéité ribosomique a été observée pour la première fois (Deusser, 1972). Cependant, il a fallu attendre les années 2000 pour que la communauté scientifique prête attention aux variations de la composition du ribosome ainsi qu'à leurs conséquences. Les études menées sur le ribosome eucaryote ont suggéré que le ribosome soit doté de capacités de régulation intrinsèque ; en fonction du

type cellulaire ou du stade de développement, il existerait des ribosomes spécialisés, qui diffèreraient par leur composition, et qui agiraient comme un filtre régulant de manière sélective la traduction de certains ARNm (Mauro e Edelman, 2002; 2007).

2.2.2.1. Les variations dans la composition du ribosome

2.2.2.1.1. Hétérogénéité des protéines ribosomiques

2.2.2.1.1.1. Différents profils d'expression des protéines ribosomiques

Les premières évidences d'hétérogénéité ribosomique remontent aux études menées sur *E. Coli* dans les années 1970 (Kurland *et al.*, 1969; Van Duin e Kurland, 1970; Deusser, 1972). Chez les eucaryotes, ce sont les travaux réalisés sur l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* qui ont permis de révéler des changements significatifs dans la composition des ribosomes entre différents stades de son cycle de vie. Des différences, tant quantitatives que qualitatives, ont été mises en évidence pour douze PR entre les amibes végétatives et les spores (cellules différenciées). Deux d'entre elles étaient spécifiques des ribosomes des amibes, et trois à ceux des spores, les autres étaient communes aux deux types de cellules, mais présentaient des changements de stœchiométrie (Ramagopal e Ennis, 1981). Ces résultats apportaient pour la première fois la preuve que la différenciation cellulaire chez les eucaryotes était accompagnée d'une expression différentielle des PR.

Plus récemment, une élégante étude conduite par M. Barna en 2011 a permis de mettre en évidence le rôle exercé par *Rpl38* dans l'organisation des tissus au cours du développement embryonnaire de la souris (Kondrashov *et al.*, 2011) (FIGURE 19). Les auteurs ont identifié une mutation du gène de *Rpl38* chez les souris *tail short*, présentant des défauts de développement du squelette axial. Ces défauts, liés à une mutation spontanée et dominante, ont été observés depuis près de 60 ans sans que la cause ne soit identifiée. Ainsi les auteurs ont établi que l'haploinsuffisance de *Rpl38* induit des transformations homéotiques en lien avec des altérations de l'expression de plusieurs gènes Hox. Dans ces embryons de souris mutantes, la traduction globale n'est pas affectée, seule la traduction des ARNm de onze de ces gènes est perturbée ; ainsi *Rpl38* contrôle la traduction spécifique d'un sous-groupe d'ARNm indispensable à la mise en place du squelette axial. Ultérieurement, le mécanisme moléculaire sous-tendant cette régulation a été élucidé (Xue *et al.*, 2015). Les ARNm dont la traduction dépend de *Rpl38*, présentent dans leur région 5'UTR des séquences IRES spécifiquement reconnues par *Rpl38* et permettant le recrutement des

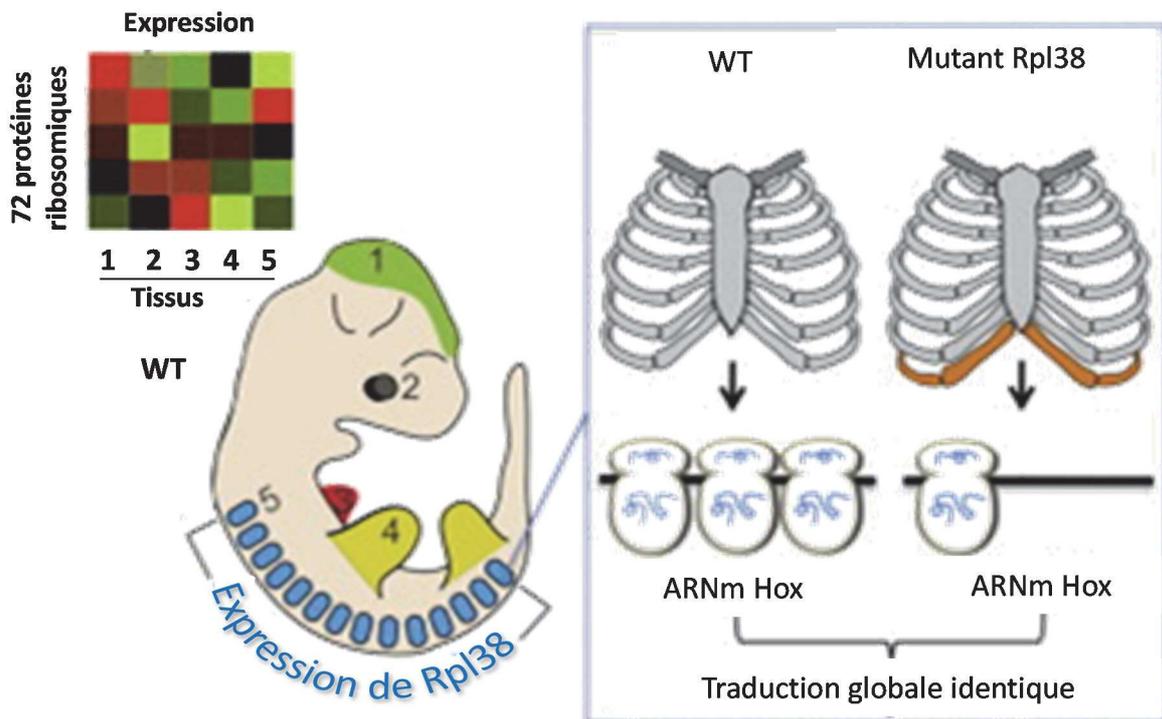


Figure 19 : Rpl38 contrôle de manière spécifique la traduction de gènes homéotiques. Dans les embryons de souris, l'analyse de l'expression de 72 PR a révélé un enrichissement de l'expression de Rpl38 au niveau du squelette axial. Les souris mutantes Rpl38 présentent un défaut de développement associé à la baisse de la traduction d'un sous- groupe d'ARNm codant pour des gènes Hox responsable de la mise en place du squelette axial ; la traduction globale n'est pas affectée.

Adapté de Kondrashov et al. 2011

ribosomes. Dans la région 5'UTR de ces ARNm, on retrouve également un autre élément de régulation qui permet d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe, ce sont des *translation inhibitory elements* (TIE).

Parallèlement, ces auteurs ont étudié l'expression de 72 PR dans 14 tissus et types cellulaires différents issus d'embryons de souris. Cette étude à grande échelle révèle d'une part, que l'expression de *Rpl38* est nettement enrichie dans les régions où se produisent les phénotypes de perte de fonction et d'autre part, qu'il existe des variations considérables dans l'expression des transcrits codant les PR en fonction du tissu ou du type cellulaire considéré.

Cette hétérogénéité ribosomique ne se limite pas aux organismes en développement puisque des études menées chez l'Homme à partir de tissus adultes ont permis également d'identifier des variations dans l'expression des PR (Bortoluzzi *et al.*, 2001). En effet, la comparaison des transcrits de PR issus de six tissus différents (utérus, ovaires, cerveau, foie, muscle squelettique et rétine) a révélé une expression différentielle pour trente-trois d'entre-elles.

Au niveau subcellulaire cette fois, l'étude comparative des transcrits entre le corps cellulaire et les prolongements des neurones du mollusque *Aplysia*, a mis en évidence un enrichissement de plusieurs PR au niveau des prolongements ; cette observation sous-entend la possibilité d'une hétérogénéité ribosomique entre ces deux compartiments (Moroz *et al.*, 2006). De plus, d'autres composants de la machinerie traductionnelle sont présents dans ces prolongements ; ils sont transportés sous forme de grosses particules ribonucléoprotéiques contenant des ARNm, des ribosomes et d'autres protéines de liaisons à l'ARN (Moccia *et al.*, 2003; Sossin e Desgroseillers, 2006). Il semblerait que les ribosomes présents dans les prolongements soient différents de ceux des corps cellulaires. Cette différence serait due à la présence de nouvelles PR synthétisées localement, et qui pourraient influencer la traduction d'ARNm situés au niveau des dendrites. Une autre étude, menée chez la souris, a montré que le récepteur transmembranaire DCC, qui participe au guidage axonal, s'associe avec des protéines ribosomiques spécifiques et régule l'organisation spatiale de la traduction dans les axones et les dendrites (Tcherkezian *et al.*, 2010).

Par extension, des mécanismes similaires de contrôle traductionnel localisé, pourraient représenter un moyen unique de régulation dans de nombreux contextes cellulaires, tels que

dans les cellules polarisées, au niveau du front de migration des cellules ou au cours d'étapes spécifiques de la différenciation cellulaire.

2.2.2.1.1.2. Protéines alternatives et paralogues

L'hétérogénéité ribosomique peut également être liée à l'utilisation de protéines ribosomiques alternatives. De nombreux paralogues ont été identifiés chez la levure, la plante et la drosophile. Ceux-ci sont issus de duplication du génome et semblent avoir développé au cours de l'évolution des spécificités de fonction. Par exemple, chez la levure *S. cerevisiae*, la délétion de paralogues entraîne des modifications phénotypiques, comme des variations de taille, de sensibilité aux virus et aux drogues, ou dans le mécanisme de sporulation (Enyenihi e Saunders, 2003). Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, chaque protéine ribosomique est codée par deux à sept gènes, dont certains seront exprimés de manière différentielle au cours du développement (Weijers *et al.*, 2001).

En revanche, chez le mammifère, il existe environ 2000 séquences codant pour les protéines ribosomiques ; bien que la plupart semblent être des pseudogènes et donc inactives, il existe toutefois quelques exceptions. C'est notamment le cas pour RPS4, qui est codée par trois gènes : *RPS4X*, *RPS4Y1* et *RPS4Y2*, situés sur les chromosomes X et Y. Chez les mâles, *RPS4X* et *RPS4Y1* sont exprimés de manière ubiquitaire alors que *RPS4Y2* est exprimé exclusivement au niveau des testicules et de la prostate, suggérant l'existence d'un possible ribosome spécialisé dans les testicules (Lopes *et al.*, 2010). Chez la souris, des paralogues des protéines ribosomiques RPL10, RPL22 et RPL39 ont été identifiés, et ils présentent une expression différentielle et tissu spécifique (Sugihara *et al.*, 2010).

Nous reviendrons ultérieurement sur la protéine RPL22 et son paralogue RPL22L1 auxquelles je consacrerai un chapitre à part (*Résultats Partie III-1*).

2.2.2.1.1.3. Les modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques

En plus des différents niveaux et profils d'expression, les modifications post-traductionnelles des PR constituent une composante supplémentaire dans la diversité ribosomique.

Les PR peuvent subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles : méthylations, acétylations, phosphorylations, ubiquitinations (Odintsova *et al.*, 2003). La modification post-

traductionnelle la mieux caractérisée est celle de RPS6. Chez le mammifère, RPS6 est phosphorylée par la S6 kinase (S6K) sur cinq résidus en réponse à des signaux mitogéniques ou des facteurs de croissance (Krieg *et al.*, 1988). Pendant longtemps il a été admis que la phosphorylation de RPS6 permettait de contrôler la traduction d'ARNm possédant une séquence 5' TOP (Jefferies *et al.*, 1997). Cependant, des études récentes ont mises à mal cette hypothèse, et il semblerait que cette phosphorylation soit plutôt impliquée dans la taille des cellules et l'homéostasie du glucose (Ruvinsky *et al.*, 2005; Meyuhaz e Dreazen, 2009).

Une autre étude menée chez l'Homme et consistant à étudier par spectrométrie de masse les modifications post-traductionnelles des PR composant la sous-unité 40S a révélé que, suivant le contexte cellulaire, les protéines ribosomiques pouvaient être méthylées différemment (Yu *et al.*, 2005).

Bien que répertoriées de la bactérie à l'Homme, en passant par la plante et la levure (Ramagopal, 1991; Lee *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 2008), le rôle de ces modifications post-traductionnelles demeure inconnu.

2.2.2.1.2. Hétérogénéité des ARN ribosomiques

2.2.2.1.2.1. Modification des séquences

Outre l'hétérogénéité qui découle de la composition en PR, des variations des ARNr représentent une part importante dans l'établissement de l'hétérogénéité ribosomique.

L'hypothèse selon laquelle l'incorporation d'ARNr alternatifs pourrait changer la spécificité de la machinerie traductionnelle en réponse à des signaux vient du fait que, dans les trois domaines du vivant, il existe de nombreuses copies des gènes codant pour les ARNr. Les données chez le mammifère sont rares, mais les études menées chez le parasite *Plasmodium berghei* (Gunderson *et al.*, 1987) suggèrent que les séquences d'ARNr constituent un degré de plus dans la régulation traductionnelle exercée via l'hétérogénéité du ribosome. Chez ce parasite, il existe deux gènes distincts codant pour l'ARNr de la petite sous-unité ; ces deux formes d'ARNr ne sont pas exprimées de manière concomitante, mais de manière spécifique au cours du cycle d'infection (Gunderson *et al.*, 1987). A l'inverse, une étude menée chez l'oursin a révélé que les trois sortes d'ARNr 5S peuvent être incorporées dans les ribosomes fonctionnels à tous les stades du développement (Gunderson *et al.*, 1987).

2.2.2.1.2.2. Les modifications post-transcriptionnelles

Les ARNr subissent différentes modifications post-transcriptionnelles, telles que la méthylation sur le groupe 2-hydroxyl du ribose (2'-O-méthylation), la conversion de l'uridine en pseudouridine (pseudouridylation) et la méthylation des bases; ces modifications interviennent le plus souvent au niveau de sites fonctionnels de l'ARNr, ce qui laisse à penser que de nombreuses fonctions du ribosome sont liées à ces modifications (Decatur e Fournier, 2002). Chez la levure, des approches génétiques ont démontré que la 2'-O-méthylation est importante pour l'activité traductionnelle du ribosome (Decatur e Fournier, 2002; Liang *et al.*, 2009). Chez les eucaryotes, la méthylation et la pseudouridylation sont facilitées par deux types de snoARN, respectivement les C/D box et les H/ACA box. L'expression de ces deux snoARN varie de manière tissu-spécifique (Castle *et al.*, 2010) et celle de la C/D box varie également en fonction du cycle circadien (Hughes *et al.*, 2012); cette variabilité laisse à penser qu'il pourrait s'agir d'un autre degré de spécialisation du ribosome.

Le lien entre les altérations des profils de modification des ARNr et le développement de pathologies a été clairement établi et nous reviendrons en détail sur cet aspect ultérieurement.

2.2.2.2. Les fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques

Au-delà de leur rôle au sein du ribosome, certaines protéines ribosomiques possèdent des fonctions auxiliaires (TABLEAU 2).

La plupart des PR sont des protéines de liaison à l'ARN et certaines d'entre-elles sont capables de se lier à des ARN ou à des complexes protéiques en dehors de ceux entrant dans la composition du ribosome.

Par exemple, de nombreuses protéines ribosomiques sont capables de réguler leur propre synthèse. C'est le cas par exemple de la protéine Rpl32 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui régule à la fois l'épissage et la traduction de son propre transcrit en interagissant avec une structure présente dans la région 5'UTR (Dabeva e Warner, 1993). Chez l'Homme, la protéine RPS13 exerce un mécanisme de rétrocontrôle lui permettant

Tableau 2 : Tableau des protéines ribosomique avec fonctions extra-ribosomiques

Protéine Ribosomique	Fonction Extra-ribosomique
Autorégulation de la synthèse des r-protéines chez les eucaryote	
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 (<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 le mammifère	
RPL5	Séquestration de M/HDM2
RPL11	Séquestration de M/HDM2; Séquestration de c-myc
RPL23	Séquestration de M/HDM2
RPS7	Séquestration de M/HDM2
RPL26	Induction de la traduction de TP53
RPL23	Séquestration de la nucléophosmine pour empêcher sa liaison avec Miz1
Totalement extra-ribosomiques	
RPL7 (<i>Archaea</i>)	SnoRNP RACK1 Signalisation cellulaire
RPL13a	Inhibition de la traduction des ARNm (Complexe GAIT)
RPS3	Endonucléase d'ADN; Partenaire de NFκB
RPL10 (<i>A. thaliana</i>)	Fonction antivirale
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 (<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

Adapté de Warner et McIntosh 2009

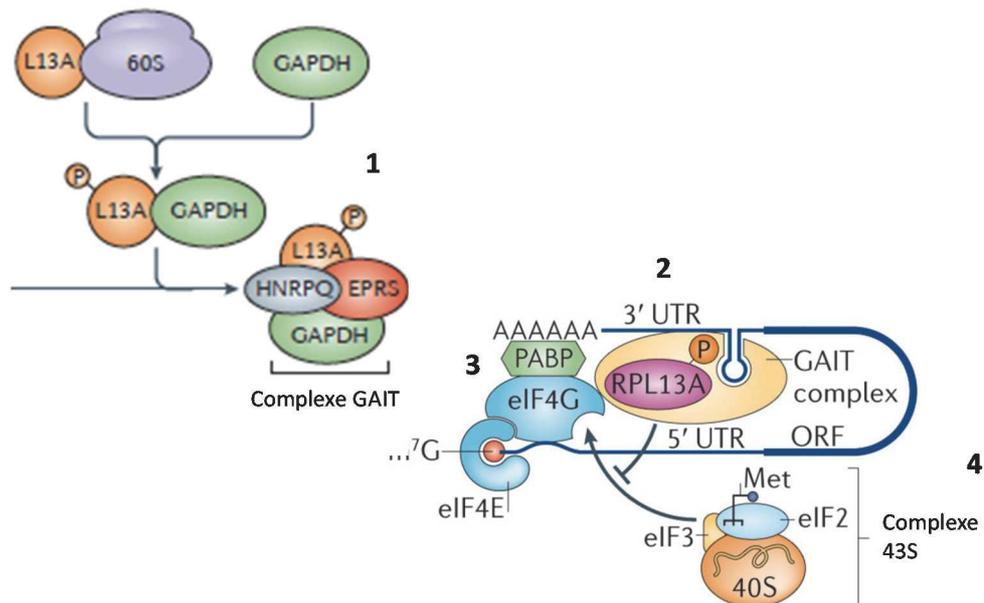


Figure 20 : RPL13a dans le complexe GAIT. 1) Lorsque RPL13a est phosphorylée elle quitte le ribosome pour rejoindre le complexe GAIT, 2) le complexe GAIT se lie à une structure située en 3'UTR de l'ARNm, 3) RPL13a se lie à eIF4G 4) bloquant ainsi le recrutement du complexe 43S.

Adapté de Carpenter 2014

également de réguler l'épissage de son propre pré-ARNm. Lorsqu'elle est en excès, la protéine se lie au niveau du 1^{er} exon de son ARNm, le protégeant ainsi du clivage par les ribonucléases, ce qui a pour effet d'inhiber son épissage (Malygin *et al.*, 2007).

Un des exemples les mieux caractérisés est celui de la protéine RPL13a, qui fait partie intégrante du complexe d'inhibition de la traduction activé par l'interféron gamma, *IFN-gamma-activated inhibitor of translation (GAIT)*. La fonction du complexe GAIT est d'inhiber la traduction d'ARNm spécifiques de la réponse inflammatoire, en se liant à des structures présentes dans leur région 3'UTR (Mukhopadhyay *et al.*, 2009). Dans les cellules myéloïdes, l'interféron gamma (IFN γ) active une cascade aboutissant à la phosphorylation de RPL13a, qui va ainsi quitter le ribosome pour rejoindre le complexe GAIT (Mazumder *et al.*, 2003). Au sein du complexe GAIT, RPL13a interagit avec eIF4G et bloque le recrutement du complexe d'initiation 43S (Kapasi *et al.*, 2007). Bien que privés de RPL13a, les ribosomes continuent à traduire et les cellules à se diviser à un rythme normal (FIGURE 20).

2.3. Les méthodes d'étude de la traduction

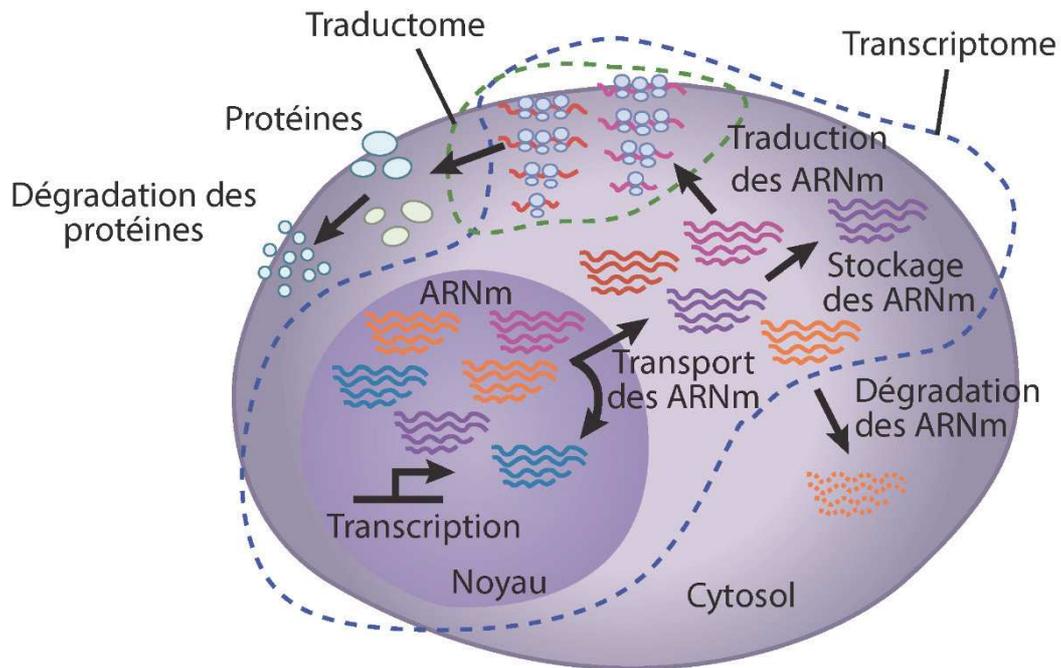
Comme nous venons de le voir, la traduction est une étape de l'expression génique finement régulée, qui permet de contrôler de manière quantitative, qualitative et spatio-temporelle l'expression des protéines.

L'étude de l'expression des gènes s'est focalisée pendant de nombreuses années sur l'analyse des transcrits (FIGURE 21A). Pourtant lorsqu'on prête attention à la diversité des mécanismes de régulation qui s'exerce au niveau traductionnel, il apparaît évident qu'il ne puisse exister de corrélation forte entre les niveaux d'expression des ARNm et ceux des protéines. L'étude de la traduction permet donc de mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes et peut également expliquer les différences qui existent entre transcriptome et protéome ; toutefois l'utilisation de ces trois approches est complémentaire (FIGURE 21B).

Ces dernières années, les technologies permettant d'étudier la traduction, en prenant en compte l'ensemble des aspects évoqués plus haut, ont connu un essor considérable.

Dans cette partie nous allons passer en revue quelques-unes de ces méthodes.

a



b

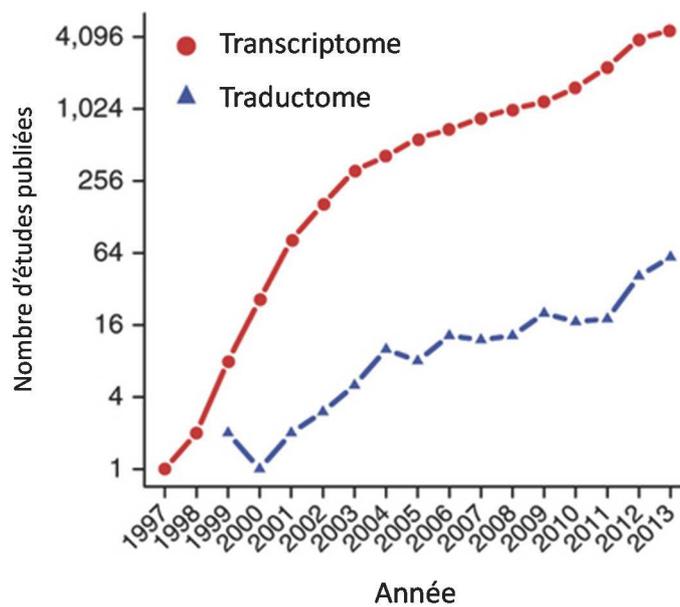


Figure 21 : Transcriptome versus traductome. (a) L'ensemble des ARN messagers de la cellule correspond au transcriptome cellulaire. La partie des ARN messagers qui n'est ni dégradée, ni stockée et qui est recrutée dans les polysomes pour être traduite correspond au traductome (b) Bien que la traduction soit un mécanisme majeur de la régulation de l'expression des gènes, les études sur le traductome sont beaucoup moins nombreuses que celles sur le transcriptome. Ce graphique répertorie les études publiées chaque année sur le transcriptome et sur le traductome.

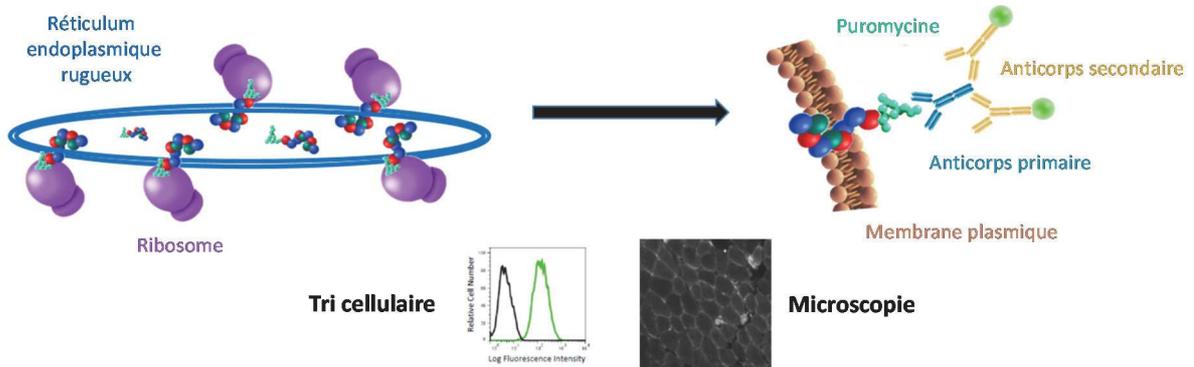
Adapté de Piccirillo et al. 2014

2.3.1. Les méthodes d'étude quantitative de la traduction

L'une des approches les plus anciennes, et les plus largement utilisées, pour mesurer le taux de synthèse protéique est le marquage métabolique basé sur l'incorporation d'acides aminés radioactifs dans les chaînes naissantes (Melchior e Tarver, 1947). Généralement, on utilise la méthionine ou la cystéine marquée avec des radio-isotopes émetteurs β de faible énergie tels que le soufre 35 (^{35}S -methionine et ^{35}S -methionine/cystéine). Cette méthode permet de suivre la biosynthèse, la maturation et la dégradation des protéines in-vivo. La quantification et l'identification des protéines marquées sont habituellement réalisées par séparation sur un gel d'électrophorèse bidimensionnel suivi d'une autoradiographie.

Une alternative intéressante aux radioéléments est l'utilisation de la Puromycine. La Puromycine, antibiotique nucléosidique produit par la bactérie *Streptomyces alboniger*, est un analogue structural d'un ARNt tyrosine (ARNtTyr) chargé qui inhibe l'élongation en s'incorporant dans la chaîne polypeptidique naissante via la formation d'une liaison peptidique (Darken, 1964; Nathans, 1964). Cependant, alors que les aminoacyl-ARNt contiennent une liaison ester hydrolysable entre le ribose de l'ARNt et l'acide aminé associé, la Puromycine possède une liaison non hydrolysable. Ainsi, la liaison de la Puromycine à une chaîne peptidique naissante empêche la formation d'une nouvelle liaison peptidique avec le prochain aminoacyl-ARNt, aboutissant à l'arrêt de l'élongation et au détachement des chaînes polypeptidiques tronquées (Traut e Monro, 1964). A très haute concentration (50 $\mu\text{g/ml}$), la Puromycine inhibe la synthèse protéique en produisant de courts fragments polypeptidiques puromycylés. Cependant, lorsqu'elle est utilisée à des concentrations très faibles (4 $\mu\text{g/ml}$), la Puromycine ne rentre plus en compétition avec l'ARNtTyr pendant la phase d'élongation mais s'incorpore au niveau du codon stop, à l'extrémité C-terminale de protéines complètement synthétisées (Miyamoto-Sato *et al.*, 2000). L'incorporation de Puromycine au niveau de la protéine néosynthétisée reflète alors le taux de synthèse protéique et ce marquage, couplé à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la Puromycine, a donné naissance à la méthode appelée *surface sensing of translation* ou SUNSET (Schmidt *et al.*, 2009). Cette méthode permet d'évaluer l'activité traductionnelle dans une cellule individuelle par microscopie d'immunofluorescence ou dans une population hétérogène de cellules par tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) (FIGURE 22A).

a



b

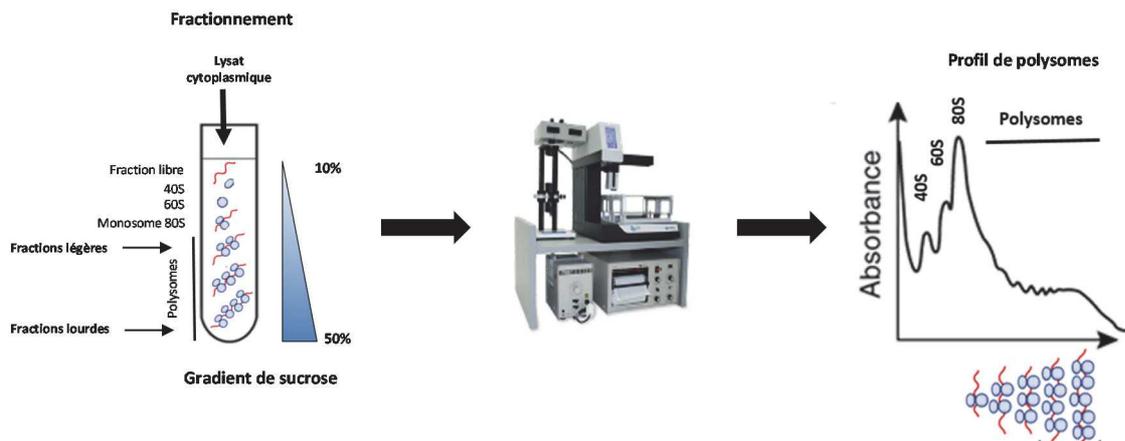


Figure 22 : Les méthodes d'étude quantitative de la traduction. (a) Le *surface sensing of translation SUNSET*. Lorsqu'elle est utilisée à faible concentration la Puromycine s'incorpore en c-terminale des protéines complètement synthétisées. Une fois exportées à la membrane ces protéines puromycylées peuvent être détectées avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre la puromycine. Le marquage obtenu est le reflet de l'activité translationnelle. **(b) Le profil de polysome.** Les ARNm sont séparés par centrifugation sur gradient de sucrose. Après centrifugation, la mesure de l'absorbance permet d'établir le profil de polysomes.

L'activité globale de la synthèse protéique peut également être évaluée par l'établissement du profil de polysomes (Mašek *et al.*, 2011). Cette technique développée dans les années 60 est basée sur la sédimentation différentielle des ARNm en fonction de la quantité de ribosomes qui leur sont associés (Zomzely *et al.*, 1966). Les ARNm en cours de traduction, donc liés à un ribosome (80S) ou à plusieurs ribosomes (polysomes), sont séparés des ARN libres, de la petite sous-unité 40S et de la grand-sous-unité 60S par centrifugation sur un gradient de sucrose. Après centrifugation, la mesure de l'absorbance des différentes fractions du gradient permet d'obtenir le profil de polysomes, celui-ci apporte des renseignements sur la quantité d'ARNm activement traduit (FIGURE 22B).

Il s'agit ici de la première étape des méthodes d'étude qualitative présentées dans le paragraphe suivant.

2.3.2. Les méthodes d'étude qualitative de la traduction

Le gradient de sucrose ainsi obtenu lors de l'établissement du profil de polysomes, peut être fractionné afin d'isoler les ARNm en fonction du nombre de ribosomes auxquels ils sont liés. Les ARNm extraits de chaque fraction peuvent être utilisés pour déterminer des changements dans leur distribution au sein du gradient, sachant que plus les ARNm sont associés aux fractions polysomales lourdes (bas du gradient), plus le messenger est traduit et inversement ; on distingue alors les *light fractions* des *heavy fractions*. Le contenu des fractions peut être analysé par northern blotting, RT-qPCR ou être utilisé pour une étude pan-génomique sur puces à ARN ou par séquençage de l'ARN (*RNA-Seq*) (FIGURE 23A). Le profil de polysomes permet également d'étudier les protéines associées à des complexes d'initiation ou aux ribosomes par une analyse en western blotting ou protéomique (Fleischer *et al.*, 2006).

Une autre méthode, appelé profil ribosomal, *ribosome profiling*, *ribosome footprint* ou *ribo-seq*, a vu le jour en 2009 (Ingolia *et al.*, 2009) (FIGURE 23B). Cette méthode permet une étude de la traduction à l'échelle du génome et avec une résolution au codon prêt. Elle est basée sur le séquençage à haut débit des fragments d'ARNm protégés par le ribosome, *RNA protected fragment* (RPF) qui persistent après traitement des ARNm à la RNase I (Ingolia, 2014). Outre l'identification des messagers engagés par la machinerie traductionnelle, déjà permise grâce au profil de polysomes, la véritable force de la technique est la possibilité de

cartographier la position exacte des ribosomes sur l'ensemble des ARNm. Associée à une analyse bioinformatique rigoureuse, cette méthode permet non seulement de déterminer les sites d'initiations canoniques ou alternatifs, les uORF et les cadres de lectures utilisés, mais aussi d'obtenir de précieuses informations dynamiques sur le nombre de ribosomes par ARNm, la vitesse de lecture et les sites de pause (Ingolia, 2014).

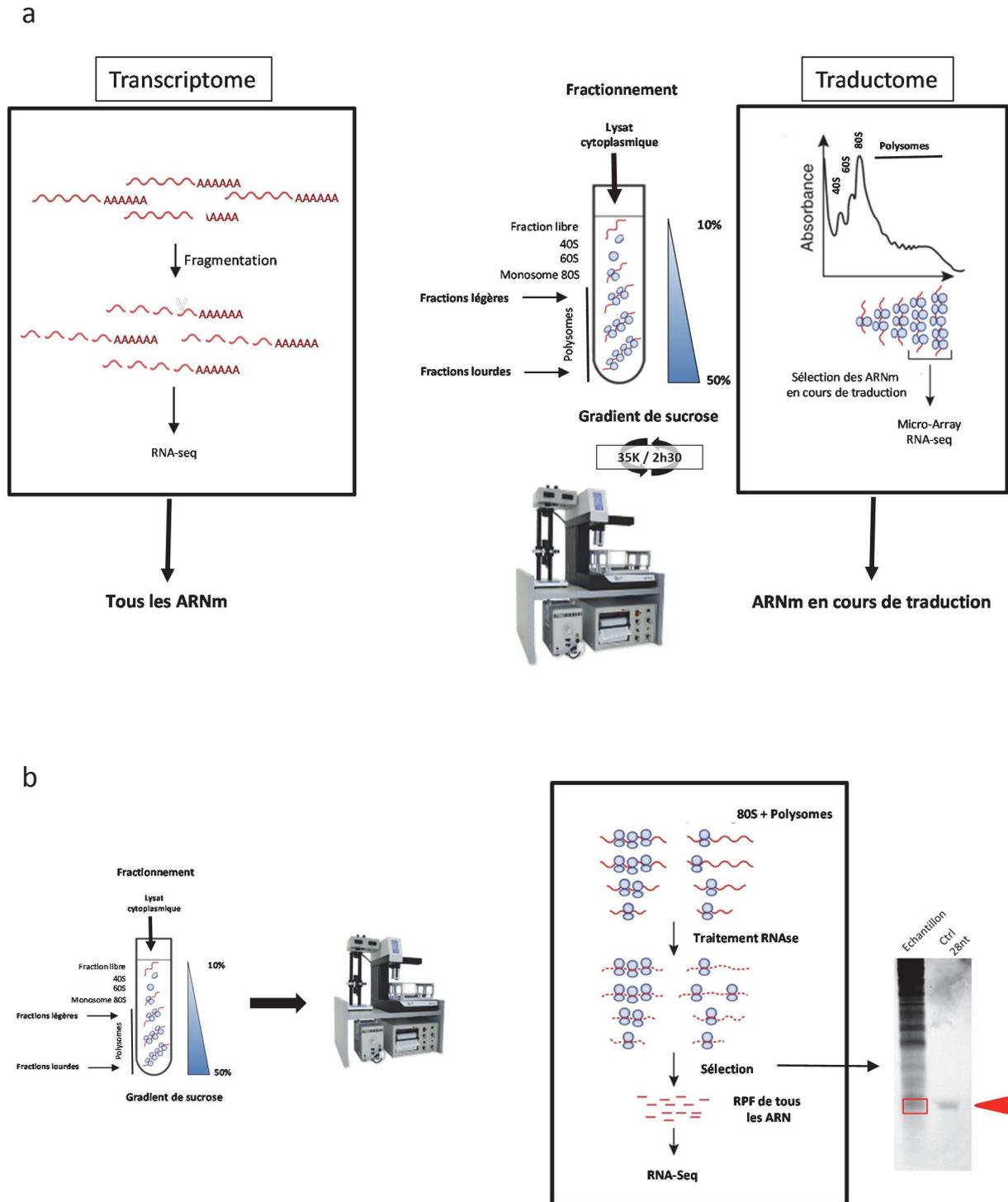


Figure 23 : Les méthodes d'étude qualitative de la traduction. (a) Les études transcriptomiques consistent à séquencer l'ensemble des ARNm cellulaires. Après avoir réalisé un profil de polysome, les différentes fractions contenant les ARNm en cours de traduction sont collectées pour être analysées par séquençage ou Micro-Array. **(b)** Pour établir un *ribosome profiling*, les fragments d'ARNm protégés par le ribosome sont isolés puis séquencés.

2.3.3. Les méthodes d'étude de la répartition spatio-temporelle de la traduction

Afin de comprendre comment la régulation traductionnelle s'exerce à la fois dans le temps et dans l'espace, il est nécessaire d'avoir des outils permettant de visualiser et d'identifier les chaînes polypeptidiques naissantes.

La localisation des polysomes joue un rôle clé dans la synthèse protéique locale qui est impliquée dans divers processus comme nous l'avons abordé précédemment.

La méthode de ribopuromycylation (RPM) (David *et al.*, 2011), basée sur l'incorporation de Puromycine dans les chaînes polypeptidiques naissantes des ribosomes figés en phase d'élongation, permet de visualiser et de quantifier les sites de traduction actifs, par immunofluorescence, dans des cellules fixées et perméabilisées. Cet outil a notamment permis de visualiser pour la première fois des sites de traduction actifs dans le noyau et principalement au niveau du nucléole (David *et al.*, 2012).

Un autre outil, basé sur l'étiquetage des protéines naissantes avec le système de visualisation SunTag (Tanenbaum *et al.*, 2014), permet d'observer en temps réel la dynamique spatiale et temporelle de la traduction d'ARNm endogènes à l'échelle de la molécule unique (Pichon *et al.*, 2016).

Cette méthode fournit des informations sur la vitesse de synthèse de la protéine, sur le nombre de ribosomes engagés en traduction sur cet ARNm et sur sa localisation subcellulaire.

La régulation de la synthèse protéique s'effectue à plusieurs niveaux et le maintien de l'homéostasie cellulaire dépend de l'extrême finesse avec laquelle sont coordonnés les constituants de cette machinerie complexe.

Le développement de nouvelles technologies a permis de mettre en lumière les mécanismes en jeu dans un contexte physiologique, ainsi que les altérations en lien avec le développement de pathologies.

La 3^{ème} partie de cette introduction fera le lien entre la machinerie traductionnelle et le cancer ; une attention particulière sera portée sur le rôle du ribosome dans la tumorigenèse.

3. Implication du ribosome dans le cancer

Des décennies de recherche sur les programmes moléculaires qui régissent la transformation cellulaire se sont uniquement focalisées sur le « transcriptome cancéreux ». Comme nous l'avons vu, la traduction est l'étape ultime de la production des protéines et il est surprenant de constater à quel point la communauté scientifique a pu, pendant tant d'années, négliger son importance dans le développement du cancer. Et pourtant, le contrôle traductionnel est une composante essentielle dans le développement et la progression de cette pathologie. En effet, il permet d'une part de contrôler la traduction globale des protéines, et d'autre part la traduction sélective d'ARNm permettant la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse, la transformation, l'invasion et les processus métastatiques. Pour chaque type ou chaque stade de cancer, le contrôle traductionnel implique des altérations de la synthèse et des activités des facteurs de la traduction (Stumpf e Ruggero, 2011).

Dans ce chapitre, nous allons voir quelles sont les implications du ribosome dans le développement et l'évolution de cette pathologie (FIGURE 24).

3.1. Les ribosomopathies

Comme nous l'avons vu précédemment, la biogenèse des ribosomes résulte de la coordination de nombreux acteurs; ainsi toute altération intervenant sur l'un des éléments constitutifs du ribosome ou l'un des éléments impliqués dans le processus va avoir des conséquences sur son intégrité. Les altérations de la biogenèse des ribosomes sont associées à un groupe de pathologies appelées ribosomopathies (TABLEAU 3). J'ai choisi de présenter ci-dessous trois ribosomopathies représentatives des différentes origines retrouvées dans ce type de pathologies : défaut de transcription des ARNr, haploinsuffisance touchant les protéines ribosomiques ou défaut de maturation des ARNr.

Bien que la biogenèse des ribosomes soit un processus global, qui se produit dans toutes les cellules, les caractéristiques cliniques des ribosomopathies diffèrent en fonction des pathologies et peuvent inclure une défaillance de la moelle osseuse ou des anomalies du développement. Cependant, toutes sont associées à un risque accru de cancer.

Tableau 3 : Les ribosomopathies

Pathologie	Gène impliqué	Signes cliniques
Anémie de Diamond-Blackfan (DBA)	10–15 protéines ribosomiques (S19, S26, L5, L11)	Anémie Retard de croissance Anomalies congénitales Risque accru de cancer
Syndrome 5q	RPS14	Anémie Risque accru de leucémie myéloïde aigue
Syndrome de Schwachman-Diamond (SDS)	SBDS	Insuffisance du pancréas exocrine Troubles hématologiques (neutropénie) Déficience neurocognitive Risque accru de leucémie
Dyskératose congénitale lié au chromosome X (DC)	DKC1	Anomalies cutaneo-muqueuse Fibrose pulmonaire Insuffisance médullaire
Hypoplasie cartilage-cheveux (CHH)	RMRP	Petite taille Malformation osseuses Anomalies de la croissance des cheveux Risque accru de cancer de la peau et de lymphome
Syndrome de Treacher-Collins (TCS)	TCOF1	Anomalies cranio-faciales
Syndrome de Bowen-Conradi	EMG1	Retard sévère de croissance Macrocéphalie Dysmorphie faciale
Cirrhose amérindienne infantile	hUTP4/Cirhin	Cholestase évoluant vers la cirrhose Hypertension portale

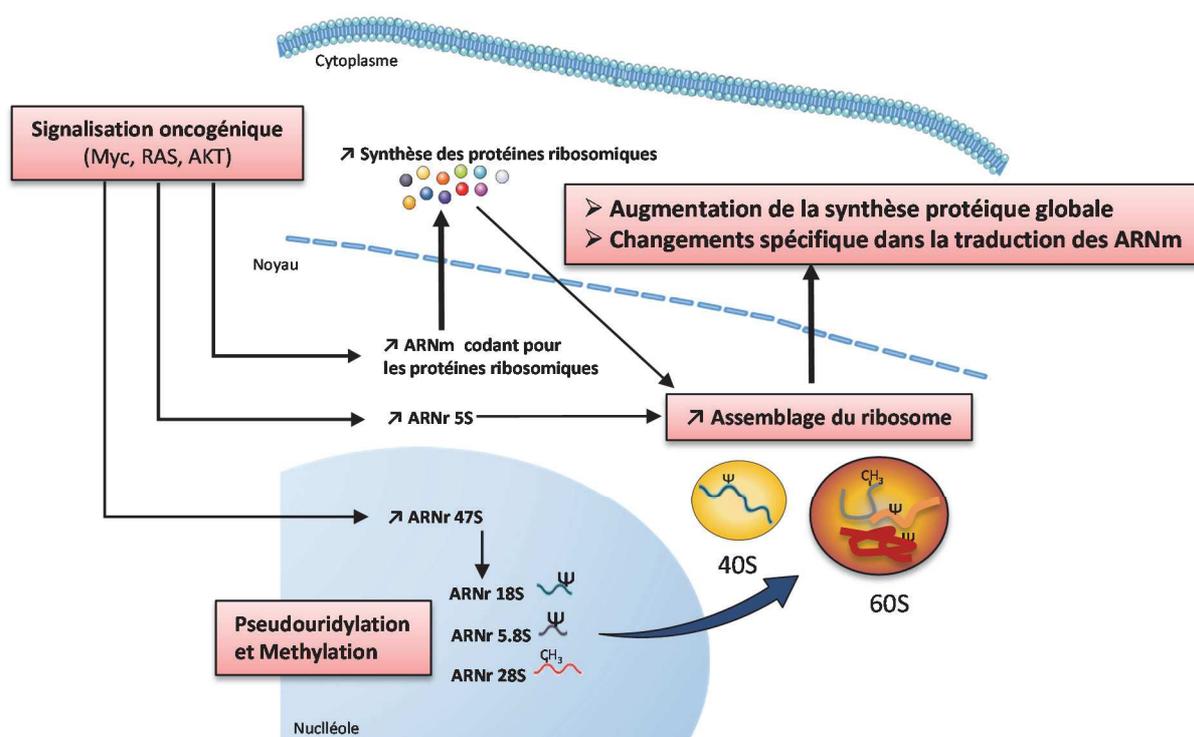


Figure 24 : Le ribosome cancéreux. L'activation de voies oncogéniques va induire une augmentation de la biogenèse des ribosomes ainsi que des altérations des profils de modification des ARNr. Il en résulte une augmentation de la synthèse protéique globale ainsi que des modifications spécifiques des ARNm traduits.

D'après Truitt et Ruggero 2016

3.1.1. Le syndrome de Treacher Collins

Le syndrome de Treacher Collins (TCS) est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Elle est caractérisée par des anomalies cranio-faciales affectant les oreilles, les yeux, ainsi que les os du visage, et peut être à l'origine d'une surdité, de difficultés respiratoires et de difficultés à s'alimenter (Poswillo, 1975).

Cette pathologie est liée à une mutation du gène *Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1* (TCOF1) ; ce gène code pour une phosphoprotéine nucléolaire, co-localisant avec UBF1 et Pol I, et jouant un rôle essentiel dans la transcription de l'ADNr et dans la maturation de l'ARNr (Valdez *et al.*, 2004). Les modèles murins de TCS humain ont révélé une activation de la voie p53 entraînant l'apoptose et une diminution de 25% des cellules de la crête neurale (Dixon *et al.*, 2006). Des mutations affectant les sous-unités C et D de la Pol I (POLR1C et POLR1D), ont également été identifiées chez les patients atteints de TCS; ces deux gènes participent à la transcription des ADNr (Schaefer *et al.*, 2014).

3.1.2. L'anémie de Diamond-Blackfan

L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) est une dysplasie érythroïde congénitale caractérisée par une anémie causée par la diminution sélective ou l'absence de précurseurs érythroïdiens, une réticulocytopenie et une macrocytose (Delaporta *et al.*, 2014). Les individus atteints de DBA présentent des anomalies cranio-faciales ressemblant à celles du TCS, ainsi que des atteintes cardiaques et des anomalies du pouce. Cette pathologie est causée par des mutations dans les gènes codants pour différentes protéines ribosomiques, le plus souvent RPS19, RPS26, RPL5 et RPL11 (Delaporta *et al.*, 2014).

Comme dans le TCS, l'activation de la voie p53 est retrouvée dans cette pathologie (Ellis, 2014). Le gène suppresseur de tumeur p53 semble jouer un rôle critique dans la physiopathologie des ribosomopathies. L'hypothèse est que l'haploinsuffisance ribosomique aboutit à l'interruption de la biogenèse des ribosomes avec une accumulation de PR libres se liant à MDM2. La protéine MDM2 est une E3 ubiquitin ligase qui en condition normale se lie à p53 pour entraîner sa dégradation par le protéasome. Par conséquent, l'anémie est liée à l'accumulation de p53 entraînant un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Plusieurs modèles animaux ont montré que l'anémie associée à l'haploinsuffisance ribosomique est

presque complètement abolie dans les modèles p53^{+/-} présentant la perte d'un seul allèle (Watkins-Chow *et al.*, 2013).

3.1.3. La dyskeratose congénitale

La dyskeratosis congenitale (DC) est une maladie héréditaire, très polymorphe sur le plan clinique et hétérogène du point de vue génétique. Elle est associée à des anomalies cutané-muqueuses, une fibrose pulmonaire, une insuffisance médullaire et un vieillissement prématuré (Jyonouchi *et al.*, 2011).

La forme la plus classique, qui est aussi la plus sévère, est celle de la transmission liée au sexe, appelée *X-linked dyskeratosis congenita*. Cette forme est liée à une mutation du gène codant la dyskerine DKC1, une pseudouridine synthase responsable de modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr par conversion de l'uridine (U) en pseudouridine (ψ) (Heiss *et al.*, 1998). Cette mutation entraîne un défaut de maturation des ARNr, qui semble entraîner à son tour une diminution de la fidélité de traduction et des altérations de la traduction dépendante des IRES (Yoon *et al.*, 2006).

3.2. Augmentation de la biogenèse du ribosome

La biogenèse des ribosomes et la traduction globale des protéines sont régulées de manière fine et dynamique afin de répondre aux exigences des cellules en croissance ; en effet, une augmentation de la masse est un prérequis à la division cellulaire. Ceci est permis grâce à l'activation de voies de signalisation qui vont intégrer divers stimuli tels que la disponibilité en énergie et en nutriments ou l'action de facteurs de croissance, pour contrôler directement la production et les activités du ribosome. Un des premiers marqueurs des cellules cancéreuses, découvert il y a plus de 100 ans, est l'augmentation de la taille et du nombre de nucléoles. Cette observation est le reflet du besoin conséquent en ribosome dans les cellules tumorales permettant de maintenir un niveau suffisant de protéines afin de supporter l'augmentation de la croissance et des divisions caractéristiques de ces cellules.

Plusieurs voies de signalisations oncogéniques activées par des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur sont impliquées dans la régulation de la synthèse des composants du ribosome ou dans l'initiation de la traduction par le ribosome.

C'est le cas par exemple de l'activation des voies PI3-AKT-mTOR (Mayer e Grummt, 2006; Gentilella *et al.*, 2015) , RAS-MAPK (Roux *et al.*, 2007), MYC (Van Riggelen *et al.*, 2010; Hannan *et al.*, 2011) ou de la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur tels que PTEN (Li *et al.*, 2014), p53 (Hannan *et al.*, 2013) ou pRB (Drygin *et al.*, 2010), qui vont entraîner une augmentation de la biogenèse des ribosomes ainsi qu'une augmentation de la traduction dépendante de la coiffe.

Un exemple intéressant de signal oncogénique reposant sur la machinerie traductionnelle pour assurer la transformation cellulaire est l'oncogène Myc (Ruggero, 2009), qui est fréquemment dérégulé dans les cancers humains. Myc induit l'augmentation de la synthèse protéique en contrôlant directement l'expression des composants de la machinerie traductionnelle tels que les PR, les facteurs d'initiation de la traduction, pol III et l'ADNr (Van Riggelen *et al.*, 2010). Myc peut également accroître la biogenèse des ribosomes en régulant l'expression de facteurs auxiliaires nécessaires à la maturation de l'ARNr, à l'assemblage des ribosomes et à l'export des sous-unités du noyau vers le cytoplasme (Schlosser *et al.*, 2003; Tschochner e Hurt, 2003) (FIGURE 24).

Le nombre remarquable de composants de la machinerie traductionnelle dérégulés dans le cancer, et dont les activités sont directement contrôlées par des signaux oncogéniques spécifiques, suggère fortement un rôle critique de la machinerie traductionnelle dans l'initiation et la progression du cancer. De plus, des perturbations dans le contrôle traductionnel entraînent des modifications spécifiques de l'expression de gènes impliqués dans différentes étapes du développement du cancer.

3.3. Altération des profils de modifications des ARNr

La cellule tumorale utilise un autre mécanisme majeur pour altérer la biogenèse du ribosome et diriger la traduction sélective du génome cancéreux : il s'agit de la modification des ARNr (FIGURE 24).

Les modifications les plus fréquentes sont les méthylations et les pseudouridylations retrouvées dans des régions fonctionnelles de l'ARNr.

La plupart des méthylations de l'ARNr sont catalysées par la 2'-O-méthyltransférase fibrillarine (FBL) guidée par les snoARN de classe C/D. Au cours de la tumorigenèse, des modifications des motifs de méthylation de l'ARNr ont été associées à des altérations

traductionnelles ciblant des ARNm spécifiques (Marcel *et al.*, 2013). Par exemple, la perte de p53 induit une augmentation de l'expression de la FBL associée à un défaut de la fidélité de la traduction se manifestant par une mauvaise incorporation d'acides aminés et une altération de la lecture des codons stop. Celle-ci est également associée à une augmentation de la traduction d'ARNm porteurs d'IRES et codant des protéines en lien avec le cancer, tel que le récepteur du facteur de croissance à l'insuline (IGF-1R), c-Myc, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A) et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF1 et FGF2) (Marcel *et al.*, 2013).

Un mécanisme identique se retrouve dans la dyskératose congénitale, dans laquelle la perte de fonction de la dyskerine entraîne une altération de la traduction dépendante des IRES de gènes suppresseurs de tumeur, tel que p27 et p53 (Yoon *et al.*, 2006), ainsi qu'une augmentation de la traduction du facteur VEGF (Rocchi *et al.*, 2013). Il s'ensuit des changements dans l'expression d'un sous-groupe de snoARN, entraînant à leur tour des altérations des motifs de pseudouridylation de l'ARNr.

3.4. Fonctions extra-ribosomiques et cancer

De par leur(s) fonction(s) extra-ribosomique(s), certaines PR vont agir comme suppresseurs de tumeur ou au contraire avoir un effet oncogénique.

C'est le cas par exemple de RPL5, RPL11 et RPS14 qui vont agir comme suppresseurs de tumeur en inactivant l'oncogène c-Myc.

RPS14 va inhiber c-myc en agissant de deux manières différentes. D'une part, elle va inhiber l'activité transcriptionnelle de c-myc en empêchant le recrutement de c-myc et de son cofacteur TRRAP sur le promoteur du gène cible, et d'autre part, elle va interagir avec Ago2 pour déclencher la dégradation de l'ARNm de c-myc par l'intermédiaire du miR 145 (Zhou *et al.*, 2013).

Quant à RPL5 et RPL11, elles travaillent de concert pour guider le complexe d'interférence d'ARN, *RNA-induced silencing complex* (RISC) sur l'ARNm de c-Myc et entraîner ainsi sa dégradation (Liao *et al.*, 2014) (FIGURE 25).

D'autre part, un certain nombre d'événements vont aboutir à une altération de la biogenèse des ribosomes conduisant à l'induction d'un stress nucléolaire. En réponse à ce stress, certaines protéines ribosomiques (RPL5, L11, L23, L26, L37, S3, S7, S14, S15, S20, S25, S26, S27 et S27L) vont pouvoir se lier à MDM2, bloquant ainsi l'ubiquitination et la dégradation de p53 (Holmberg Olausson *et al.*, 2012). Ce faisant, les PR jouent un rôle crucial en connectant les dérégulations de la biogenèse du ribosome à l'inhibition de la division cellulaire. La voie de signalisation PR-MDM2-p53 agit comme un commutateur moléculaire constituant un réseau de surveillance de l'intégrité de la biogenèse des ribosomes (Zhang e Lu, 2009; Kim *et al.*, 2014) (FIGURE 26).

A l'inverse, la protéine RPS3a semblerait avoir un effet oncogénique ; en effet, sa surexpression est corrélée positivement à la prolifération et à la croissance dans le carcinome hépatocellulaire. Par son rôle extra-ribosomique de chaperonne, RPS3a permettrait d'augmenter l'expression de la protéine anti-apoptotiques HBx, entraînant ainsi l'inhibition du processus de mort cellulaire programmée (Naora *et al.*, 1998).

Un autre exemple concerne la protéine ribosomique RPS27, connue sous le nom de Metallopanstimulin-1 (MPS-1), qui semble également avoir des propriétés oncogéniques. Celle-ci est surexprimée dans le cancer gastrique et cette surexpression est associée au processus métastatique. Il semblerait que RPS27 régule l'invasion et la migration cellulaire en induisant l'expression de l'intégrine $\beta 4$ (ITGB4) (Yang, Z. Y. *et al.*, 2013).

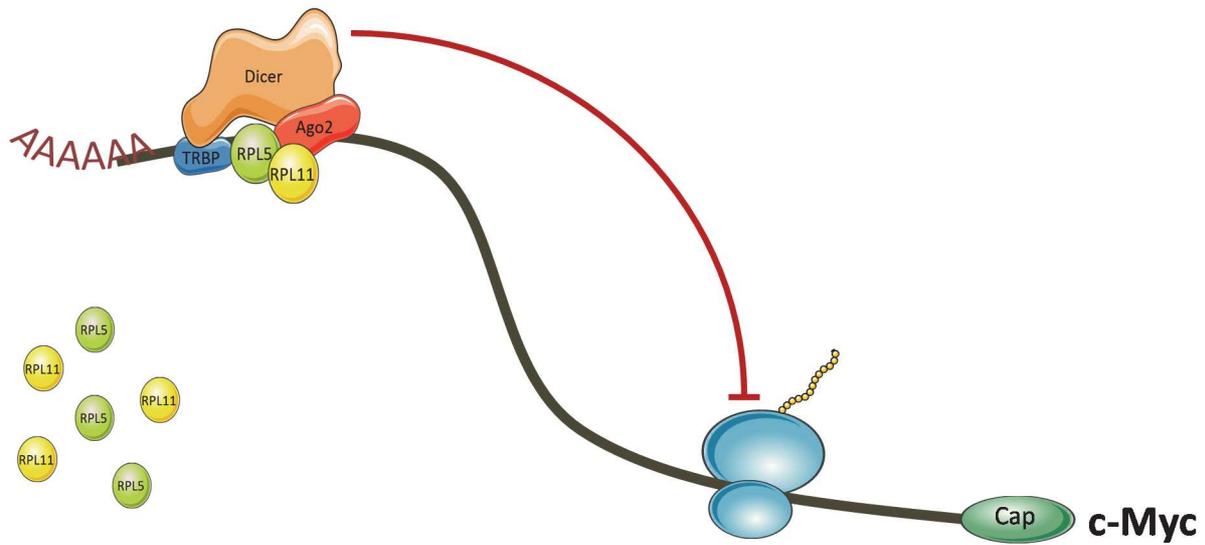


Figure 25 : Dégradation de l'ARNm de c-Myc par RPL5 et RPL11. Les formes libres des protéines ribosomiques RPL5 et RPL11 conduisent le complexe d'interférence d'ARN RISC au niveau de l'ARNm de c-Myc entraînant ainsi son inactivation.

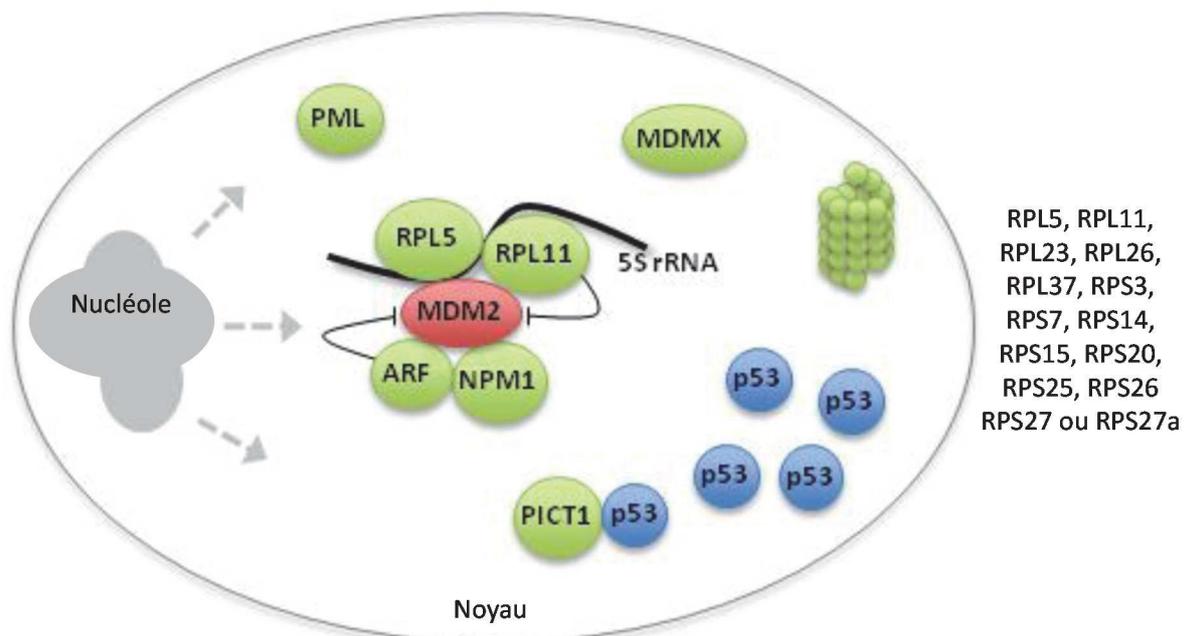


Figure 26 : La voie RP-MDM2-p53. En réponse à un stress nucléolaire, certaines protéines ribosomiques vont se lier à MDM2 empêchant ainsi l'ubiquitination et la dégradation de p53.

Adapté de Olausson et al. 2012

3.5. Dérégulation de l'expression des protéines ribosomiques

L'augmentation globale de l'expression des PR, liée à l'augmentation de la biogenèse des ribosomes, est nécessaire afin de soutenir la croissance tumorale. Cependant, au-delà de cette observation, des altérations spécifiques de l'expression de certaines protéines ribosomiques ont été mises en évidence dans différents types de cancer. Il semblerait que les modifications d'expression des PR soient spécifiques à un type de tumeur, et également que cette expression puisse varier au cours de l'évolution tumorale (TABLEAU 4).

Ainsi, l'analyse immunohistochimique de 60 échantillons de foie issus de patients atteints de carcinome hépatocellulaire (CHC) a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la protéine RPL36 dans 75% des tissus tumoraux analysés en comparaison avec le tissu sain correspondant. Alors que son expression est élevée dans les stades précoces de l'hépatocarcinogenèse, celle-ci diminue lors de la progression tumorale ; il semblerait alors que RPL36 exercerait plutôt un rôle suppresseur de tumeur dans le développement du CHC. De plus, les auteurs suggèrent que RPL36 pourrait être utilisée comme marqueur pronostic sachant qu'il existe une corrélation positive entre l'expression de RPL36 et la survie des patients (Song *et al.*, 2011).

Dans le cancer de la prostate, il semblerait que l'augmentation de l'expression de RPL19 soit de mauvais pronostic. En effet, une relation inverse entre l'expression de RPL19 et la survie des patients a été établie. La significativité statistique de cette étude est comparable au score de Gleason, utilisé classiquement pour évaluer l'agressivité du cancer de la prostate (Bee *et al.*, 2006).

Tableau 4 : Dérégulation de l'expression des protéines ribosomiques et cancer

Type de cancer	Protéines ribosomiques
Oesophage	RPL15
Gastrointestinal	RPL13
Hepatocellulaire	RPL13, RPL36a, RPL12, RPL23a, RPL27, RPL30, RPS8
Colorectal	RPL5, RPL18, RPL22, RPL26, RPL31, RPL35, RPS3, RPS6, RPS8, RPS12, RPO
Prostate	RPL19, RPL37, RPL7a
Col	RPS12
Sein	L19

Pour le cancer colorectal (CRC), c'est à partir de 1988 que les protéines ribosomiques ont commencé à émerger des analyses de banques d'ADNc. Le premier ARNm, associé à la progression tumorale et aux processus métastatiques, a été isolé en 1988 et identifié en 1990 comme étant l'ARNm codant la protéine RPLP2 (Elvin *et al.*, 1988; Sharp *et al.*, 1990).

Une autre étude menée en 1989 consista à analyser l'expression de RPL31 au sein de tissus issus de CRC. Les auteurs ont choisi d'étudier la protéine RPL31, car elle a préalablement été identifiée comme surexprimée dans le tissu sain de colon de patients atteints de polypose adénomateuse familiale (PAF). L'augmentation de l'expression de l'ARNm de cette protéine a été retrouvée sans exception dans les 23 CRC analysés. Ces résultats indiquent que RPL31 pourrait être impliquée dans la prolifération et le développement tumoral (Chester *et al.*, 1989).

Par la suite, d'autres protéines ribosomiques différentiellement exprimées dans le cancer colorectal ont été identifiées (Pogue-Geile *et al.*, 1991; Kasai *et al.*, 2003). De plus, l'expression de certaines d'entre elles a pu être corrélée à la classification de Duke, avec des niveaux d'expression plus élevés dans les métastases hépatiques de cancer colorectal que dans les CHC primaires (Lai e Xu, 2007).

Les protéines RPL13 (Kobayashi *et al.*, 2006) et RPL22 (Ferreira *et al.*, 2014) sont également dérégulées dans le cancer colorectal, et nous reviendrons dessus en détail ultérieurement (*Résultats Partie II 1 et Partie III 1*).

D'une manière générale, les résultats des études présentées ci-dessus appuient la notion selon laquelle il existe des variations d'expression des protéines ribosomiques dans le cancer colorectal. Les profils d'expression variés révèlent la complexité de leur rôle dans les modifications associées à la formation des tumeurs coliques. La plupart des études demeurent superficielles et se focalisent uniquement sur les différents profils d'expression des protéines ribosomiques. Elles ne permettent pas de déterminer avec exactitude leur rôle dans la carcinogenèse et il reste beaucoup à faire pour comprendre en détail leurs fonctions et révéler les mécanismes sous-jacents.

La synthèse protéique joue un rôle majeur dans la carcinogenèse : d'une part, une synthèse protéique élevée est nécessaire à la prolifération des cellules tumorales, et d'autre part, l'expression spécifique de protéines pro-oncogéniques est favorisée par

une traduction sélective. Les mécanismes sous-tendant ces dérégulations impliquent entre autres le ribosome et de nombreuses observations laissent à penser que ce « ribosome cancéreux » pourrait également jouer un rôle essentiel dans les différentes étapes du cancer colorectal.

Dans ce dernier chapitre d'introduction, je vous présenterai les principales caractéristiques du cancer colorectal. Une attention particulière sera portée aux cellules souches cancéreuses qui, de par leur incroyable capacité d'adaptation, joueraient un rôle prépondérant dans l'initiation et l'évolution de cette pathologie.

4. Le cancer colorectal et les cellules souches cancéreuses

4.1. Généralités sur le cancer colorectal

Le cancer colorectal est la 2^{ème} cause de mortalité par cancer en France. Ce fort taux de mortalité est lié à l'apparition de métastases hépatiques chez 40 à 50% des patients, faisant chuter les taux de survie à 5 ans de 90% à seulement 10%.

Les cancers colorectaux peuvent être divisés en deux grandes catégories : les cancers sporadiques qui représentent la majorité des cas (80 à 85%) et les cancers héréditaires. Ces derniers se divisent eux-mêmes en deux types principaux qui sont les cancers dérivant de la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF), et les cancers colorectaux héréditaires sans polypose (HNPCC).

4.2. L'instabilité génomique

Une forte instabilité génomique est caractéristique de la plupart des cancers (Negrini *et al.*, 2010). Dans le cancer colorectal, nous retrouvons deux formes d'instabilité génomique, qui sont l'instabilité des microsatellites et l'instabilité des chromosomes (Grady e Carethers, 2008).

L'instabilité des microsatellites, *microsatellite instability* (MSI), est liée à des mutations autosomales dominantes des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN, *mutation mismatch repair* (MMR). Ce système est composé de quatre gènes : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*. Les microsatellites sont des séquences nucléotidiques répétées d'une paire de bases à quelques paires de bases ; du fait de cette structure répétitive, ils sont particulièrement sujets aux erreurs de réplication en cas de défaillance du système MMR (Grady e Carethers, 2008).

Environ 15 à 20% des CCR sporadiques ont un phénotype microsatellitaire instable et résultent d'une hyperméthylation du promoteur du gène MLH1 associée à la sénescence de l'épithélium colique.

La quasi-totalité (>95%) des cancers colorectaux intervenant dans le cadre du syndrome de Lynch, représentant environ 2 à 4% des CCR, ont également un phénotype MSI. Ces patients sont prédisposés au développement de nombreux cancers, tels que le côlon, l'endomètre, l'estomac, le tractus urinaire et les ovaires. Le mécanisme en cause est une mutation constitutionnelle héritée d'un des parents, d'un des quatre gènes du système MMR (Grady e Carethers, 2008).

L'instabilité des chromosomes, *chromosomal instability* (CIN), est impliquée dans le reste des cancers sporadiques, à savoir 85% des cas, et elle est à l'origine de la polypose adénomateuse familiale qui concerne 1% des CCR. Ce phénotype est caractérisé par une aneuploïdie, c'est-à-dire une perte ou un gain de matériel chromosomique et la perte d'hétérozygotie (Pino e Chung, 2010).

4.3. Organisation générale de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal, constitué d'une monocouche de cellules, est composé de *villi* et de cryptes. Ces cellules assurent des fonctions très spécialisées ainsi que le renouvellement de l'épithélium. Les cellules spécialisées, qui sont différenciées, recouvrent les *villi* dans l'intestin grêle et se positionnent dans le tiers supérieur des cryptes dans le côlon. Au fond des cryptes, on retrouve les cellules souches qui entretiennent un compartiment prolifératif constitué par leur descendant immédiat qui sont les progéniteurs. Ces cellules donnent naissance aux cinq types de cellules différenciées détectées dans l'intestin: les cellules calciformes, qui produisent le mucus nécessaire à l'évacuation des matières solides et à la protection de la muqueuse, les cellules entéroendocrines qui produisent des hormones, les entérocytes qui assurent la fonction d'absorption de l'intestin, les cellules de Paneth impliquées dans la défense vis-à-vis des pathogènes présents dans la lumière intestinale et les cellules tuft, beaucoup moins représentées, qui seraient impliquées dans la régulation des réponses immunitaires (Barker, 2014).

4.4. Des cellules souches cancéreuses à l'origine du cancer colorectal ?

Tout a commencé en 1994, à la suite de recherches menées sur les leucémies. Une sous-population rare de cellules humaines de phénotype CD33⁺/CD38⁻, isolée à partir de la moelle osseuse ou de sang périphérique de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe, était capable, lorsqu'elle était injectée à des souris immunodéficientes, de reproduire les caractéristiques de la leucémie observée chez le patient (Lapidot *et al.*, 1994). C'est alors que cette cellule fût appelée « cellule initiatrice de leucémie ». Peu de temps après, en 1997, J. Dick montre que cette cellule initiatrice de leucémie possède des caractéristiques de cellules souches, puisqu'elle reconstitue une hiérarchie de progéniteurs et précurseurs dans plusieurs lignées myéloïdes, et qu'elle a la capacité de s'autorenouveler. L'hypothèse des « cellules souches cancéreuses » (CSC), selon laquelle les cancers proviennent de la maturation de cellules souches et qu'ils sont alimentés par une fraction de cellules ayant les caractéristiques de cellules souches, est née (Bonnet e Dick, 1997).

De nouveaux marqueurs ont peu à peu été identifiés ; parmi eux la protéine membranaire CD133 a permis d'isoler à partir de nombreuses tumeurs solides une fraction de CSC (Yin *et al.*, 1997). Ce n'est qu'en 2007 que l'existence de cellules CD133⁺ initiatrices de tumeurs a été démontrée dans les tumeurs du côlon humain (O'brien *et al.*, 2007). Par la suite, une polémique est née quant à la pertinence de ce marqueur et quant à sa signification (Labarge e Bissell, 2008). Toutes les tumeurs ne possèdent pas de cellules souches cancéreuses CD133⁺, mais l'utilisation de ce marqueur a permis des avancées considérables dans le domaine des cellules initiatrices de tumeurs.

La génération d'une nouvelle tumeur à partir de cellules ayant des caractéristiques de cellule souche était un argument fort pour impliquer les cellules souches dans l'initiation tumorale. Cependant, la réelle démonstration expérimentale, dans le contexte intestinal, est venue de l'équipe de Hans Clevers en 2009 (Barker *et al.*, 2009). La tumorigenèse de l'intestin est associée à la présence d'une mutation précoce du gène *adenomatous polyposis coli* (APC), qui est considérée comme l'événement initiateur de la tumeur de l'intestin. Après introduction de cette mutation dans les cellules souches de l'intestin, des foyers adénomateux sont apparus très rapidement, puis des adénomes et adénocarcinomes. Lorsque cette mutation est introduite dans les cellules progénitrices (descendantes des cellules souches), des foyers adénomateux apparaissent, mais ils n'évoluent pas en adénocarcinomes et leur taille reste limitée. Ces travaux suggèrent que seules les cellules souches sont capables d'engendrer de vraies tumeurs *in vivo* (Barker et al., 2009).

4.5. Caractérisation et propriétés des CSC

4.5.1. Caractérisation fonctionnelle des CSC

Pour évaluer la présence de CSC ou pour les isoler à partir d'une population hétérogène de cellules tumorales, on utilise classiquement des tests fonctionnels *in-vitro* et *in-vivo*, basés sur leur capacité à s'autorenouveler, à se différencier et à initier la croissance tumorale.

L'enrichissement *in-vitro* en CSC peut être réalisé grâce à une culture en suspension réalisée dans un milieu sans sérum, additionnée de facteurs de croissances dont l'EGF et le FGF2. Les cellules sont ensemencées à faible densité dans des conditions non-adhérentes, et sont capables de générer d'autres CSC par auto-renouvellement et de se différencier afin de recréer l'hétérogénéité tumorale *in-vitro*. Ce type de culture permet la survie et la croissance clonale des CSC sous forme de sphéroïdes, appelées colosphères dans le cas de cultures issues de CCR (Weiswald *et al.*, 2015) (FIGURE 27A).

Le modèle de culture en colosphères permettrait de générer des cellules avec un pouvoir de tumorigenèse plus élevé que les cellules cultivées en adhérences (Weiswald *et al.*, 2009).

Pour évaluer le nombre de CSC *in-vivo*, on réalise couramment la xénotransplantation d'une petite quantité de cellules tumorales (1000 cellules) dans des souris immunodéficientes. Par la suite, on analyse leur capacité à initier la croissance tumorale et à recréer l'hétérogénéité cellulaire (Cheng *et al.*, 2010) (FIGURE 27B).

Pour s'assurer de la présence de CSC, il est nécessaire de réaliser des transplantations successives pour les modèles *in-vivo*, ou des passages successifs pour les modèles de culture *in-vitro*. Ainsi, seules les cellules capables de générer des tumeurs ou des colosphères après plusieurs passages successifs chez la souris ou *in-vitro* sont considérées comme présentant un phénotype souche.

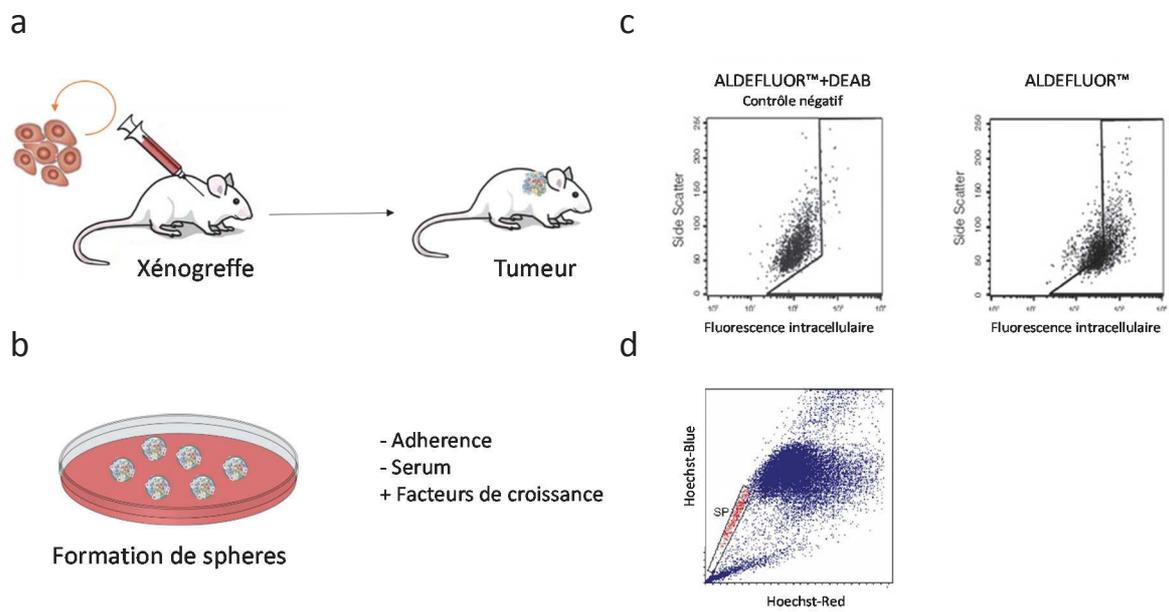


Figure 27 : Caractérisation des cellules souches cancéreuses. La caractérisation des CSC peut se faire par l'utilisation de tests fonctionnels tels que **a)** la xénotransplantation et **b)** la formation de sphères ou par l'utilisation de marqueurs tels que **c)** l'activité aldéhyde déshydrogénase ALDH ou **d)** la définition de la side population.

4.5.2. Caractérisation phénotypique des CSC par l'utilisation de marqueurs

Depuis la démonstration de la présence des CSC dans le cancer du côlon, de nombreux marqueurs membranaires ont été proposés (Cheng *et al.*, 2010). De manière non exhaustive, on peut citer l'expression des marqueurs membranaires, tel que CD133, CD44, CD26. Cependant, la plupart demeurent controversés (Cherciu *et al.*, 2014) et, à ce jour, il n'existe pas de marqueur « idéal » permettant une détection optimale de ces cellules rares.

On peut également identifier ces cellules par leur aptitude à retenir un colorant membranaire tel que le PKH26. En effet, ce marqueur permet d'isoler les cellules présentant un taux de division bas, à savoir les CSC (Richichi *et al.*, 2013).

Afin d'isoler la population de CSC par cytométrie en flux, on peut utiliser la méthode consistant à définir la « *side population* » ; celle-ci est basée sur la présence et l'activité de nombreuses pompes à efflux au niveau de la membrane des CSC. Après marquage au Hoechst33342, les CSC ont la capacité à effluer fortement le marqueur. Par différentiel avec une condition contrôle utilisant un inhibiteur de ces pompes, on peut distinguer par cytométrie en flux cette population minoritaire qui aura disparu (Harris *et al.*, 2008) (FIGURE 27D).

Un des marqueurs les plus utilisés est l'activité enzymatique des aldéhydes déshydrogénases (ALDH), qui sont des enzymes de détoxification capables de transformer les aldéhydes endogènes ou exogènes en acides carboxyliques. La famille des ALDH1, et particulièrement les isoformes ALDH1A1 et ALDH1A3, est impliquée dans la biologie du cancer et particulièrement dans les CSC (Marcato *et al.*, 2011). Dans le CCR, une équipe a montré que les cellules ayant une activité ALDH importante et exprimant fortement CD44 ont un pouvoir tumorigène beaucoup plus important que les cellules exprimant seulement CD44 (Chu *et al.*, 2009) (FIGURE 27C).

4.6. Implication des CSC dans les processus métastatiques

Le développement métastatique représente la principale cause de mortalité chez les patients atteints de CCR, et la compréhension des mécanismes moléculaires associés à ce processus est un enjeu majeur.

Il s'agit d'un mécanisme complexe, qui implique plusieurs étapes entre la tumeur primaire et le site distant de la métastase : 1) le détachement de la tumeur primaire avec acquisition d'un phénotype invasif, 2) l'invasion locale par la dégradation de la lame basale, 3) l'entrée (intravasation) et la survie dans la circulation sanguine, 4) l'extravasation et l'invasion du tissu distant, 5) la survie et 6) la colonisation dans un organe à distance (Tsai e Yang, 2013) (FIGURE 28).

La première étape implique un changement phénotypique des cellules cancéreuses appelé la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Elle représente un programme important lors du développement embryonnaire et peut être réactivée dans un contexte tumoral pour conduire une cellule d'origine épithéliale à acquérir un phénotype de cellule mésenchymateuse. En effet, des cellules de phénotype épithélial, adhérentes, polarisées et non mobiles vont transitoirement acquérir un phénotype migratoire, s'affranchir de la nécessité de jonction intercellulaire et de la polarisation et devenir mobile afin de coloniser le tissu adjacent. Les changements moléculaires associés à cette transition sont notamment la baisse d'expression des protéines de jonctions comme la E-cadhérine, des modifications du cytosquelette entraînant une diminution des cytokératines au profit de la vimentine, et l'activation de différents facteurs de transcription tels que Snail, Slug, Zeb1 et Twist. On retrouve fréquemment la production de différentes protéases capables de dégrader le stroma afin de permettre la progression des cellules. Ce phénotype est dépendant du microenvironnement tumoral et les cytokines jouent un rôle majeur pour promouvoir l'EMT. Ce processus n'est pas stable, et sous l'influence du microenvironnement, une réversion du phénotype est possible et même nécessaire à la colonisation de l'organe distant.

La dissémination peut se faire par voie sanguine ou lymphatique, elle implique un mécanisme d'intravasation, facilité par la structure des vaisseaux tumoraux entraînant une augmentation de leur perméabilité (Valastyan e Weinberg, 2011) (Le Guelte *et al.*, 2011).

Une fois dans la circulation sanguine, ces cellules sont appelées cellules tumorales circulantes (CTC) (Grillet *et al.*, 2016).

Au contraire de l'intravasation, qui serait facilité par des vaisseaux tumoraux mal conformés, les vaisseaux des organes sains sont normaux et fonctionnels, donc avec une perméabilité moindre. En fonction des organes, il semblerait que l'extravasation puisse être simplifiée par

la structure particulière de leurs capillaires qui les rendrait plus perméables; c'est le cas notamment au niveau des os et du foie (Nguyen *et al.*, 2009).

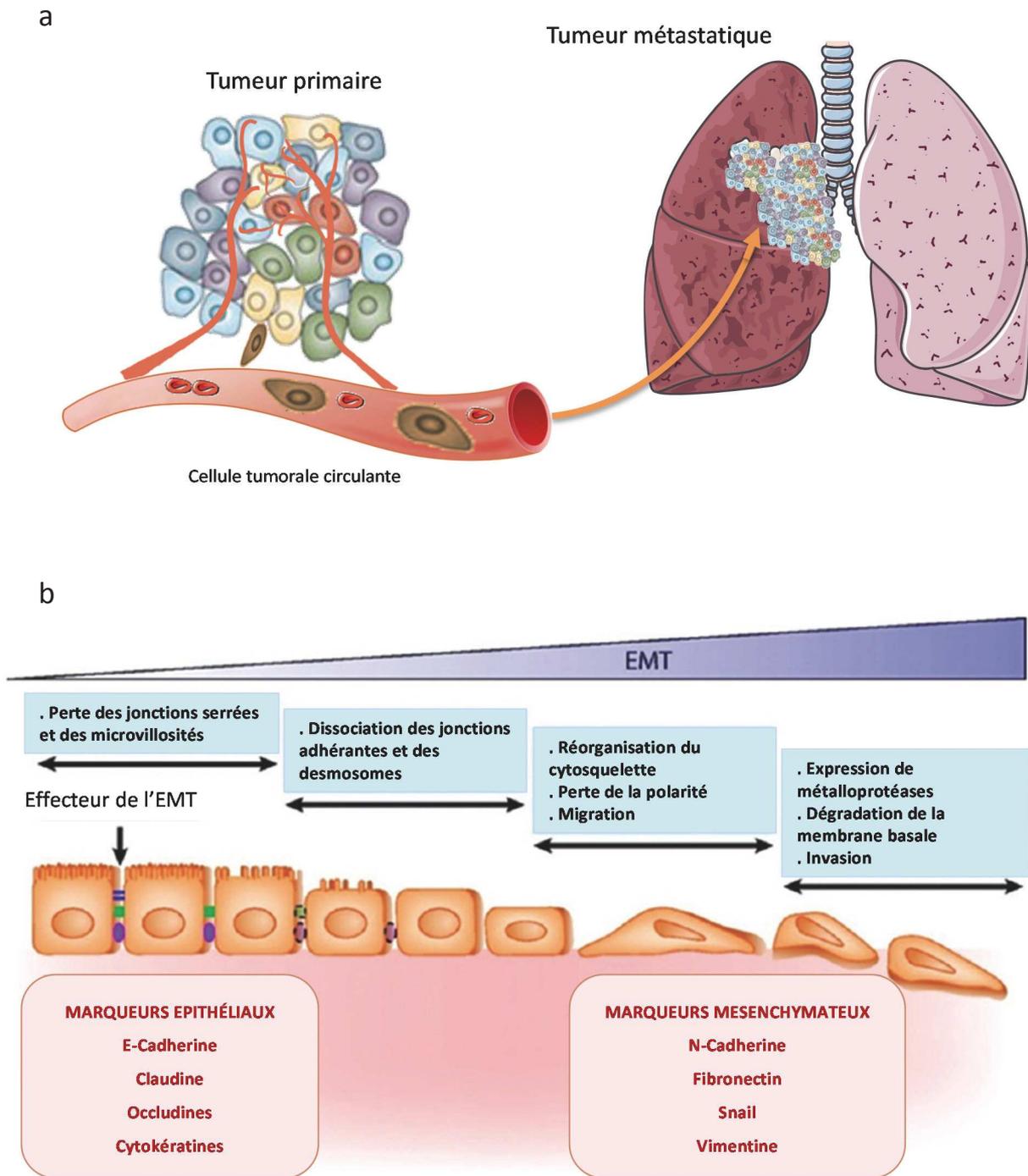


Figure 28 : Les processus métastatiques sont soutenus par la transition épithélio-mésenchymateuse. (a) Lors des processus métastatiques, les cellules vont quitter la tumeur primaire et entrer dans la circulation sanguine par extravasation, puis elles vont en sortir par un phénomène d'intravasation, pour enfin proliférer au niveau du site distant. **(b)** Ce processus est permis grâce à l'EMT qui par l'induction d'un programme moléculaire particulier permet l'invasion et la migration des cellules.

b) Modifié de Angadi 2015

4.7. Implication des CSC dans la résistance aux traitements et dans la récurrence

4.7.1. Le traitement du cancer colorectal

Les traitements du CCR sont dépendants de la localisation et du stade de découverte du cancer. En fonction du degré d'avancement, on définit quatre stades :

- stade 0 : la tumeur est de petite taille et non menaçante, elle n'a pas évolué au-delà de la muqueuse ;
- stade I : la tumeur a envahi les couches de tissu du côlon ou du rectum, mais elle n'a pas atteint les tissus avoisinants ;
- stade II : la tumeur a traversé la paroi et a envahi les organes avoisinants sans toucher aux ganglions lymphatiques ;
- stade III : cancers qui ont atteint un ou plusieurs ganglions proches du côlon ou du rectum mais sans atteindre les organes éloignés ;
- stade IV : cancers qui présentent des métastases, c'est-à-dire que la tumeur s'est propagée à des endroits éloignés, le plus souvent dans le foie, les poumons ou les ovaires.

Dans le cas des cancers du côlon non métastatiques, le traitement de référence est la résection colique avec curage ganglionnaire. Pour les stades III, la chimiothérapie y est associée. Pour les formes métastatiques (stade IV), la possibilité de résection métastatique dépend de la taille et de la localisation des tumeurs. Les chimiothérapies adjuvantes et/ou néo-adjuvantes sont recommandées.

Dans le cas du cancer du rectum, la radiothérapie néo-adjuvante peut être recommandée pour les stades II et III. Une radio-chimiothérapie peut être recommandée en préopératoire pour les stades II et III et peut être discutée en adjuvant en fonction de la qualité de l'exérèse réalisée. La chirurgie est généralement plus lourde de conséquences pour le patient que dans le cancer du côlon.

4.7.2. Les mécanismes de résistance

La résistance aux traitements par chimiothérapies est un phénomène retrouvé chez de nombreux patients et elle est la cause principale de récurrence. Les schémas de traitements classiques se basent sur le modèle stochastique de résistance acquise. Ce modèle postule que la majorité des cellules tumorales est sensible aux traitements classiques et qu'une population peut acquérir ou possède déjà une résistance par mutation génétique ou modification épigénétique (Komarova, 2006). Ce clone devient majoritaire lors de la récurrence et la tumeur insensible à la thérapie précédemment utilisée. Le modèle de CSC postule que cette sous population de cellules possède déjà les mécanismes de résistance aux traitements classiques et/ou aux thérapies ciblées ou que ces mécanismes sont exacerbés dans cette population cellulaire (Dean *et al.*, 2005).

Différents mécanismes mis en jeu vont permettre au CSC de résister aux traitements.

On peut citer l'implication des transporteurs actifs de la famille ABC, tels que la glycoprotéine P (Pgp) codée par le gène MDR1 ou le transporteur ABCG2, appelé également BCRP, *Breast cancer Resistance protein*, qui sont fortement surexprimés dans les CSC. Il semblerait que le *pregnane X receptor* (PXR), dont l'expression et l'activité dans le cadre du CCR sont limitées aux CSC, joue un rôle primordial en induisant l'expression de ces transporteurs (Planque *et al.*, 2016). C'est par leur implication dans l'efflux des drogues que ces transporteurs confèrent aux CSC leur capacité de résistance aux traitements.

L'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques est également fréquemment dérégulée dans les CSC. Elle implique une augmentation du métabolisme et une inactivation du composé, ou une diminution du métabolisme empêchant la synthèse d'un métabolite actif. Les enzymes du cytochrome P450 peuvent être surexprimées, c'est le cas par exemple de l'enzyme CYP3A4 (Olszewski *et al.*, 2011), dont l'expression est également contrôlée par PXR (Planque *et al.*, 2016).

En réponse aux drogues, des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN sont mis en place pour préserver les cellules de l'apoptose et parallèlement, une altération des mécanismes de l'apoptose est retrouvée dans de nombreux cancers. C'est le cas

notamment des gènes codant pour les facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-XL qui sont fortement exprimés dans les cancers colorectaux et impliqués dans la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. A l'inverse, la protéine p53, qui est un acteur majeur de l'entrée en apoptose en cas de dérégulation du cycle ou de dommage à l'ADN, est mutée dans 30 à 35% des CCR et cette inactivation est associée à la résistance aux traitements de chimiothérapie.

Un dernier mécanisme ferait intervenir l'hypoxie, fréquemment retrouvée au centre des tumeurs, qui serait impliquée à la fois dans la radiorésistance et dans la chimiorésistance (Lieberman et Rich, 2010; Doktorova *et al.*, 2015).

L'implication des cellules souches cancéreuses dans l'initiation tumorale, la dissémination, la résistance aux traitements et la récurrence révèle leur extraordinaire capacité d'adaptation. Celle-ci implique des modifications rapides dans l'expression des gènes pouvant trouver leur origine dans des modifications du contrôle traductionnel. A ce jour aucun lien entre régulation traductionnelle et CSC n'a encore été établi.

La compréhension des mécanismes sous-tendant cette plasticité est un prérequis au développement de nouvelles thérapies.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE & OBJECTIFS DE LA THESE

Les projets de recherche développés dans le laboratoire concernent l'étude des mécanismes impliqués dans certaines étapes clés de la tumorigénèse colique, telles que la dissémination et la chimiorésistance avec une attention particulière concernant l'implication des cellules souches cancéreuses (CSC) dans ces processus.

Compte-tenu des données bibliographiques présentées en introduction, nous nous sommes interrogés sur l'implication de la régulation traductionnelle dans l'évolution du cancer colorectal. En effet, la synthèse protéique joue un rôle majeur dans la carcinogenèse : d'une part, une synthèse protéique élevée est nécessaire à la prolifération des cellules tumorales et d'autre part, l'expression spécifique de protéines pro-oncogéniques est favorisée par une traduction sélective.

En se focalisant particulièrement sur l'acquisition ou la perte des propriétés propres aux CSC, mon projet vise à déterminer de quelle manière le contrôle traductionnel participe au phénotype tumoral dans le contexte du cancer du côlon.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai abordé cette problématique autour de trois axes principaux : 1) Le développement d'une nouvelle stratégie d'isolement des cellules souches cancéreuses basée sur l'activité traductionnelle, 2) L'étude de la régulation traductionnelle au sein des cellules souches du cancer colorectal, 3) L'identification et la caractérisation de protéines ribosomiques impliquées dans les étapes clés de la carcinogenèse colorectale.

Au début de ma 1^{ère} année de thèse, je me suis consacrée à la finalisation des travaux entrepris dans le cadre de mon projet de stage de Master 2. Grâce à cette étude, nous avons démontré que la protéine kinase $C\alpha$ (PKC α) contrôle l'activité de TRM6/61, méthyltransférase d'ARN de transfert, afin de prévenir des dérégulations traductionnelles qui favoriseraient le développement tumoral (Macari *et al.*, 2016).

Par la suite, je me suis consacrée au développement d'une nouvelle stratégie d'isolement des CSC basée sur une activité traductionnelle différentielle. Nous avons émis l'hypothèse que chaque sous-population de cellules composant la tumeur présentait une activité traductionnelle distincte. Ainsi, sachant que les CSC, en tant que « cellules souches », présentent un cycle cellulaire lent, nous espérions être en mesure de les isoler en sélectionnant les cellules tumorales de faible activité traductionnelle.

La méthodologie était la suivante : réaliser un marquage permettant d'évaluer l'activité traductionnelle et trier par cytométrie en flux les sous-populations de cellules isolées selon

ce critère. Les différentes populations étaient ensuite caractérisées afin de vérifier qu'elles présentaient les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles propres aux CSC.

Pour mener à bien ce projet, j'ai développé et optimisé au sein du laboratoire la méthode SUnSET, permettant de visualiser l'activité traductionnelle dans une population hétérogène de cellules tumorales. Malgré les nombreux marquages et tris cellulaires effectués, ce projet n'a pas donné les résultats escomptés et j'ai dû l'abandonner.

Cependant, c'est au début de ce projet que j'ai découvert par sérendipité le rôle inhibiteur de certains antibiotiques sur l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses (Relier, Yazdani *et al.*, Cancer Cell Int, 2016). Les études permettant l'identification des mécanismes sous-jacents sont en cours et ce projet pourrait à terme déboucher sur des applications thérapeutiques prometteuses.

Ensuite, je me suis consacrée au 2^{ème} axe de mon projet de thèse, à savoir l'étude de la régulation traductionnelle au sein des cellules souches cancéreuses. L'objectif était de comparer les ARNm transcrits et les ARNm traduits dans des échantillons enrichis en CSC/progénitrices ou en cellules tumorales plus différenciées.

Nous avons pour cela développé au sein du laboratoire la méthode de *ribosome profiling*, méthode utilisée par très peu de laboratoires à travers le monde. En me basant sur l'activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH), reconnue comme un marqueur des CSC dans le cancer colorectal, j'ai trié par cytométrie en flux 10% de la population de cellules ALDH^{low}, correspondant aux cellules tumorales les plus différenciées et 10% de la population de cellules ALDH^{bright}, correspondant aux cellules souches/progénitrices. Plus de vingt tris cellulaires ont été nécessaires afin d'obtenir suffisamment de matériel pour réaliser une analyse transcriptomique et un *ribosome profiling*; malheureusement une partie des échantillons s'est dégradée durant la procédure. Nous avons donc soulevé plusieurs problèmes concernant la méthodologie employée et ceci nous a amené à nous concentrer sur l'optimisation de la méthode de ribosome profiling afin de l'adapter à l'étude d'un nombre restreint de cellules, correspondant à une population rare, telles que les CSC.

Nous n'avons pour l'instant pas été en mesure de comparer la régulation traductionnelle au sein des CSC, mais une partie des échantillons produits à partir de ces tris ont tout de même permis la réalisation d'un transcriptome et d'un méthylome. Le transcriptome comparatif entre la population ALDH^{bright} et ALDH^{low} a permis de mettre en évidence une expression différentielle de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ces analyses constituent des résultats préliminaires nécessaires pour un autre projet développé dans le laboratoire, et un traductome sera réalisé sous peu.

Durant la suite de ma thèse, je me suis consacrée à l'identification et la caractérisation de protéines ribosomiques pouvant être impliquées dans certaines étapes clés de la tumorigénèse colorectale.

Grâce à une collaboration avec une des équipes phares du domaine (Laboratoire du Dr Qian, Cornell University) nous avons à notre disposition une banque d'ARN interférents (sh-RNA) dirigés contre les 80 protéines ribosomiques. En me basant sur un crible préliminaire et sur les quelques données de la littérature je me suis focalisée sur deux protéines appartenant à la grande sous-unité ribosomique: RPL13 et RPL22.

Dans la partie suivante, je présente uniquement certains des résultats obtenus au cours de ma thèse ; ceux-ci seront divisés en trois parties :

- **Les antibiotiques inhibent la formation de sphères en culture en suspension**
- **Le rôle de RPL22 dans certaines étapes du cancer colorectal**
- **Le rôle de RPL13 dans certaines étapes du cancer colorectal**

RESULTATS

PARTIE I. L'utilisation de certains antibiotiques inhibe la formation de sphères en culture.

Introduction

TITRE : “*Antibiotics inhibit sphere-forming ability in suspension culture*”

Sébastien Relier*, **Laura Yazdani***, Oualid Ayad*, Armelle Choquet, Jean-François Bourgaux, Michel Prudhomme, Julie Pannequin, Françoise Macari and Alexandre David.
Cancer Cell International, 2016

* Sébastien Relier, Laura Yazdani et Oualid Ayad sont co-premier auteurs

Malgré les progrès significatifs réalisés au cours de ces dernières années dans le diagnostic et le traitement du cancer colorectal (CCR), ce dernier représente une cause majeure de mortalité à travers le monde (Jemal *et al.*, 2011). Ce fort taux de mortalité est lié à l'apparition de métastases (40 à 50 % des patients) ; faisant chuter les taux de survie à 5 ans de 90% à seulement 10% (Haggar e Boushey, 2009). Ces éléments convergent vers la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires accompagnant les processus métastatiques, ainsi que la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées. Ce besoin a conduit au développement de systèmes de culture en suspension, tel que les « tests de formation de sphères », permettant de refléter l'initiation et l'hétérogénéité tumorale *in vivo*. La croissance des micro-tumeurs de type sphéroïde en culture non-adhérente et sans sérum (Schmeichel e Bissell, 2003) nécessite l'acquisition d'un phénotype de cellules souches cancéreuses caractérisé par l'autorenouveaulement, la multipotence, la chimiorésistance et des propriétés métastatiques (Vermeulen *et al.*, 2008). Dans le cas du CCR, ce modèle de culture cellulaire est souvent utilisé dans le but d'évaluer le potentiel tumorigène (Weiswald *et al.*, 2009).

Les antibiotiques sont souvent utilisés dans la culture cellulaire pour prévenir la contamination par des organismes microbiologiques ; cependant cette pratique reste controversée. En effet, l'utilisation courante d'antibiotiques peut favoriser le développement

de souches résistantes et de contaminants tels que les mycoplasmes ou les virus. Le cocktail de pénicilline et de streptomycine (P/S) est recommandé par l'*American Type Culture Collection* (ATCC), mais ce centre de bio-ressources préconise également d'éviter l'utilisation d'antibiotiques dans la culture cellulaire de routine et prévient de son utilisation au long terme. Bien que l'on puisse s'affranchir de l'utilisation de la combinaison antimicrobienne (P/S) dans la culture régulière, celle-ci devient une condition préalable pour établir une lignée cellulaire à partir de biopsies colorectales, ces dernières étant fortement contaminées par des microorganismes. L'effet du cocktail (P/S) dans les cultures en trois dimensions (3D) de cellules cancéreuses n'a jamais été étudié malgré le fait que plusieurs auteurs aient exprimé des inquiétudes concernant l'utilisation des antibiotiques, plus particulièrement dans les conditions de culture sans sérum (Laurent *et al.*, 1990; Fukuda *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1995; Mingeot-Leclercq e Tulkens, 1999; Schacht, 1999; El Mouedden *et al.*, 2000; Hendrix *et al.*, 2001; Keeling e Bedwell, 2002; Cohen *et al.*, 2006)

Afin d'améliorer les conditions de culture en suspension, favorisant la survie et la croissance de cellules souches cancéreuses, nous avons testé l'impact des antibiotiques dans la culture en suspension. Nos résultats indiquent que l'addition de (P/S) déclenche une diminution de la formation des sphères dans six lignées de cellules cancéreuses obtenues à partir de trois origines tissulaires distinctes. Cet effet est proportionnel à la concentration de (P/S) utilisée et corrèle avec la réduction de la population de cellules souches cancéreuses.

Publication

Relier et al. *Cancer Cell Int* (2016) 16:6
DOI 10.1186/s12935-016-0277-6

Cancer Cell International

PRIMARY RESEARCH

Open Access



Antibiotics inhibit sphere-forming ability in suspension culture

Sébastien Relier^{1,2,3†}, Laura Yazdani^{1,2,3†}, Oualid Ayad^{1,2,3†}, Armelle Choquet^{1,2,3}, Jean-François Bourgaux⁴, Michel Prudhomme⁵, Julie Pannequin^{1,2,3}, Françoise Macari^{1,2,3*††} and Alexandre David^{1,2,3*††}**Abstract**

Background: This last decade, a lot of emphasis has been placed on developing new cancer cell culture models, closer to in vivo condition, in order to test new drugs and therapies. In the case of colorectal cancer, the use of patient biopsies to seed 3D primary cultures and mimic tumor initiation necessitates the use of antibiotics to prevent microbial intestinal contamination. However, not only long term use of antibiotics may mask the presence of low levels of microbial contamination, it may also impact cancer cell phenotype.

Methods: In this study we tested the impact of penicillin-streptomycin cocktail addition in both monolayer and suspension culture. To ensure the reliability of our observations we used six different cell lines and each experiment was performed in triplicate. Results were analyzed with Student's t test.

Results: We show that penicillin-streptomycin cocktail inhibits the sphere-forming ability of six cancer cell lines in suspension culture though it has no impact in monolayer culture. We correlate this effect with a significant decrease of cancer stem cells pool which holds self-renewal potential.

Conclusions: Overall, this study warns against systematic addition of antibiotics in growth medium and raises the interesting possibility of using antibiotics to target cancer stem cells.

Keywords: Antibiotics, Sphere-forming ability, Suspension culture, Cancer stem cells

Background

Despite significant advances in diagnostics and therapeutic treatment, colorectal cancer (CRC) remains a major cause of mortality worldwide [1]. This is due to the fact that CRC survival is highly dependent upon stage of disease at diagnosis: though early stage show 70–90 % 5-year survival, once the tumor spreads out to distant organs, 5-year survival plummets toward 10 % [2]. Therefore, there is a real need for a better understanding of molecular and cellular events triggering metastatic process and the conception of new, adapted, therapeutic strategies. This need led to the development of suspension culture systems, such as tumorsphere formation assay, mirroring

in vivo tumor initiation and heterogeneity. The growth of microtumor-like spheroids in non-adherent culture and serum free conditions [3] necessitates the acquisition of “cancer stem cell phenotype” which lends self-renewal, multipotency, chemoresistance, and metastatic properties [4]. In the case of CRC, this cell culture model is often used as a surrogate to evaluate tumorigenic potential [5].

Antibiotics are often used in cell culture in order to prevent contamination with microbiological organism. However, this practice remains controversial since the routine use of antibiotics may favor the development of resistant strains and cryptogenic contaminants such as mycoplasmae or viruses. Penicillin-streptomycin (P/S) cocktail is the only one “recommended” by American Type Culture Collection (ATCC), though this biore-source center avoids using any antibiotic for routine cell culture and warns again long-term usage of it. While the use of this antimicrobial combination in regular culture

*Correspondence: fmacari@igf.cnrs.fr; adavid@igf.cnrs.fr

†Sébastien Relier, Laura Yazdani and Oualid Ayad are co-first authors

††Françoise Macari and Alexandre David are co-last authors

¹ CNRS, UMR-5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, 34094 Montpellier, France

Full list of author information is available at the end of the article

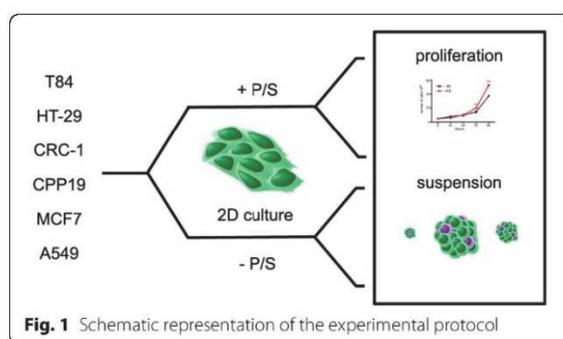


© 2016 Relier et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

condition is dispensable, it becomes a prerequisite when trying to establish cell line from colorectal tumor biopsies, heavily contaminated with microorganisms. The effect of P/S addition in three-dimensional (3D) cultures of cancer cells has never been addressed while several publications have raised concerns regarding the use of antibiotics, especially in serum-free conditions [6–15]. In order to improve sphere culture conditions—that favors cancer stem cell survival and growth—we tested the impact of antibiotics on suspension culture. We show that P/S addition triggers a striking decrease of sphere formation in six cancer cell lines from three distinct tissue origins. The magnitude of this effect is proportional to P/S concentration and correlates with reduced cancer stem cell population.

Results

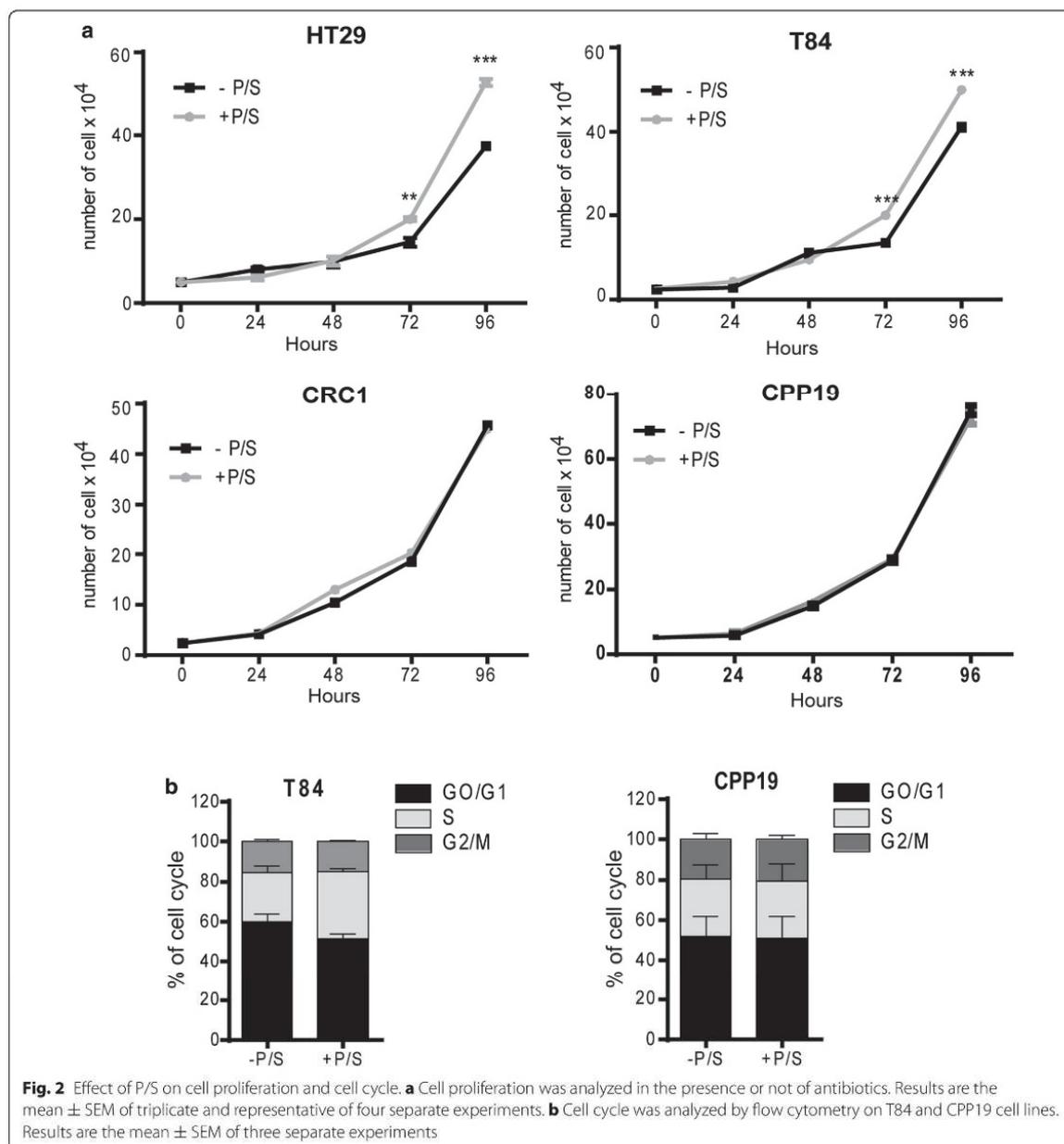
In order to establish a broad picture of P/S effects on CRC cell growth, we chose four different cell lines: HT29, a colon adenocarcinoma grade II cell line; T84, a cell line derived from a lung metastasis of a colon carcinoma; CRC-1, a cell line derived in our lab from freshly isolated colorectal adenocarcinoma, CPP19, another cell line derived in our lab from hepatic metastasis of a CRC patient. Each of these cell lines was grown in monolayer culture for 2 weeks minimum, in the presence or absence of antibiotics, before being tested (Fig. 1). First, we tested the impact of P/S on cell growth in classical adherent conditions. Cell number was counted, in the presence or absence of antibiotics on a daily basis for 4 days (Fig. 2a). P/S slightly increased cell proliferation in HT29 and T84 cells, but had no effect in CRC-1 and CPP19 cells, underlining a subtle but noteworthy differential effect according to tumor cell origin. Accordingly, P/S addition did not impact cell cycle (Fig. 2b). Then, we tested the effect of antibiotic addition on cell suspension culture. Unlike monolayer condition, suspension culture favors the growth of tumor cells that possess sphere forming ability in serum-free medium at low cell density.



Remarkably, suspension culture was severely impacted by P/S addition that triggered about fivefold decrease in sphere formation (Fig. 3a). This effect did not depend on the nature of cell lines and patient stage since the four cell lines tested were sensitive to a similar extent. Furthermore, inhibition of sphere forming ability correlates nicely with increasing concentrations of P/S and illustrates a typical dose-response relationship (Fig. 3b). In order to test whether this observation could be extended to other cancer types, we tested two other cell lines: A549, a lung epithelial carcinoma, and MCF7, a cell line derived from a pleural metastasis of breast adenocarcinoma. As expected, while P/S addition did not impact cell proliferation in monolayer culture (Fig. 4a), it triggered a significant inhibition of sphere forming efficiency in both MCF7 and A549 cell lines (Fig. 4b). In both T84 and CPP19 cells, decreased sphere forming potential in the presence of P/S correlated with elevated cell apoptosis (Fig. 5a). Depending upon the cellular context, cell cycle disturbance may trigger apoptosis [16]. However P/S addition did not seem to impact cell cycle, as shown by propidium iodide staining (Fig. 5b). This last observation—combined with the fact that antibiotics do not affect cell proliferation in monolayer culture—led us to think that P/S may not have a broad effect, but instead a selective one, impacting specific cell sub-population(s). Spheres forming ability in suspension culture is a proxy for *in vivo* tumorigenesis and relies on tumor initiating cells (TIC) proportion in the cell line. TIC, also called “cancer stem cells”, drive tumorigenic process through their self-renewal ability and their “plasticity” that permits to give rise to all cell types found in a particular tumor sample [17]. Though there is no ideal membrane marker for TIC, a growing number of studies have shown that high aldehyde dehydrogenase (ALDH) enzyme activity is associated with enhanced self-renewal capacity and *in vivo* tumorigenicity [18], both hallmarks of TIC. In T84 and CPP19 cells cultured in suspension condition, P/S addition triggered a significant decrease of ALDH positive cells (Fig. 5c) which is consistent with reduced sphere number (Fig. 3a). Therefore, P/S effect on cell suspension culture could well arise from specific impairment of self-renewal ability which is indispensable for TIC survival.

Discussion

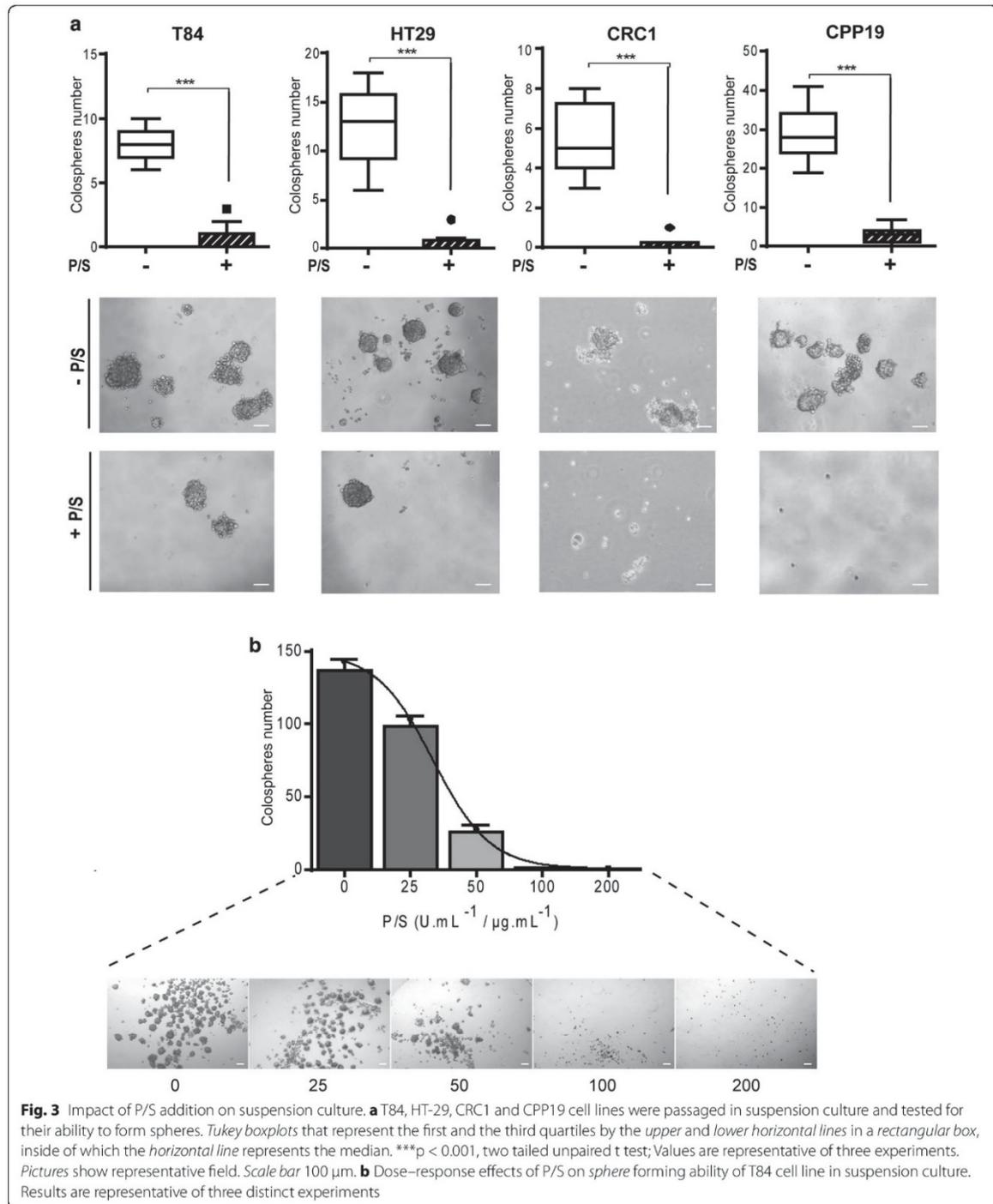
The goal of this study was to evaluate the impact of P/S addition on 3D culture of cancer cell lines. We focused our attention on commonly used combination of penicillin and streptomycin. By opposition with previous studies [19], P/S addition did not impact cell proliferation in regular growth condition for any of the cell lines tested. However, this study revealed a severe decrease of sphere

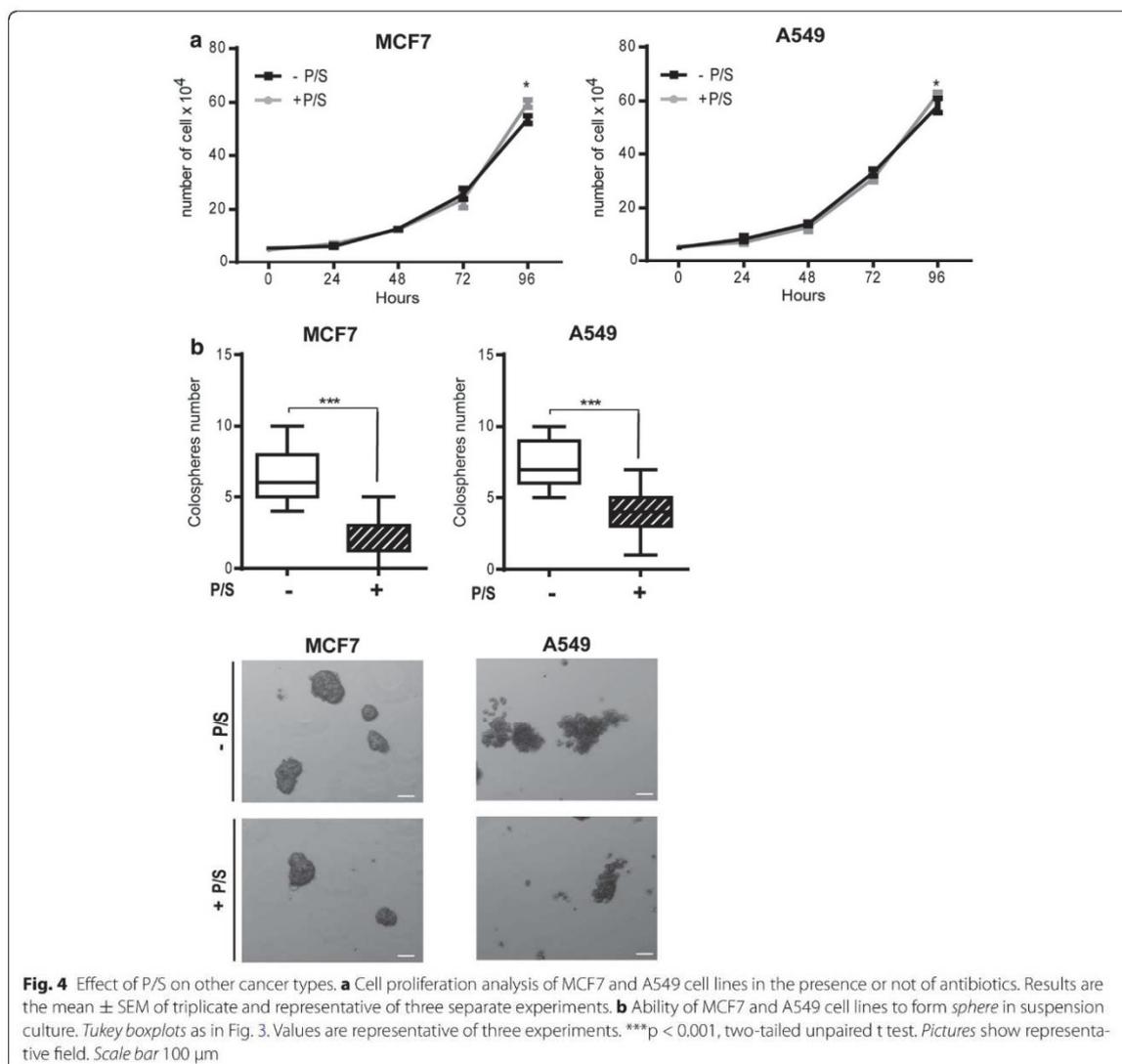


number following P/S addition. As suggested by ALDH labeling experiments, this effect might result from a specific decrease of TIC population which nucleates sphere formation. We speculate that the loss of TIC phenotype triggers cell apoptosis, perhaps through resensitization to anoikis [20]. Altogether, this study warns against systematic addition of antibiotics in growth medium, especially

in suspension culture where their usage is counter-productive and prone to artifacts.

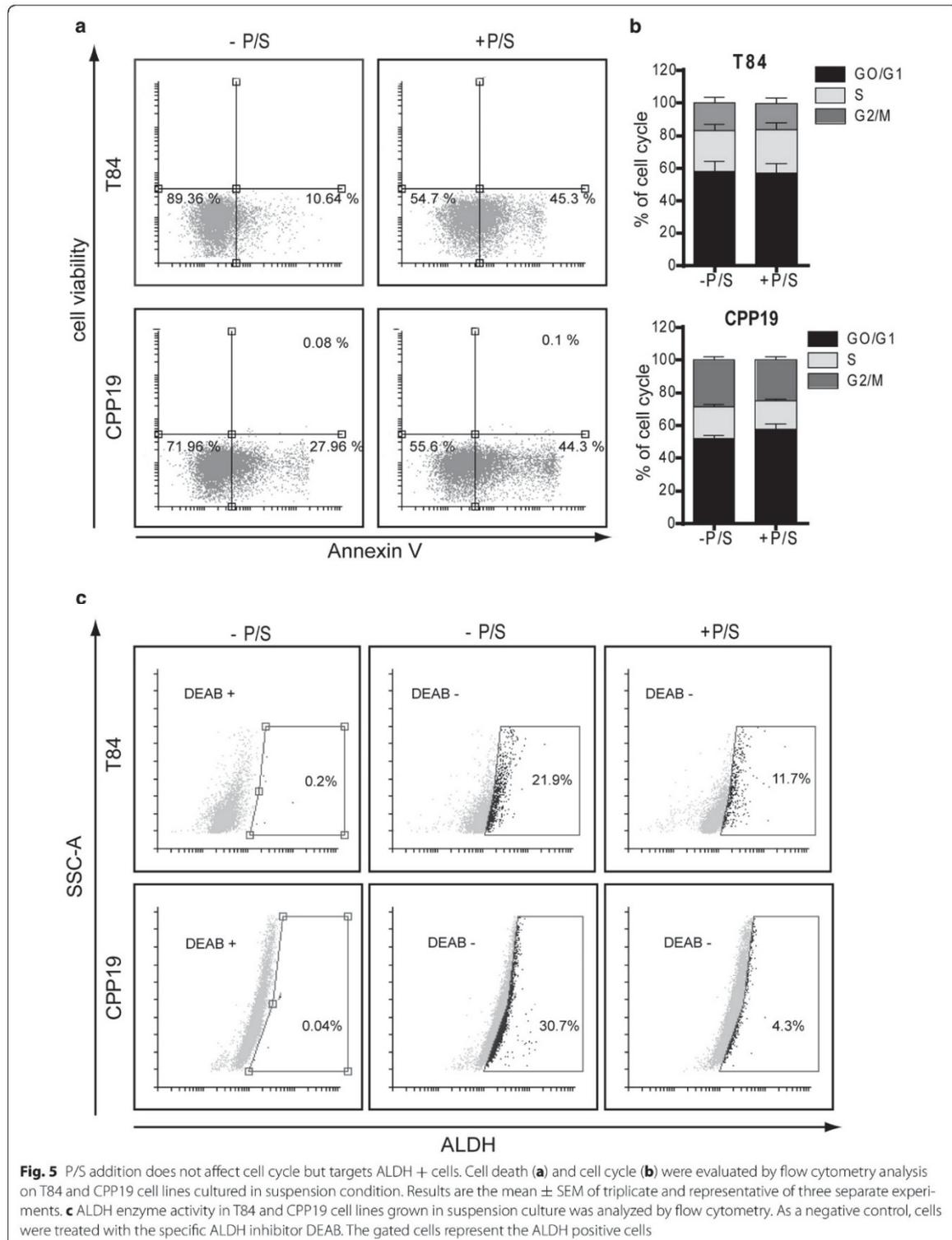
Preventing contamination is a constant challenge in cell culture that needs to be addressed with caution. Sole reliance on antibiotics leads to poor aseptic techniques, increased mycoplasma contamination, increased antibiotic resistance among contaminants, and—as





exemplified in this study—experimental bias. Therefore, what other alternative to P/S addition might there be to prevent growth medium contamination? From a practical standpoint, most general cell culture can be usually done in the absence of antibiotics, though it requires a basic culture management, tailored to meet the specific needs of the laboratory's working conditions. Achieving and maintaining good aseptic technique is key, especially when working with valuable cultures. Nevertheless, under some circumstances—such as cell isolation of human biopsy—a decontamination procedure cannot be avoided. In any event, antibiotics should only be used

as a last resort for short term applications, and they should be removed from the culture as soon as possible. Finally, we recommend caution in using antibiotics from aminoglycoside family (e.g., streptomycin, gentamycin, kanamycin) whose intrinsic RNA-binding properties may impact gene expression and cell properties. Halving the concentration of antibiotics is an acceptable possibility to consider: as shown in this study, the recommended working concentration of streptomycin ranges from 30 to 100 μ g/mL which translates into significant differences in term of sphere forming ability (Fig. 3b).



From a functional perspective, we envision three possibilities in which streptomycin plays a pivotal role by associating with RNA structure(s).

First, while streptomycin specifically targets 30S prokaryotic ribosomal subunit, it can also associate with eukaryotic ribosomes when certain structural conditions are met [21–23]. By analyzing polysome profile from monolayers cultures of T84 cells, we did not observe any quantitative effect on global protein synthesis following P/S addition (Fig. 6). However, it does not discard the possibility of a subtle and “qualitative” change, which may impact a minor population of streptomycin-sensitive ribosomes.

Second, streptomycin could affect mitochondrial translation and most particularly that of TIC. This view is in line with a recent report suggesting that antibiotics targeting prokaryotic ribosome specifically impact mitochondrial activity in cancer stem cells and trigger cell death [24]. Nevertheless, it does not explain why mitochondrial activity is not impacted in monolayer culture, where high proliferation necessitates elevated protein synthesis rate, one of the most energy consuming processes in the cell.

Finally, streptomycin could associate with certain RNA hairpin loops and interfere with RNA processing/function. Indeed, while aminoglycosides are mainly used as therapeutic agents to target bacteria, they can bind in a non-selective manner to a variety of RNA that possess characteristic stem-loop structures, such as viral or non-coding RNA [25, 26]. A recent study raises the interesting possibility that aminoglycosides could bind to

oncogenic miRNA precursors—that possess stem-loop structure—and inhibit their processing into fully functional miRNA [27]. This hypothesis is plausible given the complexity of cancer cell [28] and the great importance of miRNA networks in the regulation of TIC properties [20, 29].

Conclusions

Overall, this study warns against routine usage of antibiotics whose “off-target” effects—hitherto poorly understood—may bias experimental results. While the precise mechanism by which P/S inhibits sphere-forming ability remains to be elucidated, it moots the exciting possibility of using antibiotics as tools for anti-TIC therapies. This idea is particularly attractive when considering that many antibiotics are already FDA approved.

Methods

Cells and ethics statement

Patient-derived cell culture of colon cancer cells (CRC-1 and CPP19) were obtained from CRC biopsies provided by CHU-Caréméau (Nîmes, France) within an approved protocol (ethical agreement no 2011-A01141-40). Signed informed consents were obtained from patients prior to samples acquisition in accordance with all ethical and legal aspects. The «Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé» (ANSM) reviewed and approved this study.

Tumors were washed, minced into fragments (<2 mm³), digested with 0.26 U/ml of liberase H (Roche), and resuspended in Accumax (Sigma-Aldrich). Following 2 h at 37 °C, cell suspension was filtered through a 40 mm mesh and plated in DMEM medium (Invitrogen), supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS), glutamine, antibiotics (P/S) and non-essential aminoacids. When a monolayer of patient-derived tumour cells was formed, cells were detached using trypsin/EDTA and resuspended in DMEM with 10 % FCS.

T84 and HT-29 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC).

Cell culture and cell proliferation

T84, HT-29, CRC-1, CPP19, A549 and MCF7 cell lines were cultured at 37 °C under humidified 5 % CO₂ in DMEM medium (Invitrogen) or RPMI (Invitrogen, for MCF7 and A549) supplemented with 10 % fetal calf serum (Invitrogen), 2 mM glutamine, with or without antibiotics: 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin (Invitrogen). For cell proliferation analyses, 5 × 10⁵ cells were cultured in triplicate in a 12 well plate for 24, 48, 72 or 96 h. Cells were then resuspended in DMEM with 10 % FCS, after Trypsine—EDTA treatment, for counting.

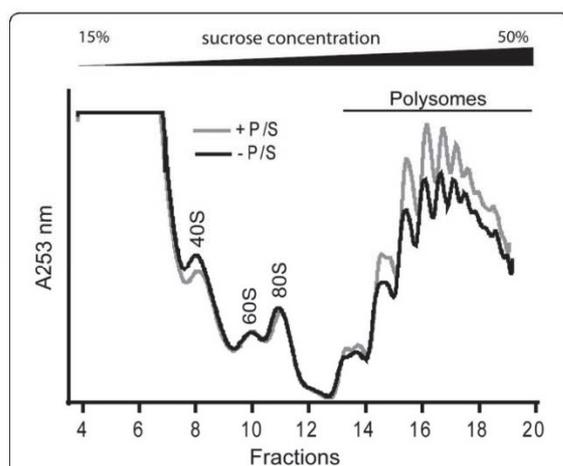


Fig. 6 Polysome profiles from T84 monolayers grown with or without P/S. Briefly, cell lysates were fractionated on 15–50 % sucrose gradient to isolate polysomes. Absorbance profile was continuously measured at 254 nm

Sphere formation assays

Number of Cell Forming Sphere were determined after plating of 1000 cells/ml M11 medium (DMEM/F12 (1:1) Glutamax medium, N2 Supplement, Glucose 0.3 %, insulin 20 µg/ml, hBasic-FGF 10 ng/ml, hEGF 20 ng/ml), with or without antibiotics (Penicillin G 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml) in ultra-low attachment p24-well plates (11 wells/condition) (Corning). Spheres >50 µm diameter were counted after 6 days.

Polysome profiling

Cells (4×10^6) were treated with 20 µg/ml emetine for 15 min at 37 °C, washed twice with ice-cold PBS/CHX, and scraped. Cells were homogenized by hard shaking with 1.4 mm ceramix spheres (Lysing matrix D MPbio) in FastPrep machine, loaded on 15–50 % sucrose gradient and polysome were fractionated [30]. Fractions were collected with an ISCO (Lincoln, NE) density gradient fractionation system. The settings were as follows: pump speed 0.7 ml/min, fraction time 1 min/fraction, chart speed 150 cm/h and sensitivity of OD254 recorder to 1. The absorbance at 254 nm was measured continuously as a function of gradient depth.

Cell cycle

Cell pellets (5×10^5 cells) were incubated 1 h on ice before staining overnight at 4 °C with 500 µl of propidium iodide solution (25 µg/ml of propidium iodide, 0.1 % of Triton X100 and 0.1 % of Trisodium citrate dihydrate in water). Analysis was performed by flow cytometry (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec).

Apoptose analysis

Cells (5×10^5) were stained with 125 ng of annexin V-FluoProbes 488 (Interchim) and 7-AAD (1 µg/ml) or Sytox blue (0.1 µg/ml). Cells were incubated for 15 min at RT and analyzed by flow cytometry (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec).

ALDEFLUOR assay

The ALDH enzymatic activity of the cells was measured using the ALDEFLUOR kit (Stem Cell Technologies), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^5 cells were suspended in ALDEFLUOR assay buffer containing ALDH substrate and incubated for 30 min at 37 °C. As a reference control, cells were stained under identical conditions with the specific ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde (DEAB). The brightly fluorescent ALDH-expressing cells were detected using a MACSQuant Analyzer, (Miltenyi Biotec). To exclude nonviable cells, Sytox blue was added at a concentration of 0.1 µg/ml.

Abbreviations

ALDH: Aldehyde dehydrogenase; ATCC: American type culture collection; CRC: Colorectal cancer; FDA: Food and drug administration; P/S: Penicillin-streptomycin; 3D: Three-dimensional; TIC: Tumor initiating cells.

Authors' contributions

LY made the original observation and initiated the study. AD, FM and AC conceived and designed experiments. SR, OA, AC performed most of cell culture experiments. FM performed flow cytometry experiments. JFB and MP surgically removed and provided patient biopsies in order to establish CRC cell lines. AD and FM analyzed data and drafted the manuscript. AC and JP revised it critically before submission. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, 34094 Montpellier, France. ² INSERM, U1191, 34094 Montpellier, France. ³ Université de Montpellier, 34094 Montpellier, France. ⁴ Service d'Hépatogastroentérologie, CHU Carêmeau, Nîmes, France. ⁵ Service de Chirurgie Digestive, CHU Carêmeau, Nîmes, France.

Acknowledgements

This work was generously supported by the Cancéropôle GSO, the SIRIC Montpellier Cancer and the Ligue contre le Cancer. Authors would like to thank Philippe Crespy for technical help.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 13 November 2015 Accepted: 3 February 2016

Published online: 12 February 2016

References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.
- Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;22(4):191–7.
- Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 12):2377–88.
- Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(36):13427–32.
- Weiswald LB, Richon S, Validire P, Briffod M, Lai-Kuen R, Cordeliers FP, Bertrand F, Dargere D, Massonnet G, Marangoni E, et al. Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. *Br J Cancer*. 2009;101(3):473–82.
- Cohen S, Samadikuchaksaraei A, Polak JM, Bishop AE. Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures. *Tissue Eng*. 2006;12(7):2025–30.
- Keeling KM, Bedwell DM. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(6):367–76.
- Hendrix DV, Ward DA, Barnhill MA. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. *Am J Vet Res*. 2001;62(10):1664–9.
- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):665–75.
- Schacht J. Biochemistry and pharmacology of aminoglycoside-induced hearing loss. *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y [de] la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia*. 1999;49(4):251–6.

11. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1003–12.
12. Yang CL, Du XH, Han YX. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail*. 1995;17(1):21–6.
13. Whittam T, Schnellmann RG, Ferguson DC. Poly-L-aspartic acid does but triiodothyronine does not protect against gentamicin-induced cytotoxicity in the porcine kidney cell line LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;262(2):834–40.
14. Fukuda Y, Malmberg AS, Aperia A. Gentamicin inhibition of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase in rat kidney cells. *Acta Physiol Scand*. 1991;141(1):27–34.
15. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1990;40(11):2383–92.
16. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2(4):291–9.
17. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275–91.
18. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*. 2011;10(9):1378–84.
19. Freedman VH, Shin SI. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*. 1974;3(4):355–9.
20. Malagobadan S, Nagoor NH. Evaluation of microRNAs regulating anoikis pathways and its therapeutic potential. *BioMed Res Int*. 2015;2015:716816.
21. Bayliss FT, Vinopal RT. Selection of ribosomal mutants by antibiotic suppression in yeast. *Science*. 1971;174(4016):1339–41.
22. Ierusalimskii ND, Shevchenko LA, Grishankova EV. Change of some physiological requirements of yeasts as a result of adaptation to streptomycin. *Mikrobiologiya*. 1963;32:13–6.
23. Bayliss FT, Ingrahm JL. Mutation in *Saccharomyces cerevisiae* conferring streptomycin and cold sensitivity by affecting ribosome formation and function. *J Bacteriol*. 1974;118(2):319–28.
24. Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*. 2015;6(7):4569–84.
25. Ennifar E, Paillart JC, Bodlenner A, Walter P, Weibel JM, Aubertin AM, Pale P, Dumas P, Marquet R. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(8):2328–39.
26. Bose D, Jayaraj G, Suryawanshi H, Agarwala P, Pore SK, Banerjee R, Maiti S. The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(4):1019–23.
27. Tran TP, Vo DD, Di Giorgio A, Duca M. Ribosome-targeting antibiotics as inhibitors of oncogenic microRNAs biogenesis: old scaffolds for new perspectives in RNA targeting. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(17):5334–44.
28. Pecina-Slaus N, Pecina M. Only one health, and so many omics. *Cancer Cell Int*. 2015;15:64.
29. Sun X, Jiao X, Pestell TG, Fan C, Qin S, Mirabelli E, Ren H, Pestell RG. MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield. *Oncogene*. 2014;33(42):4967–77.
30. David A, Netzer N, Strader MB, Das SR, Chen CY, Gibbs J, Pierre P, Bennink JR, Yewdell JW. RNA binding targets aminoacyl-tRNA synthetases to translating ribosomes. *J Biol Chem*. 2011;286(23):20688–700.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Discussion et perspectives

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de l'ajout des antibiotiques sur la culture en 3D de lignées cellulaires cancéreuses. Nous nous sommes concentrés sur la combinaison la plus couramment utilisée de pénicilline et de streptomycine. Par opposition avec les précédentes études (Freedman e Shin, 1974), l'ajout de P/S n'a pas eu d'effet significatif sur la prolifération des cellules dans les conditions de culture en adhérence. Cependant, les résultats de cette étude ont révélé une forte diminution du nombre de sphères après l'addition de (P/S). Comme le suggère les résultats des expériences de marquage ALDH, cet effet pourrait résulter d'une diminution spécifique de la population présentant un phénotype de cellules souches cancéreuses (CSC). Nous supposons que la perte du phénotype CSC déclenche l'apoptose cellulaire, probablement suite à une resensibilisation à l'*anoikis* (Malagobadan e Nagoor, 2015). Dans l'ensemble, cette étude met en garde contre l'ajout systématique d'antibiotiques dans les milieux de culture cellulaire, en particulier dans les cultures en suspension.

La prévention des contaminations est un défi constant dans la culture cellulaire, mais elle doit être abordée avec prudence. En effet, la dépendance à l'égard des antibiotiques conduit à de mauvaises pratiques aseptiques, à l'augmentation de contamination par les mycoplasmes et à une augmentation de la résistance aux antibiotiques par les microorganismes.

Quelles autres alternatives pourrait-il y avoir à l'ajout du cocktail (P/S) pour prévenir la contamination des milieux de culture cellulaire?

D'un point de vue pratique, la plupart des cultures cellulaires peuvent généralement être réalisées en absence d'antibiotiques, mais cela nécessite une gestion adaptée aux besoins spécifiques des conditions de travail du laboratoire. Atteindre et maintenir une bonne pratique aseptique est essentielle, en particulier lorsque l'on travaille avec des cultures précieuses. Néanmoins, dans certaines circonstances, telles que l'isolement de cellules à partir de biopsies humaines, une procédure de décontamination ne peut être évitée. Les antibiotiques ne doivent être utilisés qu'en dernier ressort pour les applications à court terme et il est conseillé de les retirer de la culture dès que possible. Enfin, nous recommandons une utilisation avec précaution des antibiotiques de la famille des Aminosides (Streptomycine, Gentamycine, kanamycine...) dont les propriétés intrinsèques, de par leur liaison à l'ARN, peuvent avoir une incidence sur l'expression des gènes ainsi que sur les

propriétés cellulaires. Une autre alternative serait de réduire de moitié la concentration utilisée par rapport à celle recommandée (FIGURE 3B).

Trois hypothèses dans lesquelles la streptomycine jouerait un rôle central, en s'associant à des structures d'ARN

Tout d'abord, alors que la streptomycine cible d'une façon spécifique la sous-unité ribosomique procaryote 30S, elle peut aussi s'associer aux ribosomes eucaryotes lorsque certaines conditions structurales sont remplies (Ierusalimskii *et al.*, 1963; Bayliss e Vinopal, 1971; Bayliss e Ingrahm, 1974). En analysant le profil de polysomes des cellules T84 cultivées en conditions adhérentes, nous n'avons observé aucun effet quantitatif sur la synthèse globale des protéines suite à l'ajout du cocktail (P/S) (FIGURE. 6). Cependant, ceci n'élimine pas la possibilité d'un changement subtil et « qualitatif », qui pourrait avoir une incidence sur une population mineure de ribosomes sensibles à la streptomycine.

Ensuite, la streptomycine pourrait affecter la traduction mitochondriale et plus particulièrement celle des CSC. Ceci est en adéquation avec une étude récente qui suggère que les antibiotiques ciblant le ribosome procaryote affectent spécifiquement l'activité mitochondriale dans les cellules souches cancéreuses et déclenchent une mort cellulaire (REF24). Néanmoins, cela n'explique pas pourquoi l'activité mitochondriale n'a pas d'incidence sur la culture en adhérence, où la prolifération élevée nécessite un taux élevé de synthèse de protéines.

Enfin, la streptomycine pourrait s'associer à certaines structures en épingle à cheveux de l'ARN et interférer avec le traitement ou la fonction de l'ARN. En effet, bien que les Aminosides soient principalement utilisés comme agents thérapeutiques pour cibler les bactéries, ils peuvent se lier de manière non sélective à une variété d'ARN qui possèdent des structures en tige-boucle caractéristiques, telles que les ARN viraux ou non codants (Ennifar *et al.*, 2006; Bose *et al.*, 2012). Une étude récente suggère la possibilité que les Aminosides pourraient se lier aux précurseurs d'ARN oncogènes possédant une structure tige-boucle et qu'ils inhiberaient ainsi leur maturation en miARN fonctionnels (Tran *et al.*, 2015). Cette hypothèse est plausible compte tenu de la complexité des cellules cancéreuses (Pecina-Šlaus e Pecina, 2015) et de la grande importance des réseaux miARN dans la régulation des propriétés des CSC (Sun *et al.*, 2014; Malagobadan e Nagoor, 2015).

En conclusion, cette étude met en garde contre l'utilisation systématique des antibiotiques dont les mécanismes d'action ne sont pas entièrement élucidés ; en effet, elle pourrait entraîner des biais expérimentaux qui entraveraient l'interprétation des résultats. Alors que le

mécanisme précis par lequel la (P/S) inhibe la capacité de formation de sphères reste à déterminer, cette étude suggère la possibilité d'utiliser les antibiotiques comme outil thérapeutique permettant de cibler spécifiquement les CSC. Ceci pourrait être particulièrement intéressant si nous considérons le fait que de nombreux antibiotiques possèdent déjà une autorisation d'utilisation par les différentes autorités de santé publique. D'un point de vue moléculaire, l'implication de la streptomycine dans l'inhibition du potentiel de formation des sphères par l'altération des fonctions ou du traitement de certains ARN pourrait permettre d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans l'acquisition et le maintien du phénotype souche. Ceci pourrait notamment conduire à l'identification de nouveaux ARN à cibler pour les futures thérapies anti-cancéreuses.

L'objectif futur est de comprendre par quels mécanismes la streptomycine inhibe la formation des sphères dans les cultures en suspension. Le but étant d'explorer la possibilité de son utilisation en tant que thérapie adjuvante, en association à un protocole de chimiothérapie conventionnel. En ciblant les CSC, cette nouvelle application pourrait contribuer à diminuer les rechutes et inhiber les processus métastatiques.

PARTIE II. Etude du rôle de RPL13 dans un modèle de cancer colorectal

1. Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude de *RPL13* dans le contrôle traductionnel au cours de la tumorigenèse colorectale. Afin d'introduire les résultats obtenus dans ce 3^{ème} volet développé au cours de ma thèse, je vais vous présenter quelques données issues de la littérature au sujet de *RPL13*.

1.1. Généralités sur RPL13

Le gène *RPL13*, codant pour une protéine ribosomique appartenant à la grande sous-unité 60S, est situé sur le chromosome 16 en position 16q24.3. Ce gène code pour 7 variants d'épissage, dont seulement 4 sont codants. Ces 4 variants aboutissent à 3 isoformes protéiques, dont la forme majoritaire représente 211aa (24,3kDa).

La protéine RPL13 est située en périphérie du ribosome, au contact de RPL4, L15, L18, L28, L35 et L36 (FIGURE 29). Les études menées chez la levure semblent indiquer que RPL13 est intégrée dans les phases précoces de la biogénèse des ribosomes et qu'en son absence la grande sous-unité ne soit pas exportée dans le cytoplasme (Pöll *et al.*, 2009); (Ohmayer *et al.*, 2013; Gamalinda *et al.*, 2014).

1.2. RPL13 et traduction localisée

Comme nous l'avons abordé en introduction, un enrichissement en protéines ribosomiques, dans certains compartiments subcellulaires, indiquerait une possible implication de ces protéines dans des mécanismes de contrôle traductionnel localisé (*chapitre 2.2.2.1.1.1*). Concernant RPL13, deux études suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans de tels mécanismes.

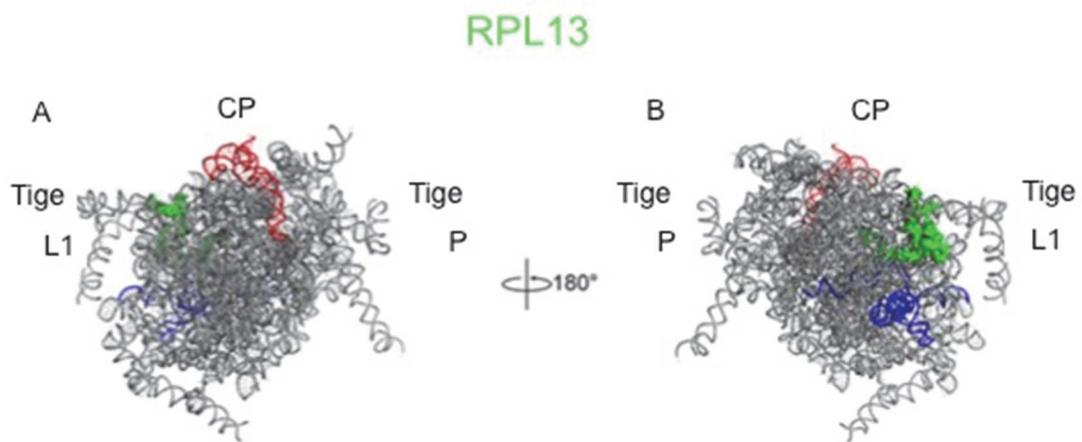


Figure 29 : Modélisation 3D de la grande sous-unité ribosomique humaine faisant apparaître la position de RPL13 au sein du ribosome. (A) Vue de l'interface et (B) vue du solvant. La protéine RPL13 est représentée en vert et les ARNr 5s, 5.8S et 28S sont représentés respectivement en rouge, bleu et gris. Sur la grande sous-unité nous retrouvons la protubérance centrale (CP), la tige L1 et la tige P.

En effet, chez le mollusque *Aplysia*, un transcriptome comparatif entre les centres cellulaires et les prolongements des neurones sérotoninergiques a permis d'identifier *RPL13* parmi les transcrits exprimés de manière différentielle entre ces deux compartiments (Moroz *et al.*, 2006). En accord avec l'hypothèse émise par Moccia en 2003, cette étude suggère que les protéines présentes à la surface du ribosome puissent être assemblées localement pour permettre une synthèse locale et spécifique des protéines (Moccia *et al.*, 2003).

Dans un contexte pathologique cette fois, RPL13 a été caractérisée dans une étude visant à identifier des protéines pouvant être impliquées dans la régulation de la formation des pseudopodes au cours de la migration dans les processus métastatiques (Shankar *et al.*, 2010). En effet, une analyse des transcrits par microarray ainsi qu'une analyse protéomique ont permis d'identifier RPL13 parmi 19 protéines spécifiquement enrichies dans les pseudopodes de six lignées cellulaires métastatiques humaines. La présence d'autres protéines ribosomiques, ainsi que celle du facteur d'initiation eIF4E, suggère la possibilité d'une traduction localisée au niveau des pseudopodes et une implication de *RPL13* dans ce processus.

1.3. RPL13 et cancer

Les premières études faisant état d'une possible implication de RPL13 dans les processus tumoraux remontent au début des années 90. C'est en 1992 que l'équipe de Adams identifia pour la première fois, par l'analyse différentielle d'une banque d'ADNc, un ARNm dont les taux étaient significativement plus élevés dans les lésions mammaires bénignes que dans les carcinomes (Adams *et al.*, 1992). La protéine, déduite de la séquence nucléotidique, est une protéine hautement basique de 211 acides aminés, sans séquence signal ou transmembranaire mais présentant deux signaux potentiels de localisation nucléaire ; l'ensemble des données d'analyse de séquence suggère qu'il pourrait s'agir d'une protéine de liaison aux acides nucléiques.

Les expériences visant à caractériser cet ADNc ont montré qu'il pouvait s'hybrider à de multiples séquences dans le génome humain et celui d'autres mammifères, et à des séquences génomiques uniques chez *Drosophila*, *Physarum* et *Schizosaccharomyces Pombe* ; ainsi cette ADNc représente une séquence génétique hautement conservée. Seul un transcrit majeur a été identifié dans les cellules humaines, orientant sur l'existence possible de plusieurs pseudogènes. Cependant, à cette époque, la comparaison avec les

bases de données disponibles de la séquence de nucléotides ou d'acide aminés n'a révélé aucune homologie avec des gènes répertoriés.

Les auteurs ont nommé le gène correspondant à l'ADNc ainsi identifié : *breast basic conserved gene (BBC1)* et un possible rôle en tant que gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein lui a été attribué ; cependant, quelques années plus tard, des données contradictoires concernant ce rôle potentiel ont été publiées (Moerland *et al.*, 1997).

En 1995, cette même équipe a étudié l'expression de *BBC1* dans un contexte physiologique cette fois. Les données obtenues suggèrent que l'ARNm de *BBC1* est exprimé à tous les stades du développement de *Drosophila melanogaster* avec cependant des variations, puisque le niveau d'expression de RPL13 est maximal pendant l'embryogenèse (Helps *et al.*, 1995). C'est au cours de cette même étude que les auteurs ont identifié des similarités de séquence entre les prédictions des protéines codées par l'ARNm de *BBC1* et la protéine de la grande sous-unité ribosomique de rat L13 (Olvera e Wool, 1994); c'est à cette occasion que le gène *BBC1* a été renommé *RPL13*.

Ensuite, en 1999 l'expression de *BBC1* a été identifiée comme dérégulée dans le cancer de la prostate (Hügel e Wernert, 1999). Les auteurs ont montré que *BBC1* est moins exprimé dans les cancers réfractaires aux traitements hormonaux, qui sont de mauvais pronostic, que dans les cancers de la prostate répondant aux traitements hormonaux, et qui sont de meilleur pronostic. Dans les cancers de la prostate, la perte d'hétérozygotie au niveau 16q a été observée dans de nombreuses études et la perte de l'allèle 16q est significativement plus élevée dans les cas de cancers terminaux et métastatiques que dans les premiers stades tumoraux localisés. Cette étude suggère de nouveau un possible rôle suppresseur de tumeur pour ce gène.

La première étude faisant état d'une probable implication de RPL13 dans le cancer colorectal remonte à 2006 (Kobayashi *et al.*, 2006). Les auteurs ont mis en évidence un rôle potentiel de RPL13 dans la prolifération et la viabilité des cellules de cancer gastro-intestinal humaines. En effet, il semblerait que l'inhibition de l'ARNm de *RPL13* dans la lignée de cancer gastrique NUGC4 et de cancer colorectal HCT116 inhibe la croissance cellulaire, induise un arrêt du cycle, et diminue la tumorigénicité de ces cellules. De plus, cette étude fait état d'une corrélation inverse entre l'expression de RPL13 et la sensibilité à la chimiothérapie *in-vitro*.

Ensuite, l'expression de l'ARNm de *RPL13* a été évaluée par RT-qPCR dans des échantillons de tissus de cancer gastro-intestinal. L'augmentation d'expression de *RPL13* a été retrouvée dans 28% des cancers gastriques, 41% des cancers colorectaux et 20% des cancers hépatiques comparativement à son expression dans le tissu sain adjacent

correspondant. Le niveau d'expression de *RPL13* corrèle avec les stades avancés de cancer gastrique ; bien que non significative, il semblerait qu'il existe le même type de corrélation dans le cancer colorectal.

L'ensemble des données issues de cette étude suggère que *RPL13* pourrait être impliqué dans la viabilité des cellules de cancer gastro-intestinal et que les niveaux élevés de son expression pourraient être en partie responsable de la résistance aux traitements par chimiothérapie. Les auteurs suggèrent également que l'expression de *RPL13* pourrait être utilisée comme marqueur prédictif de la réponse aux traitements par chimiothérapie dans les cancers gastro-intestinaux.

Plus récemment, le rôle de RPL13 a été étudié dans un modèle cellulaire de mélanome, dans lequel son inhibition altère la viabilité des cellules (Kardos *et al.*, 2014). D'un point de vue mécanistique, cette étude révèle que la diminution d'expression de RPL13 induit une augmentation de la stabilité de p53 médiée par l'interaction de RPL5 et RPL11 avec MDM2 (activation de la voie RP-MDM2-p53), aboutissant *in-fine* à l'induction de l'apoptose.

Les données de la littérature au sujet de *RPL13* font état de dérégulations de son expression dans différents types de cancer (sein, prostate, gastro-intestinal). Cependant ces études, pour la plupart descriptives, s'intéressent majoritairement à l'expression des transcrits et non pas à l'expression de la protéine.

Bien que RPL13 semble indispensable au processus de biogenèse du ribosome, son rôle exact dans la carcinogenèse demeure incompris. Cependant, son enrichissement au niveau de certains compartiments subcellulaires suggère qu'elle puisse être impliquée dans la traduction localisée.

Dans cette étude, nous proposons d'étudier plus en détail le rôle de *RPL13* dans la carcinogenèse colorectale et tout particulièrement l'impact de son expression sur le phénotype cellulaire et l'acquisition de propriétés fonctionnelles. Puis par le biais d'étude du transcriptome et du traductome, nous espérons mettre en lumière des mécanismes de contrôle traductionnel exercé par RPL13. Enfin, le développement d'un outil d'édition génique, permettant une dégradation immédiate et contrôlée de la protéine nous permettra de dissocier son rôle de chaperonne nucléaire de celui qu'elle exerce au sein du ribosome mature dans le cytoplasme.

2. Résultats

2.1. La modification de l'expression de RPL13 induit des changements morphologiques

Afin d'étudier une éventuelle implication de *RPL13* dans le contrôle traductionnel, nous avons cherché à inhiber son expression dans un modèle cellulaire de cancer colorectal. L'objectif initial était de pouvoir étudier l'effet de cette déplétion sur différents critères phénotypiques ainsi que sur la traduction d'un point de vue global et spécifique.

Dans un premier temps, nous avons opté pour une approche par sh-RNA nous permettant d'établir une lignée stable dans laquelle l'expression de RPL13 serait inhibée (sans toutefois être abolie) de façon permanente.

Les cellules SW620 ont été transduites à l'aide d'un vecteur lentiviral (Decipher shRNA Lentiviral Vector pRS19-U6-(sh)-Ubc-TagRFP-2A-Puro) contenant une séquence ciblant l'ARNm de *RPL13*. La construction que nous avons utilisée possède également un gène de résistance à la Puromycine ainsi qu'un gène rapporteur codant pour la *red fluorescent protein* RFP, ces deux éléments nous permettent de contrôler l'intégration et l'expression de notre transgène. Nous nous sommes assurés de l'intégration du sh-RNA en sélectionnant les clones résistants à la puromycine durant 2 semaines. Ce processus de sélection a été renouvelé pendant 1 semaine après chaque décongélation.

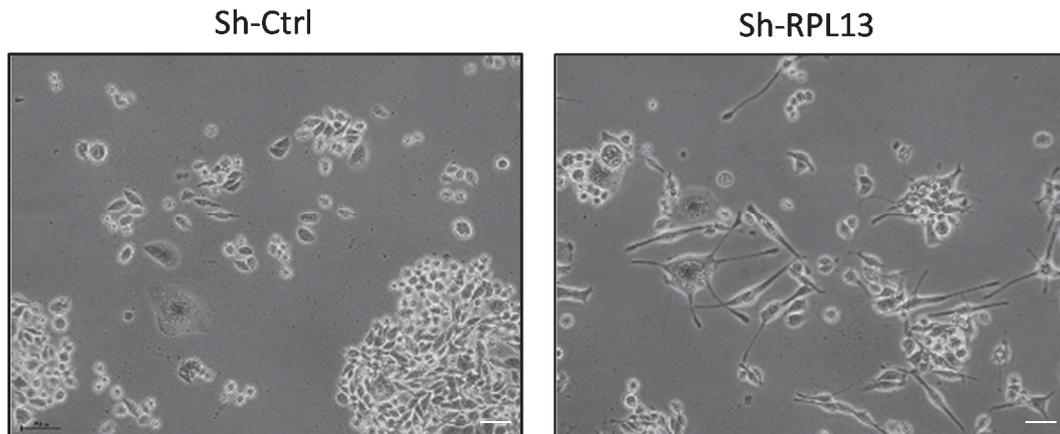


Figure 30 : L'inhibition de RPL13 dans la lignée SW620 entraîne un changement morphologique. Images de microscopie photonique à contraste de phase (X10) réalisées 1 semaine après l'introduction du shRNA (images représentatives de n=3 expériences). L'échelle représentée par la barre correspond à 50µm.

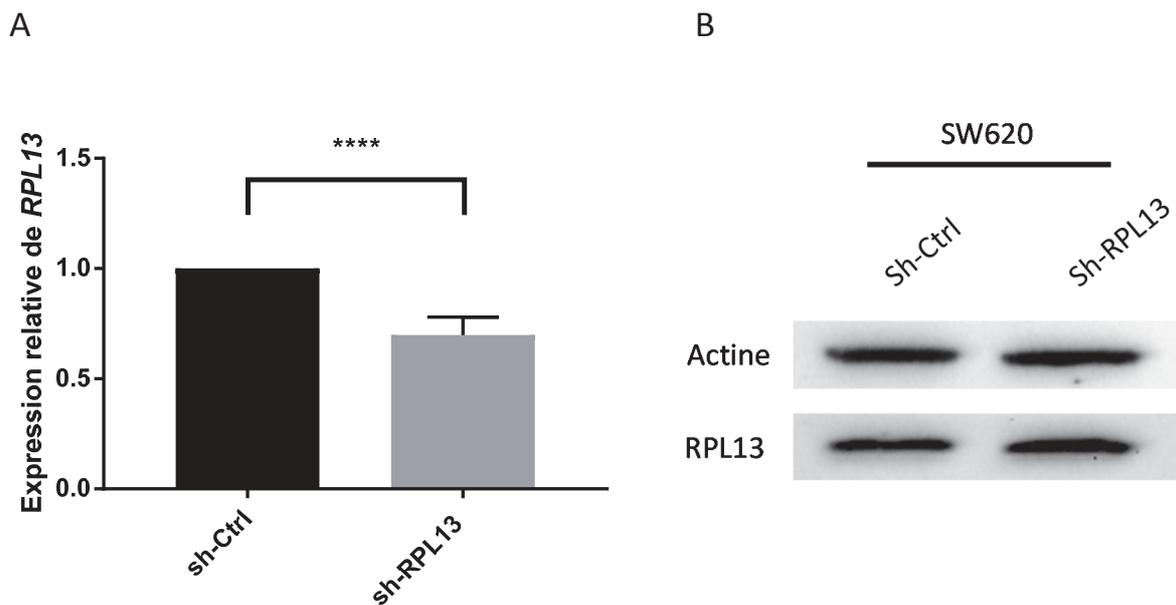


Figure 31 : L'introduction du shRPL13 dans la lignée SW620 induit une diminution modérée de l'expression des transcrits *RPL13* et aucune inhibition de l'expression de la protéine. (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression de *RPL13* dans la lignée SW620 après normalisation par rapport à l'actine. n=5 dans chaque groupe. Les valeurs moyennes sont indiquées, les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD) ****p<0.0001 (Unpaired t-test) La lignée SW620 sh-Ctrl sert de contrôle et (B) Analyse par western blot dirigé contre RPL13. L'actine permet de contrôler la quantité de protéines (représentatif de n=4 expériences).

Dans la première semaine suivant la transduction des cellules, **nous avons pu observer des changements morphologiques drastiques** (FIGURE 30). En effet, les cellules ayant reçu le vecteur lentiviral contenant le sh-RPL13 présentent des **prolongements membranaires faisant penser à des pseudopodes** et ceux-ci persistent jusqu'au 1^{er} passage. Parallèlement nous avons transduit ces cellules avec des sh-RNA ciblant d'autres protéines ribosomiques, notamment RPL22, et nous avons pu constater que ce changement morphologique était spécifique à RPL13.

Le niveau d'expression de *RPL13* a ensuite été évalué par RT-qPCR ainsi que par western blot (FIGURE 31).

Au cours des deux mois ayant suivi la transduction, nous avons pu observer une diminution de l'expression des transcrits de *RPL13* de l'ordre de 30% par rapport au contrôle. Cependant aucune variation du niveau de la protéine n'a été mise en évidence.

Par la suite nous avons contrôlé de nouveau l'expression de *RPL13* par RT-qPCR et malgré le maintien de la pression de sélection, nous avons constaté un retour de son expression à un niveau basal (FIGURE 32). Parallèlement, nous avons vérifié par une analyse en cytométrie en flux l'expression du rapporteur RFP : nous avons constaté que celui-ci n'était plus exprimé dans la lignée SW620 sh-RPL13 alors qu'il est toujours présent dans la lignée contrôle SW620 sh-Ctrl (FIGURE 33). Après trois échecs consécutifs d'établissement d'une lignée stable SW620 sh-RPL13, nous avons émis les deux hypothèses suivantes :

- soit l'approche utilisée, notamment le processus de sélection, n'était pas appropriée,
- soit les cellules exprimant le sh-RPL13 se divisaient peu, ce qui les vouait à disparaître au cours des passages.

Nous avons alors décidé de modifier notre stratégie, et avons opté pour une approche par siRNA, permettant d'obtenir une **inhibition transitoire et massive de *RPL13***. Nous avons introduit le si-RPL13 dans la lignée SW620 et nous avons contrôlé 72h après la transfection l'expression de l'ARN messager et de la protéine.

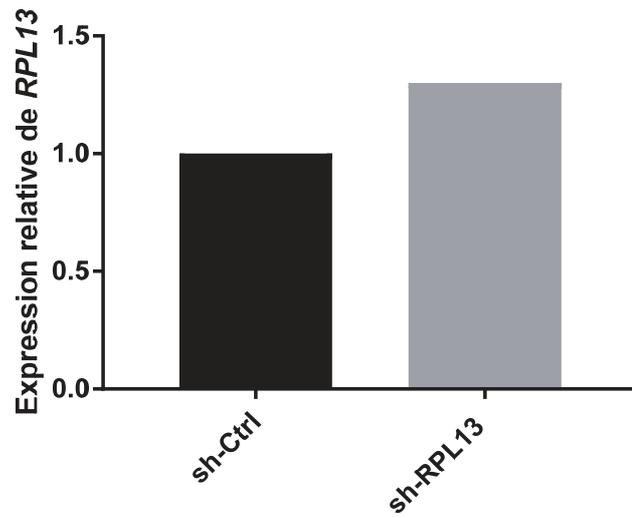


Figure 32 : Perte de l'inhibition de RPL13 dans lignée SW620 sh-RPL13. Analyse par RT-qPCR de l'expression de RPL13 dans la lignée SW620 après normalisation par rapport à l'actine.

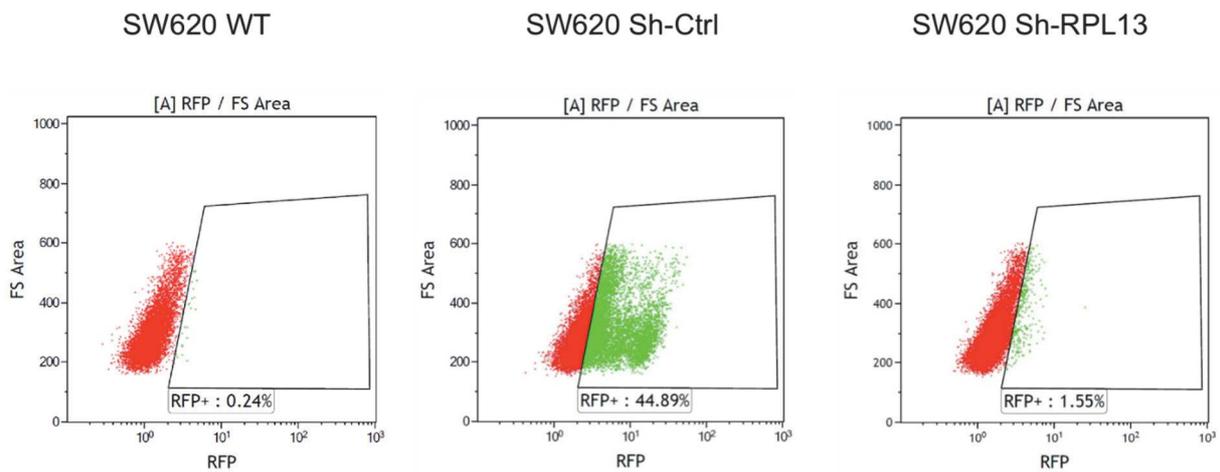
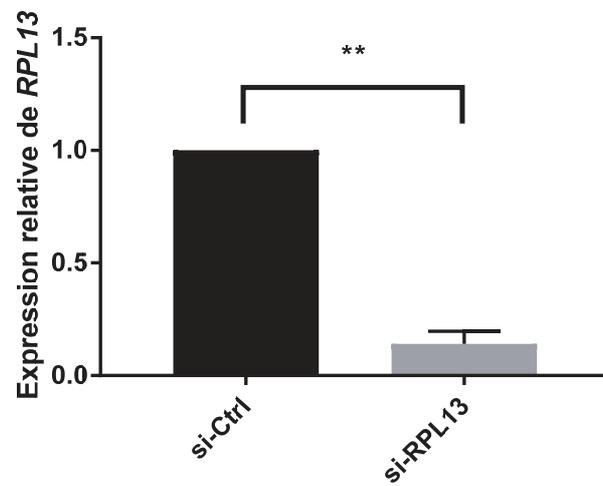


Figure 33 : Perte de l'expression de la RFP dans la lignée SW620 sh-RPL13. Analyse de l'expression de la RFP par cytométrie en flux.

A



B

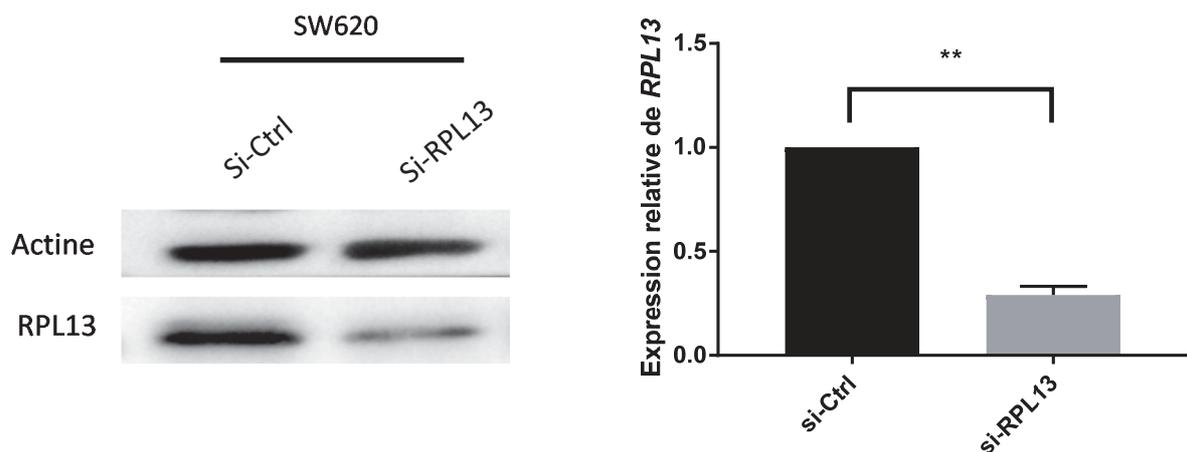


Figure 34 : L'utilisation du si-RPL13 permet d'obtenir une diminution des transcrits et une diminution de l'expression de la protéine. (A) Analyse par RT-qPCR après normalisation par rapport à l'actine. n=2 dans chaque groupe. La lignée SW620 si-Ctrl sert de contrôle et **(B)** Analyse par western blot dirigé contre RPL13. L'actine permet de contrôler la quantité de protéines. n=2 dans chaque groupe. Les valeurs moyennes sont indiquées, les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD) **p<0.01 (Unpaired t-test).

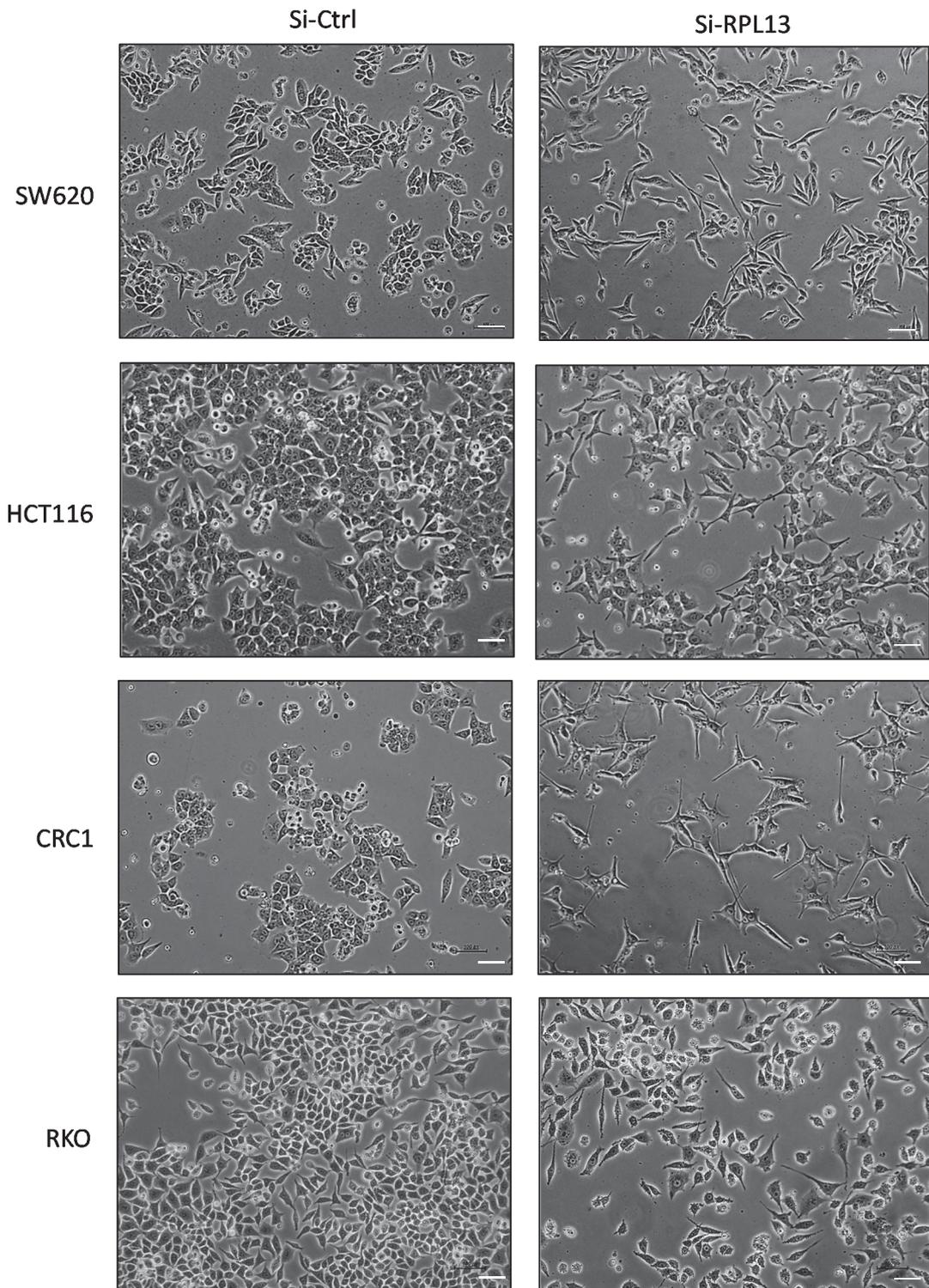


Figure 35 : L'inhibition de RPL13 induit le même changement morphologique dans quatre lignées cellulaires de cancer colorectal. Images de microscopie photonique à contraste de phase (X10) réalisées 72h après l'introduction du si-RPL13 dans les lignées SW620, HCT116, CRC1 et RKO. L'échelle représentée par la barre correspond à 50µm.

Tout d'abord, nos résultats par qPCR et western blot confirment que l'approche par siRNA permet de diminuer significativement l'expression de *RPL13* au niveau de l'ARN messager et de la protéine (respectivement 86% et 71%).

De plus, nous avons été en mesure **de reproduire le changement morphologique observé précédemment** (FIGURE 35), cette fois-ci en utilisant un si-RPL13. Par ailleurs, cette observation a été confirmée dans quatre lignées différentes : trois lignées commercialisées par l'ATCC, métastatique (SW620) et non métastatiques (RKO, HCT116), et une lignée primaire établie au laboratoire à partir d'un échantillon tumoral de patient (CRC1). Enfin, un siRNA ciblant RPL22 ne permet pas d'obtenir ce phénotype au niveau morphologique.

La modification morphologique que nous avons initialement observée dans la lignée SW620 sh-RPL13 semble donc être spécifique d'une diminution de l'expression de RPL13 et n'est pas dépendante d'un contexte mutationnel propre à la lignée SW620.

Afin de mieux comprendre le mécanisme conduisant à ce changement morphologique, nous avons entrepris d'étudier l'effet de l'inhibition de RPL13 sur la régulation traductionnelle. En effet, RPL13 n'a pas de fonction extra-ribosomique connue, nous n'avons pas été en mesure de la détecter dans les fractions libres, il est donc probable que nous observions un effet au niveau de la traduction.

2.2. L'inhibition de RPL13 altère la traduction globale et spécifique

Pour étudier l'effet de la déplétion de RPL13 sur la traduction globale, nous avons utilisé deux méthodes différentes :

- 1- la méthode *Surface Sensing of Translation* (SUnSET) associée à l'utilisation de siRNA possédant une étiquette fluorescente FAM; la présence de cette étiquette nous permet de contrôler que les cellules en cours de traduction ont bien intégré le si-RPL13,
- 2- la réalisation d'un profil de polysomes à partir de gradient de sucrose.

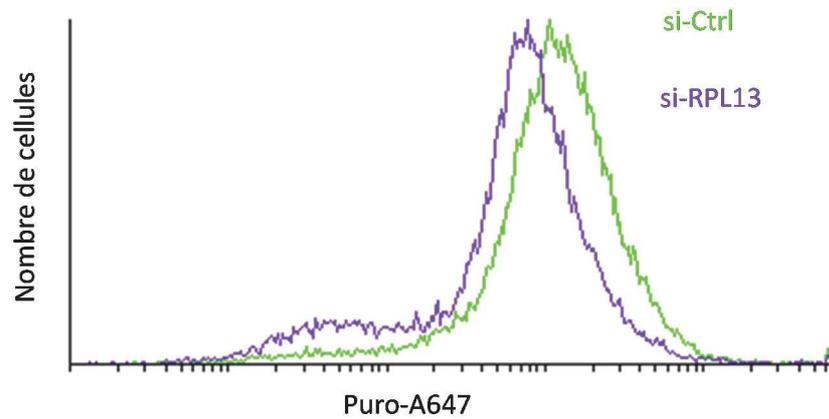


Figure 36 : Le taux de traduction global est diminué dans les cellules ayant intégré le siRPL13. Evaluation de l'activité traductionnelle par cytométrie en flux avec la méthode SUNSET 72h après l'introduction du si-RPL13 dans la lignée SW620. Anticorps I^{aire} anti-Puromycine mouse et II^{aire} anti-mouse Alexa 647.

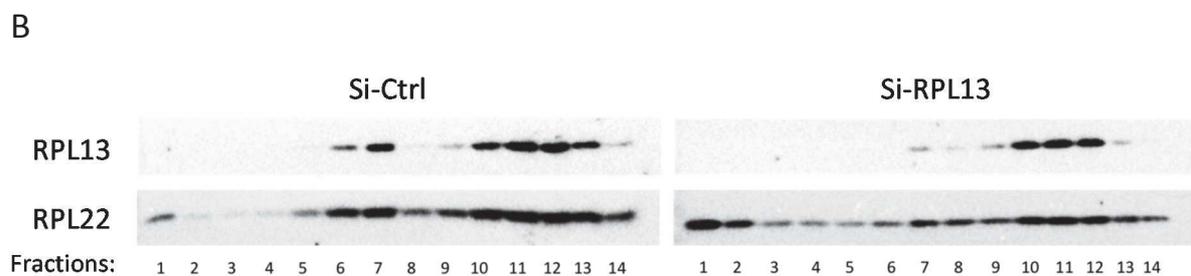
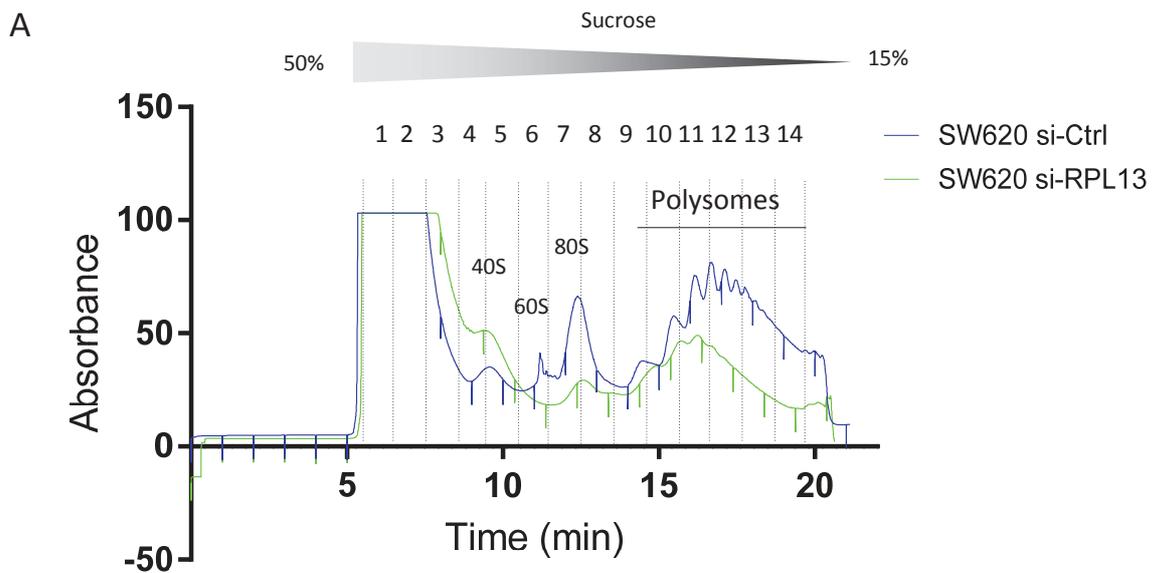


Figure 37 : L'inhibition de RPL13 dans la lignée SW620 entraîne une altération du profil de polysomes. (A) Profil de polysomes réalisé 72h après l'introduction du si-RPL13 dans la lignée SW620 et (B) Western blot réalisé sur les fractions polysomales et dirigé contre RPL13 et RPL22. RPL22 sert de contrôle (représentatif de n= 2 expériences).

Tout d'abord, l'analyse par cytométrie en flux nous a permis de confirmer que le siRNA fluorescent était présent dans la majorité des cellules ayant été transfectées. Par SUnSET, 72h après avoir intégré le si-RPL13, **les cellules continuent à traduire avec une diminution du taux de traduction apparent de l'ordre de 35% par rapport au contrôle** (FIGURE 36).

L'étude du profil polysomal révèle que l'inhibition de RPL13 entraîne une altération de la traduction globale, **avec une absence de la sous-unité 60S et une diminution de 39,5% du pic de monosome et de polysomes. Parallèlement, nous pouvons observer une accumulation de la sous-unité 40S** (FIGURE 37A).

Afin d'évaluer la présence de RPL13 dans les ribosomes en cours de traduction après intégration du siRNA nous avons réalisé un western blot sur les différentes fractions polysomales (FIGURE 37B). Il semblerait qu'au sein des ribosomes traductionnellement actifs, la protéine RPL13 soit toujours présente. Il est important de noter que, contrairement à la protéine RPL22, la protéine RPL13 n'est pas détectée dans la fraction libre, suggérant que son expression cytoplasmique se limite à son intégration dans le ribosome. Par ailleurs, l'altération de la formation de la sous-unité 60S entraîne une accumulation de la protéine RPL22 dans la fraction libre.

Le fait que la sous-unité 60S ne soit plus visible sur le profil de polysomes, associée à une forte mortalité cellulaire au bout de quelques jours (FIGURE 38), suggère une éventuelle **altération de la biogenèse des ribosomes induite par l'inhibition de RPL13**. Afin de le confirmer, nous avons initié une collaboration avec l'équipe du Pr Denis Lafontaine (Université Libre de Bruxelles). Nous avons donc inhibé RPL13 dans la lignée HCT116, et nous leur avons transmis les lysats cellulaires pour lesquels une analyse de la biogenèse des ribosomes est en cours. Celle-ci comprend l'étude de différents paramètres : la maturation des pré-ARNr, l'accumulation des ARNr matures et l'étude de l'expression de la protéine p53.

Nous avons donc été en mesure d'inhiber RPL13 avec le si-RNA et les deux méthodes que nous avons utilisées nous indiquent que la traduction globale est altérée par cette déplétion. De plus, les cellules laissées en culture après l'introduction du si-RPL13 ne survivent pas plus de quelques jours.

Une autre question fondamentale à laquelle nous souhaitons répondre est de savoir si RPL13 exerce un rôle sur l'activité du ribosome, par exemple en lui conférant une spécificité sur l'engagement sélectif de certains ARNm. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser la lignée HCT116, présentant les changements morphologiques les plus importants. Nous avons

transfecté cette lignée avec le si-RPL13 ou le si-Ctrl, puis au bout de 48h les cellules ont été récupérées et traitées de deux manières. Une partie a été lysée dans du TRIzol pour la réalisation d'un transcriptome et l'autre partie a été lysée et déposée sur un gradient de sucrose pour la réalisation d'un profil polysomal et d'une analyse par *ribosome profiling* sur la fraction 80S et les polysomes (FIGURE 39). Les échantillons ainsi préparés sont actuellement en cours d'analyse.

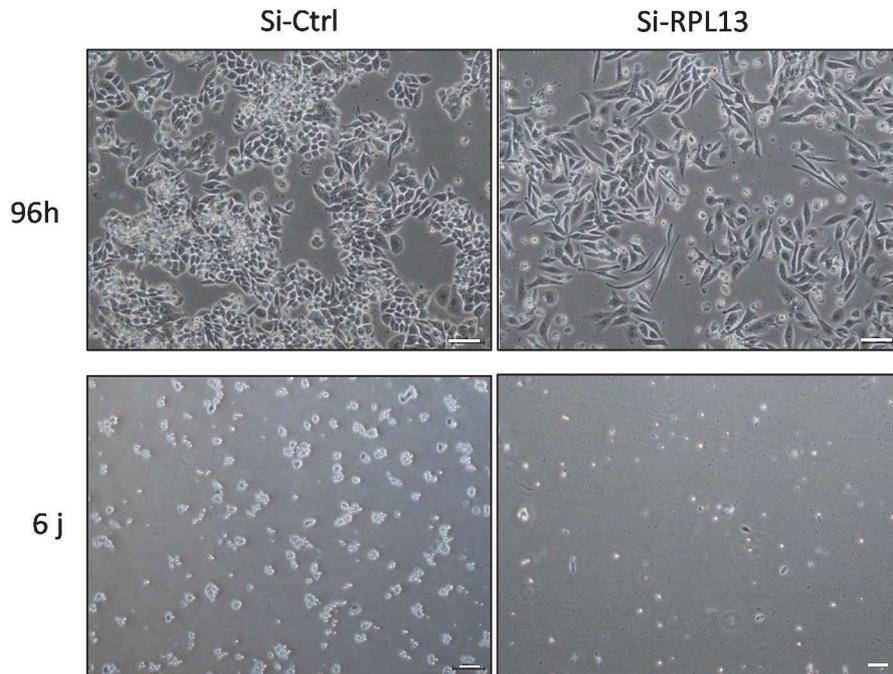


Figure 38 : L'inhibition de RPL13 altère la survie des cellules. Images de microscopie photonique à contraste de phase réalisées 96h (X10) et 6 jours (X4) après l'introduction dans la lignée SW620 du si-RPL13. Après passage, les cellules SW620 si-Ctrl reprennent normalement à l'inverse des cellules SW620 si-RPL13. L'échelle, représentée par la barre correspond à 50 μ m.

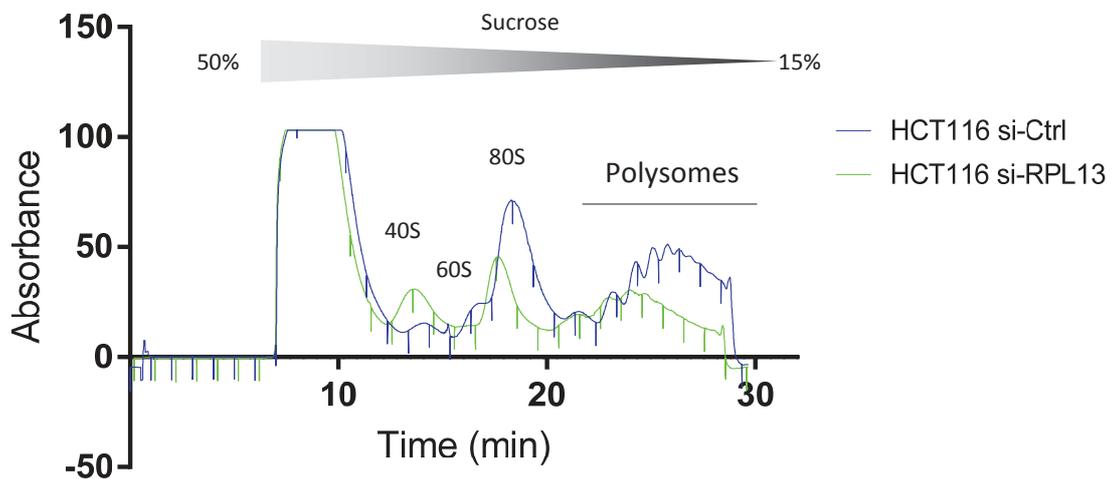


Figure 39: L'inhibition de RPL13 dans la lignée HCT116 entraîne une altération du profil de polysome. Profil de polysomes réalisé 72h après l'introduction du si-RPL13 dans la lignée HCT116 (représentatif de n= 3 expériences). La lignée HCT116 si-Ctrl sert de contrôle.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que RPL13 semble être indispensable à la formation de la sous-unité 60S et que sa déplétion ne soit pas compatible avec la survie des cellules. Parallèlement, la baisse d'expression de RPL13 induit un changement morphologique reproductible par différentes approches et dans différentes lignées cellulaires.

Afin de permettre la caractérisation de cette protéine, nous avons alors entrepris de développer un outil nous permettant de diminuer l'expression de la protéine tout en nous affranchissant de son rôle de chaperonne au cours de la biogenèse des ribosomes.

Cet outil, basé sur la technologie d'édition génique CRISPR/Cas, devrait nous permettre, d'une part de moduler l'expression de la protéine RPL13 endogène de manière inductible et dose dépendante, et d'autre part de cibler RPL13 au sein même du ribosome.

2.3. Développement et validation de la lignée SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP

2.3.1. Introduction au système CRISPR/Cas

2.3.1.1. Principe de l'outil d'édition génique CRISPR/Cas

L'outil CRISPR, véritable révolution technologique, est apparu sur le devant de la scène il y a seulement 5 ans. Utilisé aujourd'hui par les laboratoires du monde entier, cet outil permet d'éditer et de modifier le génome des organismes avec une facilité déconcertante.

Tout a commencé en 1987, lorsque Atsuo Nakata a mis en évidence des séquences répétées d'ADN dans le génome de la bactérie *Escherichia Coli* (Ishino *et al.*, 1987). Ces courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées, *Clusterd regularly interspersed short palindromic repeats* (CRISPR) correspondent à des séquences d'ADN de virus que les bactéries intègrent à leur propre génome. Ces séquences sont la base d'un système immunitaire adaptatif, développé par les bactéries afin de se protéger des virus bactériophages (Barrangou *et al.*, 2007). Elles vont être transcrites de manière constitutive en ARN, et ces ARN vont agir comme des sondes permettant la reconnaissance de séquences complémentaires, correspondant à de l'ADN viral. En cas d'infection, le virus pourra alors être détecté puis éliminé ; pour ce faire, la bactérie dispose d'une enzyme, la *CRISPR-associated protein 9* (Cas9), permettant d'induire une coupure double brin de l'ADN à l'endroit reconnu par la sonde.

C'est en 2012, qu'Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna ont eu l'idée de détourner ce système afin de l'utiliser comme des « ciseaux à découper l'ADN », permettant de modifier le génome (Jinek *et al.*, 2012). La méthode est simple : il suffit d'introduire dans la cellule hôte des sondes d'ARN artificielles reconnaissant le gène d'intérêt ainsi que l'enzyme Cas9. La Cas9 sera dirigée vers le gène cible et coupera de manière séquence spécifique à l'endroit précis indiqué par la sonde (FIGURE 40).

Ce système CRISPR/Cas, adapté aux cellules de mammifère est basé sur l'utilisation de la nucléase Cas9 qui, complexée à un ARN guide (ARNg) complémentaire de la séquence cible (*Protospacer*), clive l'ADN de façon spécifique en amont d'une séquence *protospacer adjacent motif* (PAM) localisée sur l'ADN génomique. La séquence PAM correspond à la séquence nucléotidique NGG (FIGURE 40A).

L'action de la nucléase Cas9 guidée par l'ARNg aboutit donc à une coupure double brin de l'ADN génomique au niveau de la séquence cible. Ensuite, deux mécanismes de réparation peuvent avoir lieu : 1) Les deux extrémités peuvent se joindre, ce qui aboutit au *knock-out* du gène cible, 2) En présence de séquences homologues, insérées via un vecteur donneur (cassette de réparation), il va y avoir recombinaison homologue permettant de réaliser des *knock-out/in*, ou des réparations/délétions du gène (FIGURE 40B, C).

Deux formes de nucléase Cas9 peuvent être utilisées. La Cas9 humanisée, réalisant un clivage double brin, et la Cas9 mutée « Nickase » réalisant un clivage sur un seul brin. La Nickase augmente la spécificité de la coupure, mais dans ce cas, deux ARNg sont nécessaires de manière à ce que chacun aboutisse au clivage d'un brin de l'ADN.

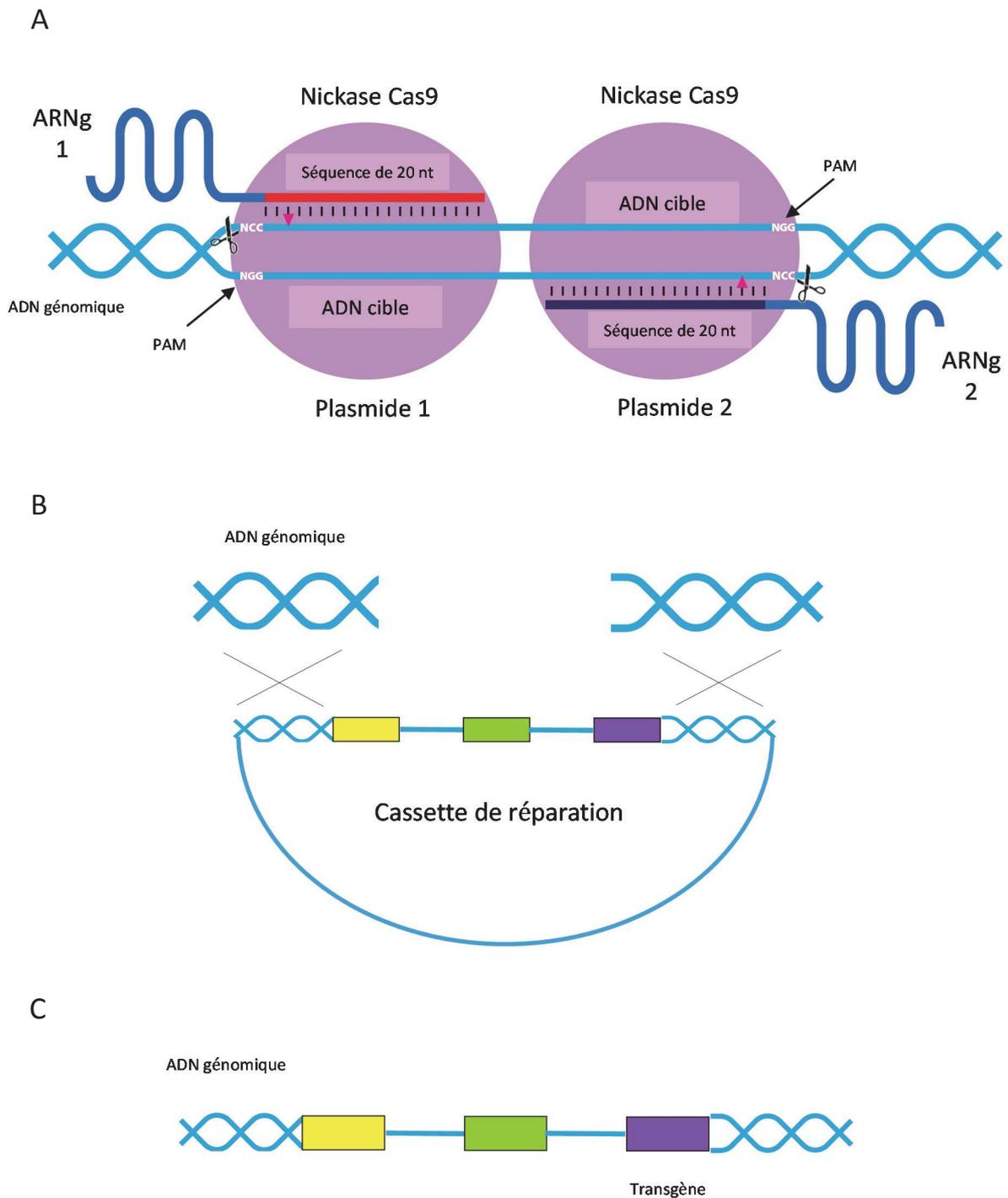


Figure 40 : Représentation schématique du système CRISPR/Cas9. (A) Dans la cellule ont été introduits le plasmide codant la Nickase Cas9, le plasmide codant le guide 1 et celui codant le guide 2. La Nickase Cas9 complexée aux guides 1 et 2 complémentaires de la séquence cible clive l'ADN en amont des séquences PAM. **(B)** L'introduction concomitante dans la cellule de la cassette de réparation permet l'insertion d'un transgène par recombinaison homologue au niveau du site de clivage. **(C)** Le transgène est alors présent au niveau d'un site spécifique de l'ADN génomique.

2.3.1.2. Principe du dégron inductible par l'auxine (AID)

Chez les plantes, il existe un système dans lequel l'hormone auxine contrôle l'expression de gènes dans différentes étapes de la croissance et du développement (Teale *et al.*, 2006). Les hormones de la famille des auxines, telles que l'acide indole-3-acétique (IAA), se lient à la protéine *transport inhibitor response protein 1* (TIR1) pour permettre son interaction avec une forme spécifique de l'ubiquitine ligase SCF E3 (SCF^{TIR1}) (Gray *et al.*, 1999). L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés, extrêmement conservée dans le monde vivant, dont le rôle principal consiste à marquer une protéine pour induire sa dégradation par le protéasome. Chez les autres eucaryotes on ne retrouve ni l'hormone auxine, ni la protéine TIR1, cependant ils partagent la voie de dégradation médiée par le SCF, ce qui permet d'introduire le dégron inductible par l'auxine dans des cellules non plantes afin de contrôler de manière conditionnelle la stabilité de protéines. Le système *Auxin inducible degron* (AID) permet de générer des mutants dans lesquels la dégradation rapide et réversible de protéines cibles est conditionnée par l'ajout d'auxine (Nishimura *et al.*, 2009).

La construction des mutants est dépendante de l'introduction de deux éléments dans la cellule. Le premier composant est la protéine TIR1, qui forme une ubiquitine ligase SCF^{TIR1} fonctionnelle en s'associant au SCF endogène, qui est conservé chez tous les eucaryotes ; dans cette étude, nous avons utilisé la protéine TIR1 dérivée de *Oryza sativa* (OsTIR1), puisqu'elle fonctionne mieux à haute température que son homologue issu de *A. thaliana* (Nishimura *et al.*, 2009). Le second composant est l'étiquette AID qui est fusionnée à la protéine d'intérêt au niveau du locus endogène du gène codant la protéine cible. Pour notre système, nous avons utilisé un fragment de 49 acides aminés issu de l'AID d'origine, appelé AID* et dont le poids moléculaire représente 5,1kDa. Nous avons également ajouté en fusion une étiquette GFP, nous permettant de visualiser la protéine endogène en microscopie ou en cytométrie en flux, et un gène de résistance à la néomycine. L'ensemble des protéines insérées en fusion à RPL13 représentant un poids moléculaire total d'environ 34 kDa (FIGURE 41).

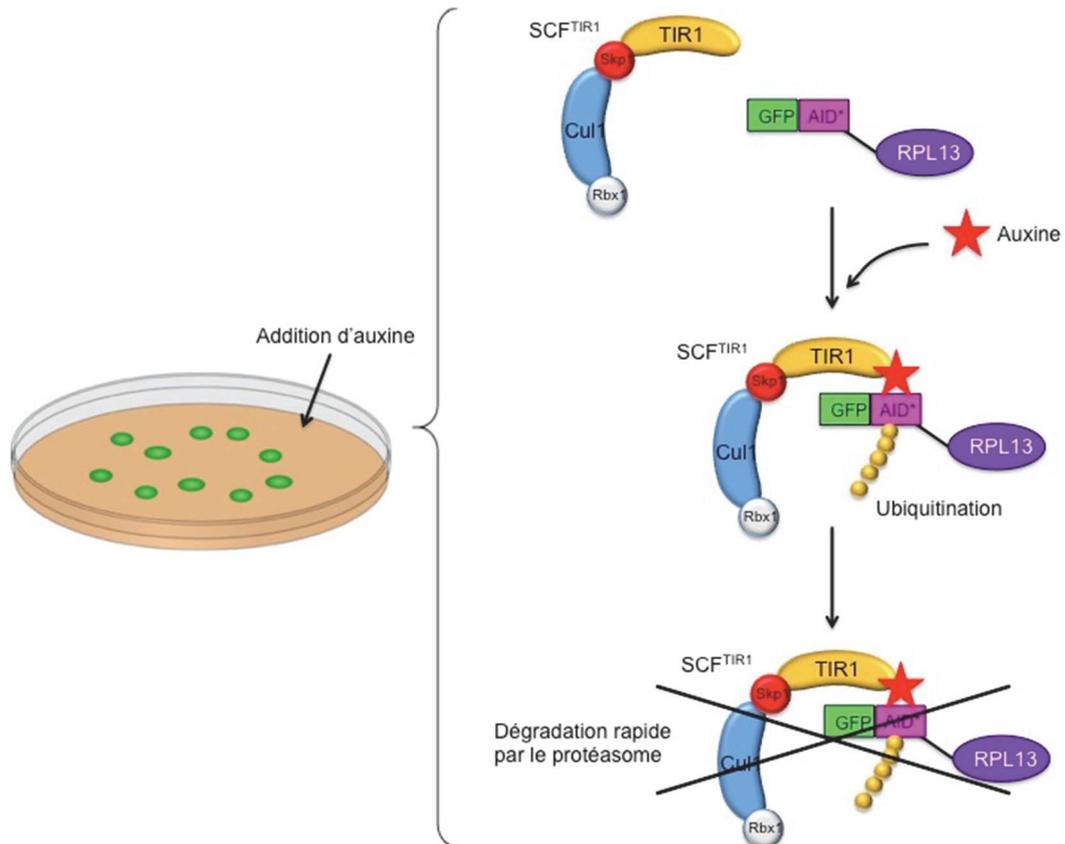


Figure 41 : Schéma d'illustration du système AID. La liaison de l'auxine au TIR1 permet l'interaction entre le TIR1 et le dégron AID situé au niveau de la protéine cible. Le complexe SCF-TIR1 agit en tant qu'ubiquitine ligase E3 entraînant la polyubiquitination du dégron AID. Il en résulte la dégradation par le protéasome de la protéine cible.

2.3.2. Développement de la lignée

Avant de débiter la construction, nous avons vérifié que la présence des protéines fusionnées à RPL13 n'entravait pas son intégration dans le ribosome.

Nous avons donc introduit dans nos cellules un vecteur d'expression contenant la séquence de RPL13 additionnée d'une étiquette GFP en C-terminal (peGFP-N1-RPL13) ou en N-terminal (peGFP-C3-RPL13). Suite à la transfection, nous avons contrôlé la présence de la GFP au sein des ribosomes ; pour ce faire, nous avons enrichi les complexes de forte densité (monosomes et polysomes) par sédimentation sur un coussin de sucrose, puis nous avons réalisé une analyse par western blot.

L'analyse de nos échantillons par western blot nous confirme la présence de RPL13-GFP au sein des ribosomes puisque nous visualisons une bande d'environ 53 kDa, correspondant à RPL13 additionnée de la GFP. La position N-terminal ou C-terminal de la GFP ne semble pas avoir d'influence sur l'intégration dans le ribosome (FIGURE 42).

La présence de l'étiquette GFP ne semble pas gêner l'intégration de RPL13 au sein du ribosome, qu'elle soit positionnée en C-terminal ou en N-terminal.

Pour construire notre lignée SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP, nous avons procédé en deux temps (FIGURE 43). Tout d'abord, nous avons établi la lignée parentale en introduisant par le biais d'une transduction virale un vecteur d'expression que nous avons construit codant pour OsTIR1 additionnée d'une étiquette c-myc et d'un gène de résistance à l'hygromycine. Après une période de sélection avec l'antibiotique, nous avons contrôlé la présence de l'OsTIR1 dans deux clones différents par la réalisation d'un western blot ((FIGURE 44).

Nous pouvons constater la présence d'une bande d'environ 80kDa correspondant à l'OsTIR1-Myc. Le clone 1, exprimant OsTIR1 de manière plus intense, a été conservé comme lignée parentale.

Cette analyse par western blot nous confirme que **nous avons établi une lignée SW620 exprimant de manière stable l'OsTIR1.**

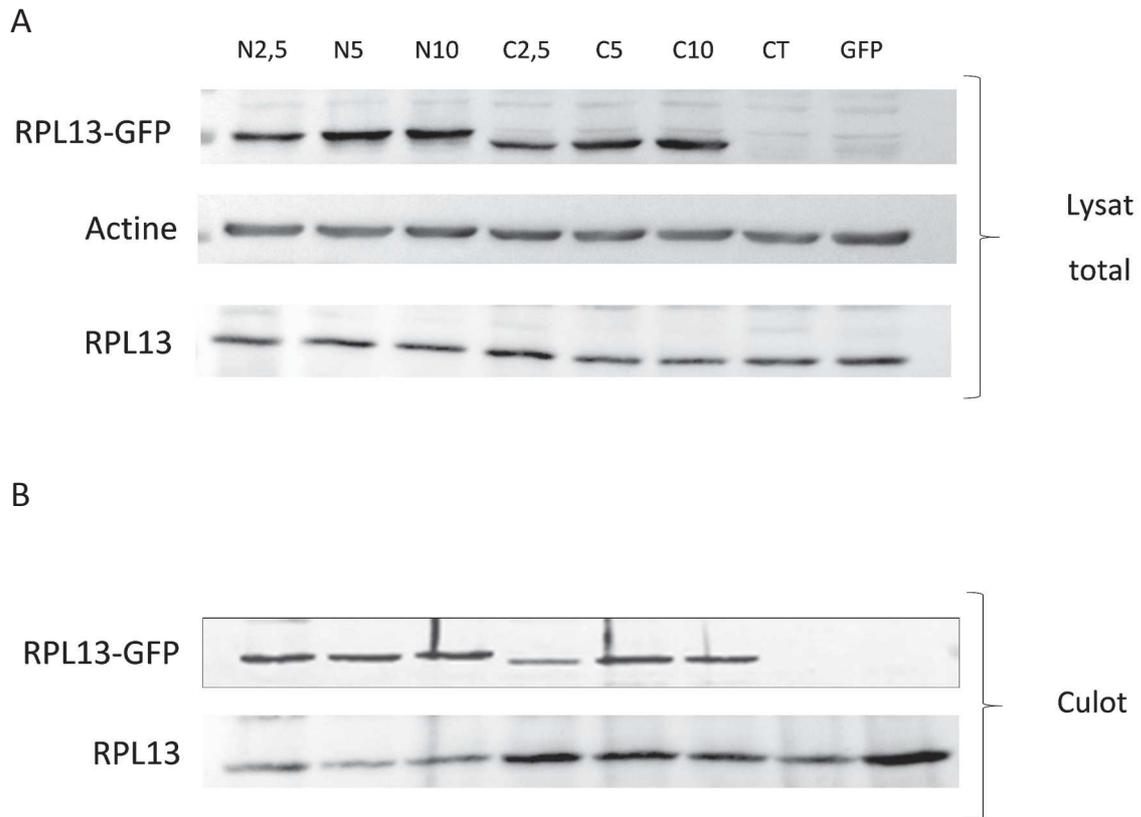
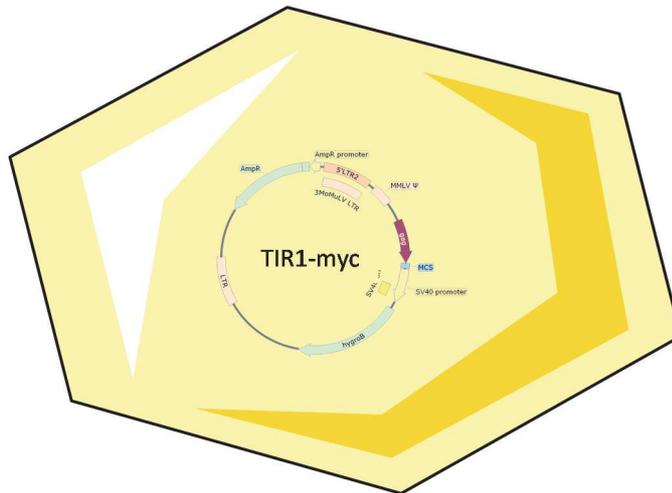


Figure 42 : La présence de l'étiquette GFP ne gêne pas l'intégration de RPL13 au sein du ribosome. Western blots dirigés contre RPL13 et réalisés après introduction des vecteurs peGFP-RPL13 de surexpression de RPL13 situé en N-terminal (N) ou C-terminal (C) de l'étiquette GFP à différentes concentrations (2.5µg, 5µg et 10µg). **(A)** sur le lysat cellulaire total ou **(B)** sur les culots issus de la sédimentation sur coussin de sucrose 30%. L'actine permet de contrôler la quantité de protéines.

A

Lignée parentale SW620 OsTir1-myc



B

Lignée mutante RPL13-AID-GFP

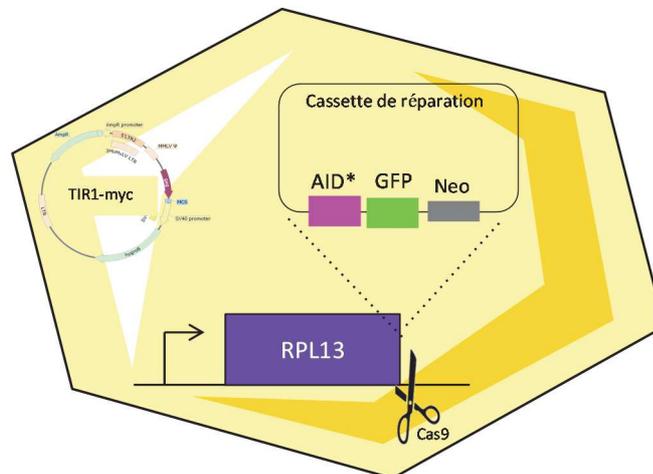


Figure 43 : Schéma de la construction de la lignée mutante SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP. (A) Dans un premier temps la lignée parentale a été générée par la transduction d'un vecteur lentiviral codant OsTIR1 et un gène de résistance à l'hygromycine. **(B)** Ensuite l'introduction simultanée dans la lignée parentale de la Nickase Cas9, des guides et de la cassette de réparation a permis de générer la lignée mutante AID.



Figure 44 : La lignée SW620 exprime de manière stable l'OsTIR1. Western blot dirigé contre c-Myc réalisé sur la lignée SW620 transduite avec le vecteur lentiviral codant OsTIR1 fusionnée à une étiquette c-Myc

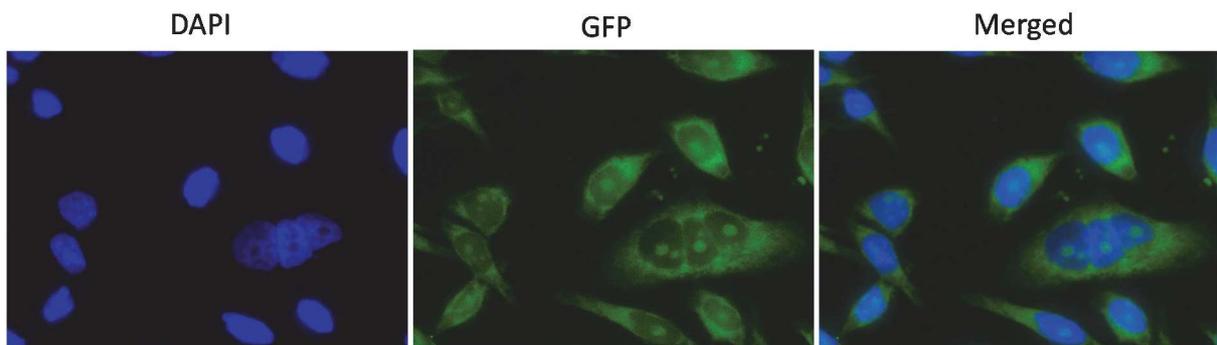


Figure 45 : La lignée SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP exprime la GFP au niveau réticulaire et des nucléoles. Image en microscopie de fluorescence (x64) des cellules SW620 exprimant RPL13-AID-GFP.

Ensuite, par le biais de l'outil CRIPR/Cas, nous avons introduit au niveau du codon stop du gène *RPL13* la cassette AID-GFP-Neo dans la lignée parentale SW620 OsTIR1.

Pour ce faire, nous avons fait synthétiser un plasmide (pUC57-Rc RPL13) contenant le bras d'homologie de part et d'autre du codon stop de RPL13. Cette séquence a ensuite été sous-clonée dans un plasmide (pUC57-AID-GFP-Neo) en amont des séquences AID-GFP-Neo ; nous avons ainsi obtenu notre plasmide donneur, contenant la cassette de réparation (pUC57-Rc RPL13-AID-GFP-Neo). Afin d'induire la recombinaison, nous avons introduit dans nos cellules SW620 OsTIR1, le plasmide donneur de manière concomitante avec les deux plasmides guide (pUC57-attBU6-sgRNA-Guide A et pUC57-attBU6-sgRNA-Guide B) et la Nickase Cas9.

Après sélection avec la néomycine, nous avons contrôlé par microscopie la présence et la localisation de la GFP, ainsi que la fonctionnalité du système (FIGURE 45). Parallèlement, nous avons sélectionné des clones et nous avons vérifié l'insertion de la cassette par PCR génomique.

Les images de microscopie de fluorescence indiquent la présence de la GFP au niveau des sites attendus, à savoir les nucléoles (lieu de biogenèse du ribosome) et le cytoplasme (marquage de type « réticulaire » typique des ribosomes).

Pour valider le système, nous avons ensuite traité nos cellules avec de l'auxine et nous avons contrôlé par le biais d'une analyse en microscopie de fluorescence et en cytométrie en flux la présence de la GFP (FIGURE 46).

Les images microscopiques réalisées à T0, 4h, 12h et 24h après traitement à l'auxine révèlent une perte de l'expression de la GFP au sein de nos cellules. Cette observation est confirmée par l'analyse en cytométrie en flux. De plus lorsque nous retirons l'auxine du milieu, la GFP redevient visible, le système est donc réversible (FIGURE 47).

Notre lignée SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP est fonctionnelle et réversible. Nous sommes en mesure de dégrader RPL13-GFP par l'addition d'auxine dans le milieu et de restaurer son expression en la retirant du milieu.

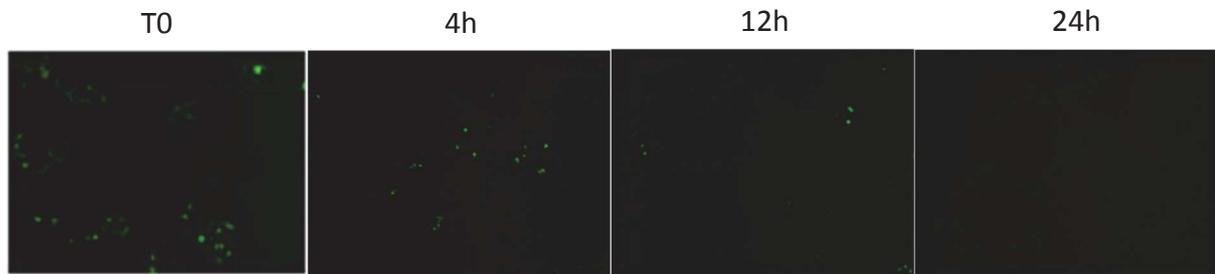


Figure 47 : Le traitement à l'auxine induit une perte de l'expression de la GFP. Images en microscopie de fluorescence (x10) réalisées en absence de traitement (T0) ou 4h, 12h et 24h après traitement à l'auxine de la lignée SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP.

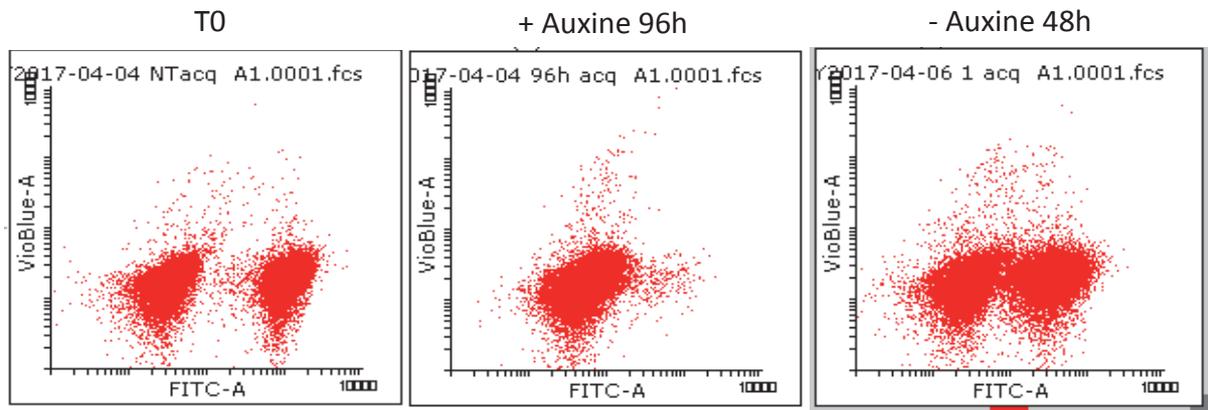


Figure 46 : Le système AID-GFP est réversible. Analyse par cytométrie en flux des cellules SW620 OsTIR1/RPL13-AID-GFP après traitement à l'auxine puis après avoir retiré l'auxine du milieu.

Avec l'outil CRISPR/Cas, la recombinaison homologue peut avoir lieu sur un bras ou sur les deux bras du chromosome cible. La réalisation d'une PCR génomique permet de vérifier comment s'est insérée la cassette, afin de pouvoir sélectionner les clones homozygotes.

Malheureusement, parmi les 22 clones testés, nous n'avons obtenu que des clones hétérozygotes. De nouvelles expériences pour établir des clones homozygotes sont actuellement en cours.

3. Discussion et conclusion

Les dérégulations de la machinerie traductionnelle, que ce soit d'un point de vue global ou spécifique, sont une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses. Au cours de ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'identification et à la caractérisation de protéines ribosomiques pouvant être impliquées dans la régulation traductionnelle et l'évolution du cancer colorectal. En nous basant sur des données de la littérature et des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire, notre intérêt s'est entre autres porté sur la protéine ribosomique RPL13. En effet, les niveaux de transcrits et de protéine RPL13 varient entre le tissu sain et le tissu tumoral, suggérant une flexibilité de son expression ainsi que son implication dans la carcinogenèse colorectale (Kobayashi *et al.*, 2006). Enfin, certaines études l'associent à des mécanismes de traduction localisée au niveau de sous-compartiments cellulaires (Shankar *et al.*, 2010).

Ces observations nous ont amenés à poser les questions suivantes :

- 1) RPL13 exerce-t-elle une influence sur le phénotype des cellules cancéreuses?
- 2) RPL13 intervient-elle dans la régulation traductionnelle ?

Pour répondre à ces questions, nous avons initialement entrepris d'inhiber cette protéine dans un modèle cellulaire de cancer colorectal par une approche de sh-RNA puis de si-RNA.

Dès la première semaine suivant l'introduction du sh-RPL13, nous avons pu observer des changements morphologiques notables et spécifiques à RPL13, caractérisés par l'apparition de prolongements ressemblant à des pseudopodes. Par une approche si-RNA, nous avons été en mesure de reproduire la formation de ces prolongements et de généraliser ce phénomène dans quatre lignées cellulaires : trois commerciales issues de cancers primitifs

(HCT116 et RKO) ou de métastases (SW620) ainsi que dans une lignée primaire établie au laboratoire (CRC1). Cette observation suggère qu'il pourrait exister un lien entre le niveau d'expression de RPL13 et la formation de prolongements membranaires, potentiellement impliqués dans l'adhésion et/ou la migration cellulaire ; cette hypothèse serait en accord avec son enrichissement précédemment observé dans les pseudopodes (Shankar *et al.*, 2010) et les prolongements des neurones (Moroz *et al.*, 2006). Pour l'heure nous n'avons pas été en mesure d'associer l'apparition de ce phénotype à des capacités migratoires particulières ; toutefois nous prévoyons de réaliser très prochainement des tests de migration en chambre de Bowden.

Nous avons également constaté que l'inhibition de RPL13 altère considérablement la viabilité cellulaire. D'une part, nous n'avons pas pu établir une lignée sh-RPL13 maintenant une inhibition importante et constante de l'expression de la protéine. D'autre part, le système d'inhibition transitoire médié par l'introduction d'un si-RPL13 induit une mortalité cellulaire au bout de 5 jours. Cette observation n'est pas surprenante, comme décrit dans la littérature, RPL13 semble essentielle à la maturation des ribosomes chez la levure (Pöll *et al.*, 2009) et son inhibition entraîne l'activation de la voie RP-MDM2-p53 dans une lignée cellulaire de mélanome, conduisant la cellule à l'apoptose (Kardos *et al.*, 2014). Cependant, dans la lignée SW620 que nous avons utilisée la protéine p53 est mutée. L'altération de la croissance et la mort de nos cellules semblent donc être liées à un autre mécanisme distinct de la voie p53. Compte tenu du temps nécessaire à l'activation de la mort cellulaire (près de 5 jours), et de l'effet sur la biogenèse des ribosomes mis en évidence par l'absence de la sous-unité 60S, nous pensons que la mortalité cellulaire fait suite à l'absence de synthèse protéique liée à la déplétion massive des ribosomes.

Nous avons réalisé une étude de l'activité traductionnelle globale par le biais de deux approches: la méthode SUnSET et le profil de polysomes. La méthode SUnSET couplée à l'utilisation de siRNA possédant une étiquette fluorescente nous a permis d'étudier spécifiquement l'activité traductionnelle au sein des cellules ayant intégré le si-RPL13. Cette étude nous indique que les cellules dans lesquelles RPL13 est inhibée continuent à traduire avec toutefois une baisse d'environ un tiers des niveaux de synthèse protéique en comparaison avec les populations contrôles. L'étude des profils de polysomes confirme ces résultats : l'absence de RPL13 entraîne une diminution du nombre de monosomes et de polysomes ainsi qu'une inhibition de la biogenèse de la sous-unité 60S. Cependant le ratio monosome/polysome est identique; or si ces cellules avaient été soumises à un stress

cellulaire nous aurions pu observer une augmentation de la fraction monosomale. En revanche, la formation de la sous-unité 40S n'est pas altérée et par conséquent celle-ci semble s'accumuler.

L'analyse par western blot de la composition du ribosome dans les différentes fractions ne semble pas indiquer l'existence de ribosomes en cours de traduction dans lesquels la protéine RPL13 ne serait pas présente. Toutefois, il peut s'agir d'une population minoritaire que nous ne sommes pas en mesure de détecter par la méthode que nous avons utilisée. De plus, il n'est pas exclu qu'il puisse exister des ribosomes fonctionnels sans RPL13, mais cette possibilité pourrait impliquer que RPL13 quitte le ribosome une fois la biogenèse correctement achevée; une sous-population de ribosomes dépourvus de RPL13, et traduisant activement pourrait alors être présente.

Parallèlement, RPL13 n'est pas visible dans les fractions libres à l'inverse de la protéine RPL22 qui semble quant à elle s'accumuler dans la fraction libre lorsque la formation de la sous-unité 60S est altérée. Le fait que nous n'ayons pas détecté RPL13 dans la fraction libre n'exclut pas la possibilité de fonctions extra-ribosomiques. En effet, cela pourrait être lié aux conditions de notre étude et, comme mentionné plus haut, RPL13 pourrait à l'instar de RPL13a (Mazumder *et al.*, 2003) être recruté en dehors du ribosome de manière conditionnelle suite à l'activation d'une signalisation spécifique. Une autre possibilité serait que RPL13 exerce une fonction extra-ribosomique dans le noyau, et dans ce cas nous ne pouvons la détecter dans la fraction libre. Les deux méthodes utilisées pour étudier la traduction globale suite à l'inhibition de RPL13 nous ont montré qu'il existe une traduction résiduelle. Celle-ci peut s'expliquer par le fait que les ribosomes soient stables et que leur temps de renouvellement est de quelques jours (4 à 5 jours) (Retz e Steele, 1980). De ce fait, 72h après l'introduction du si-RPL13, des ribosomes formés antérieurement, correctement assemblés et fonctionnels sont probablement toujours présents dans la cellule et capables de traduire. La question à laquelle nous tentons de répondre avec le ribosome profiling est justement de savoir ce que traduisent ces ribosomes résiduels. Les échantillons ont d'ores et déjà été séquencés et sont actuellement en cours d'analyse informatique.

Afin de permettre la caractérisation du rôle de RPL13 au sein du ribosome mature, il nous fallait donc être en mesure de contrôler finement l'expression de la protéine sur un temps très court permettant de préserver la formation de la sous-unité 60S afin d'éviter la mort cellulaire.

Nous avons donc entrepris de développer un système inductible, permettant de contrôler RPL13 au niveau de la protéine, de manière dose-dépendante et réversible. Nous espérons

avec ce système être en mesure de dégrader cette protéine ribosomique au sein même du ribosome fonctionnel.

Pour ce faire, nous avons eu recours au système révolutionnaire d'outil d'édition génique, appelé CRISPR Cas9. Ce système nous a permis d'insérer en fusion en C-terminal de la protéine endogène un dégron inductible à l'auxine ainsi qu'une étiquette fluorescente GFP.

Le système que nous avons établi semble fonctionnel et réversible ; en effet, nous avons pu observer en cytométrie de flux la présence de la GFP et en microscopie de fluorescence nous avons pu apprécier la localisation de cette GFP au niveau des sites attendus pour RPL13 (nucléolaire et réticulaire). L'ajout d'auxine nous a permis d'inhiber l'expression de RPL13-GFP au sein de nos cellules et celle-ci a été rétablie lors du retrait de l'auxine du milieu. Cependant, parmi tous les clones que nous avons établis, aucun n'a intégré le transgène de manière homozygote.

Il s'agit ici des tous premiers résultats ayant permis la validation de notre construction, et avant de pouvoir réaliser la caractérisation de RPL13 il nous reste encore quelques étapes à franchir. La première est l'obtention d'une lignée homozygote et celle-ci est actuellement en cours d'établissement. Ensuite, les premières expériences consisteront à inhiber progressivement RPL13 et à en évaluer l'effet sur la viabilité cellulaire, la traduction globale et le phénotype cellulaire. Parallèlement, nous l'inhiberons de manière drastique et sur des temps très court, puis nous isolerons les ribosomes afin de vérifier que RPL13 a bien été dégradée au sein des ribosomes correctement assemblés et fonctionnels, ensuite nous réaliserons un *ribosome profiling* pour apprécier les changements traductionnels spécifiques induit par cette déplétion.

Cette construction nous offrira donc la possibilité 1) de moduler finement l'expression d'une protéine ribosomique (10-20%) et d'en évaluer l'effet sur le phénotype, 2) de dépléter le ribosome fonctionnel d'une protéine ribosomique afin de caractériser son rôle dans la traduction tout en s'affranchissant de son implication dans la biogenèse.

Parallèlement à ces expériences, une analyse de la biogenèse du ribosome après inhibition de RPL13 est en cours. Cette étude nous permettra de confirmer par une autre approche le défaut de biogenèse que nous avons suspecté suite à l'analyse des profils de polysomes des lignées SW620 sh-RPL13.

Cette étude sur le rôle de RPL13 dans la tumorigénèse colorectale ouvre des perspectives d'exploration prometteuses. En effet, les résultats que nous avons obtenus suggèrent que RPL13 serait impliqué dans la morphologie des cellules de cancer colorectal et il paraît intéressant d'étudier une éventuelle corrélation entre ces changements morphologiques et le phénotype particulier des cellules cancéreuses. La déplétion de RPL13 semble létale pour nos cellules, et ce indépendamment du statut p53 ; nous avons pu relier cette observation à un défaut de traduction induit par une altération de la formation de la sous-unité 60S. Afin de comprendre à quel niveau cette altération intervient, nous avons entrepris une étude de la biogenèse des ribosomes en absence de RPL13. La létalité induite par la déplétion de RPL13 nous a conduit à développer un outil permettant de dégrader la protéine endogène et ce de manière dose-dépendante et réversible. Nous espérons avec cet outil pouvoir obtenir des ribosomes fonctionnels dépourvus de RPL13 ; cet outil pourrait permettre de révolutionner l'étude des protéines ribosomiques rendu délicate par la finesse de la régulation de la biogenèse des ribosomes.

La réalisation d'un transcriptome couplé à un *ribosome profiling* devrait nous permettre d'identifier des cibles impliquées dans les changements morphologiques observés mais également de mettre en lumière une régulation traductionnelle spécifique impliquant RPL13.

L'ensemble de ces données permettra, nous l'espérons, une meilleure compréhension du rôle joué par RPL13 dans la carcinogénèse colorectale.

PARTIE III : Etude du rôle de RPL22 dans un modèle de cancer colorectal

1. Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude de *RPL22* dans le contrôle traductionnel au cours de la tumorigénèse colorectale. Afin d'introduire les résultats obtenus dans ce 3^{ème} volet développé au cours de ma thèse, je vais vous présenter une brève revue de la littérature au sujet de *RPL22*.

1.1. Généralités sur RPL22

La protéine RPL22 est une petite protéine de 15KDa. C'est un composant externe de la grande sous-unité ribosomique 60S, au sein de laquelle elle est incorporée lors des stades tardifs de la biogenèse (Auger-Buendia *et al.*, 1979). Positionnée à distance de l'interface entre les sous-unités des ribosomes, elle est facilement extractible (FIGURE 48).

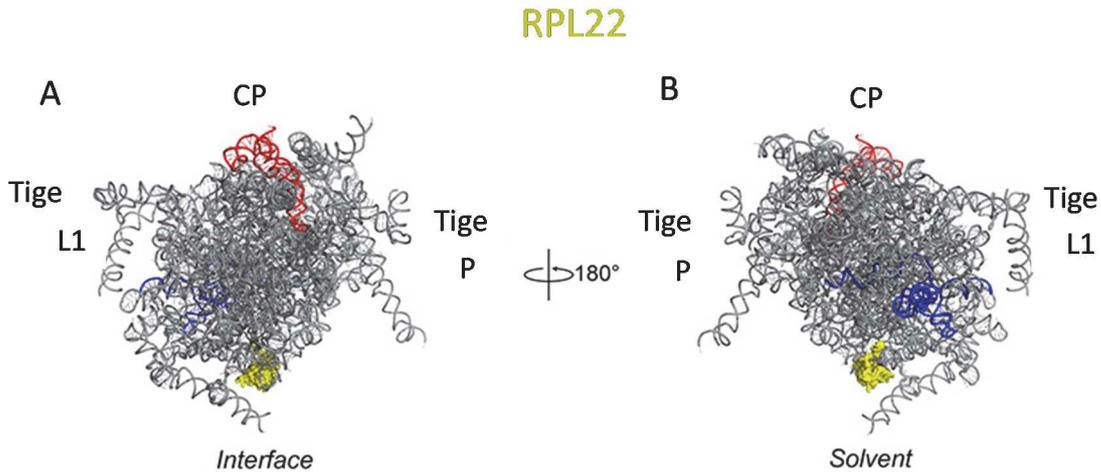


Figure 48: Modélisation 3D de la grande sous-unité ribosomique humaine faisant apparaître la position de RPL22 au sein du ribosome. (A) Vue de l'interface et (B) vue du solvant. La protéine RPL22 est représentée en jaune et les ARNr 5s, 5.8S et 28S sont représentés respectivement en rouge, bleu et gris. Sur la grande sous-unité nous retrouvons la protubérance centrale (CP), la tige L1 et la tige P.

A

```

Rpl22      MAPVKKLVAKGGKKKKQVLKFTLDCTHPVEDGIMDAANFEQFLQERIKVN
Rpl22L1    MAPQK-----DKKPKKSTWRFHLDLTHPVEDGIFDSGNFEQFLREKVKVN
*** *      . * * * . . : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * *

Rpl22      GKAGNLGGGVVTIERSKSKITVTSEVPFSKRYLKYLTKKYLKKNLNRDWL
Rpl22L1    GKTGNLG-NVVHIERLKNKITVVSEKQFSKRYLKYLTKKYLKKNLNRDWL
**:* * * * . * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rpl22      RVVANSKESYELRYFQINQDEEEEEDED
Rpl22L1    RVVASDKETYELRYFQISQDEEDGSESD
*** . . * * : * * * * * * * * * * . * * * : . * . * *
    
```

B

-RNA-binding

```

Rat_rpl22      .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Mouse_rpl22    .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Human_rpl22   .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Chicken_rpl22 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Zebrafish_rpl22 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Xenopus_rpl22 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..

Rat_rpl22L1   .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Mouse_rpl22L1 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Human_rpl22L1 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Chicken_rpl22L1 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Xenopus_rpl22L1 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
Zebrafish_rpl22L1 .. SKRYLKYLTKKYLKKN ..
    
```

Figure 49 : La protéine RPL22 possède une protéine paralogue RPL22L1. (A) L'alignement des séquences protéiques murines de RPL22 et RPL22L1 révèle la présence d'une région homologe correspondant au domaine de liaison à l'ARN. (B) L'alignement des séquences de RPL22 et RPL22L1 dans différentes espèces indique que cette région est très conservée.

Adaptées (A) de O'Leary et al. 2013 et (B) de Zhang et al. 2013

Certaines protéines ribosomiques possèdent des paralogues, provenant de la duplication d'un même gène ancestral ayant évolué différemment. Ces paralogues peuvent avoir des rôles identiques au sein du ribosome ou, dans certains cas, avoir des rôles spécifiques contribuant ainsi à l'hétérogénéité ribosomique. Ces rôles spécifiques peuvent être suggérés en particulier si un paralogue est exprimé préférentiellement dans certains tissus ou à certains stades du développement (Sugihara *et al.*, 2010), (Lopes *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014). Les protéines ribosomiques paralogues peuvent également avoir des fonctions extra-ribosomiques, et c'est le cas de la protéine RPL22-like 1 (RPL22L1) qui est le paralogue bien caractérisé de RPL22 (FIGURE 49A, B).

1.2. Les fonctions spécialisées de RPL22 et de son paralogue RPL22L1

RPL22 et RPL22L1 font partie des protéines ribosomiques pour lesquelles des fonctions extra-ribosomiques et spécialisées ont été clairement établies.

Bien qu'elle fasse partie intégrante du ribosome et qu'elle co-localise avec l'ARNr dans le nucléole et le cytoplasme (Shu-Nu *et al.*, 2000), RPL22 n'est pas nécessaire à la traduction des protéines *in-vitro* (Lavergne *et al.*, 1987; Lavergne *et al.*, 1988). Il semblerait qu'au-delà de ses fonctions au sein du ribosome et de son interaction avec l'ARNr 28S, RPL22 puisse interagir avec d'autres ARN. C'est le cas notamment des ARN viraux tel que celui du virus Epstein-Barr (EBER-1) (Dobbelstein e Shenk, 1995; Fok *et al.*, 2006; Houmani *et al.*, 2009) et celui du virus de l'hépatite C (HCV) (Wood *et al.*, 2001). RPL22 va également interagir avec d'autres ARN cellulaires, tel que celui de la télomérase humaine (hTR) lui suggérant un rôle possible dans la maturation de cet ARN, l'assemblage de la télomérase ou sa localisation cellulaire (Le *et al.*, 2000). Mais RPL22 possède encore d'autres fonctions, notamment celle de régulateur de la transcription ; en effet cette protéine a la capacité à se lier à la chromatine par l'intermédiaire des histones H1. Cette interaction a pour effet d'inhiber la transcription d'un sous-groupe de près de 700 gènes (Ni *et al.*, 2006).

Une étude menée chez la souris a également révélé que RPL22 a la capacité de contrôler l'expression de son paralogue RPL22L1 en inhibant la traduction de son ARNm. En effet, RPL22 va se lier à une structure en épingle à cheveux de l'ARNm de RPL22L1 pour inhiber directement sa traduction (O'leary *et al.*, 2013). En effet, la protéine RPL22 contient une hélice classique de liaison à l'ARN lui permettant d'interagir avec une structure secondaire

des ARN présentant un motif consensus, qui est identique sur l'ARN 28S, hTR, EBER-1 et RPL22L1 (O'leary *et al.*, 2013) (FIGURE 49B).

Cette hélice de liaison à l'ARN est également retrouvée chez son paralogue RPL22L1 (FIGURE 49B), et il a été montré dans un modèle zebrafish que Rpl22 et Rpl22l1 jouaient des rôles antagonistes dans l'hématopoïèse via cette capacité à se lier à l'ARN. En effet, ces deux protéines vont être capables d'interagir avec la région 5'UTR de l'ARNm de *smad1* pour contrôler sa traduction ; le transducteur de signal et facteur de transcription *smad1* est un effecteur majeur de la voie *bone morphogenic protein* (BMP), impliqué entre autre dans l'hématopoïèse (McCreynolds *et al.*, 2007). Dans ce processus, Rpl22 va jouer un rôle répressif alors que Rpl22l1 va au contraire s'opposer à cette répression. Trois cas de figure sont alors envisageables : 1) si l'expression de Rpl22 et Rpl22l1 est équilibrée, l'émergence des cellules souches hématopoïétiques va avoir lieu normalement, 2) si Rpl22 domine, Smad1 est réprimé bloquant ainsi l'hématopoïèse et induisant une anémie, 3) dans le cas où Rpl22l1 est majoritaire, l'émergence des cellules souches hématopoïétiques devient incontrôlée et il en résulte une prédisposition à la transformation cellulaire (Zhang *et al.*, 2013).

Plus récemment, un mécanisme similaire a été mis en évidence dans la morphogénèse du zebrafish (Zhang *et al.*, 2017). Dans ce contexte, Rpl22 et Rpl22l1 jouent également des rôles antagonistes en contrôlant la gastrulation via l'épissage du pré-messager de Smad2, effecteur majeur de la voie de signalisation Nodal/TGF- β . Au cours de la gastrulation, Rpl22 se lie aux introns du pré-ARNm de *smad2* pour induire le saut de l'exon 9. Cette action est contrée par son paralogue Rpl22l1 qui lui va au contraire favoriser l'inclusion de l'exon 9 dans le transcrit mature.

Différentes études ont permis de déterminer les profils d'expression de ces deux protéines, et ceux-ci diffèrent en fonction du tissu considéré. Par exemple, chez *D. melanogaster* alors que RPL22 est exprimée de manière ubiquitaire, RPL22L1 semble exprimée exclusivement dans les gonades embryonnaires ainsi que dans les cellules souches ovariennes et germinales adultes (Kai *et al.*, 2005; Shigenobu, Arita, *et al.*, 2006; Shigenobu, Kitadate, *et al.*, 2006).

Parallèlement, bien que RPL22 soit exprimée de manière ubiquitaire, les souris déficientes pour Rpl22 (Rpl22^{-/-}) sont viables, mais présentent une altération sélective du développement de la lignée de lymphocytes T $\alpha\beta$ (Anderson *et al.*, 2007). De plus, l'absence de Rpl22 entraîne une augmentation compensatoire de l'expression de son paralogue

Rpl22l1 et celui-ci est intégré au sein des ribosomes actifs sans que la traduction globale ne soit altérée.

Ces observations démontrent que l'équilibre d'expression entre RPL22 et RPL22L1 est fondamental pour de nombreux processus physiologiques. Par ailleurs, ces deux protéines paralogues possèdent des fonctions spécialisées et elles sont également impliquées dans le contrôle traductionnel à certains stades du développement ou dans certains types cellulaires. Enfin, d'un point de vue pathologique, elles semblent également jouer un rôle antagoniste et fondamental dans les processus tumoraux.

1.3. Implications de RPL22 et RPL22L1 dans la tumorigénèse

De nombreuses études font état d'altérations de l'expression de RPL22 dans différents types de cancers. L'expression de RPL22 est notamment diminuée dans les leucémies lymphoblastiques aiguës (O'leary *et al.*, 2013), les carcinomes invasifs du sein (Finak *et al.*, 2008) et dans les adénocarcinomes pulmonaires (Bhattacharjee *et al.*, 2001; Yang, M. *et al.*, 2013). Dans le cadre des leucémies aiguës, une analyse d'échantillons issus de patients a révélé la présence d'altérations génétiques monoalléliques et focales de *RPL22* chez certains patients atteints de maladies agressives et récidivantes. Afin de confirmer cette observation, les auteurs de cette étude ont développé un modèle murin de leucémie à cellules T présentant une haploinsuffisance de Rpl22 (*Rpl22^{+/-}*). Il semblerait que le développement des leucémies soit accéléré chez les souris déficiente pour Rpl22, ce qui suggère que la perte de RPL22 pourrait aussi être un facteur d'agressivité dans la pathologie humaine.

Des mutations de RPL22 ont également été répertoriées dans les cancers de l'endomètre et du côlon avec une instabilité des microsatellites (Novetsky *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014). Une étude comparative, menée sur des échantillons de tumeurs de patientes atteintes de cancer de l'endomètre, a permis de révéler la présence de mutation de *RPL22*. En effet, 52% des tumeurs avec MSI présentaient une délétion d'un nucléotide unique au niveau de l'exon 2 du gène *RPL22* et, parallèlement, aucune mutation n'a été identifiée dans les tumeurs avec microsatellites stables (MSS) (Novetsky *et al.*, 2013). Dans le cancer du côlon, la fréquence de ces mutations au sein des échantillons analysés atteint le taux de 77%. Toutes les mutations observées sont hétérozygotes et la plupart correspondent à la délétion d'une base aboutissant à la formation de protéines tronquées (Ferreira *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces données suggère que RPL22 pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur, qui serait aboli dans le cas d'une haploinsuffisance. Une étude menée chez la souris a permis de révéler la base d'un mécanisme sous-jacent (Rao *et al.*, 2012). Les auteurs ont étudié les transcrits issus de lignées cellulaires de fibroblastes murins embryonnaires immortalisées (MEF) dans lesquelles l'expression de Rpl22 a été inhibée. Parmi les gènes les plus dérégulés, Lin28B présente une expression près de vingt fois supérieure à celle des cellules contrôles. Lin28B est une protéine de liaison à l'ARN enrichie dans les cellules souches, mais également fortement exprimée dans les tumeurs humaines et dans diverses lignées cellulaires cancéreuses. Cette étude suggère alors que l'inactivation de Rpl22 entraîne la transformation cellulaire par l'activation de Lin28.

Ces études se focalisent principalement sur les dérégulations de RPL22, or comme précédemment abordé, la diminution d'expression de RPL22 s'accompagne d'une augmentation compensatrice de RPL22L1. Dans le cadre de l'hématopoïèse, les transformations cellulaires en lien avec l'augmentation d'expression de Rpl22L1 ont été suggérées (Zhang *et al.*, 2013). D'autre part, le gène codant pour RPL22L1 a été identifié sur un chromosome minuscule double, *double minute chromosome* (DM) ; ces DM jouent un rôle majeur dans la carcinogenèse puisqu'ils sont fréquemment le siège d'amplification de nombreux oncogènes. Cette observation a été à l'origine d'une étude visant à étudier l'implication de RPL22L1 dans les cancers ovariens dans lesquels l'expression de RPL22L1 est fortement corrélée à l'invasion et à la présence de métastases (Wu *et al.*, 2015). L'implication de RPL22L1 dans les processus métastatiques a été évaluée *in-vivo* et *in-vitro*, et il ressort de cette étude que sa surexpression induit une augmentation de l'invasion et de la migration, alors que son inhibition produit l'effet inverse. L'analyse de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux suggère que l'augmentation de RPL22L1 pourrait participer activement à la transition épithélio-mésenchymateuse dont dépendent au moins partiellement les processus métastatiques.

Il apparaît clair que les protéines RPL22 et RPL22L1 jouent des rôles essentiels dans les mécanismes de régulation cellulaire dans des contextes aussi bien physiologiques que pathologiques. Le fait qu'individuellement ces deux protéines ne soient pas essentielles pour la synthèse protéique renforce l'idée selon laquelle ces régulations puissent être le fait de fonctions extra-ribosomiques ; et c'est ce que les études menées jusqu'à présent suggèrent.

Dans cette étude, nous proposons d'étudier le rôle de RPL22 dans la carcinogenèse colorectale. Nous ferons varier l'équilibre d'expression de ces deux protéines et nous

en évaluerons les conséquences phénotypiques. Nous chercherons également à mettre en évidence des mécanismes de contrôle traductionnel exercés par RPL22 lors des étapes clés de la tumorigenèse colorectale. Pour ce faire, nous réaliserons une étude transcriptomique ainsi qu'un *ribosome profiling*.

2. Résultats

Afin d'étudier le rôle de RPL22 dans la carcinogenèse colorectale, ainsi que son éventuelle implication dans le contrôle traductionnel, nous avons inhibé son expression dans deux lignées de cancer colorectal commercialisées par l'ATCC : une lignée non métastatique (HCT116) et une lignée métastatique (SW620). Après avoir validé notre modèle, nous avons réalisé différentes expériences de caractérisation phénotypique nous permettant d'évaluer une possible implication de RPL22 dans l'acquisition de propriétés oncogéniques, dont certaines propres aux cellules souches cancéreuses. Par la suite, nous avons évalué l'effet de cette déplétion sur la traduction d'un point de vue global et spécifique. Nous avons également réalisé une étude transcriptomique nous permettant d'identifier d'éventuelles modifications des transcrits en lien avec l'inhibition de RPL22.

2.1. La diminution d'expression de RPL22 entraîne une augmentation de l'expression de son paralogue RPL22L1

Nous avons opté pour une approche par shRNA nous permettant d'établir une lignée stable dans laquelle l'expression de RPL22 serait inhibée de façon permanente.

Les cellules SW620 et HCT116 ont été transduites à l'aide d'un vecteur lentiviral (Decipher shRNA Lentiviral Vector pRS19-U6-(sh)-Ubc-TagRFP-2A-Puro) contenant une séquence ciblant l'ARNm de *RPL22*. La construction que nous avons utilisée possède également un gène de résistance à la puromycine ainsi qu'un gène rapporteur codant pour la *red fluorescent protein* RFP, ces deux éléments nous permettent ainsi de contrôler l'intégration et l'expression de notre transgène. Afin de ne pas avoir recours à l'utilisation biaisée d'antibiotiques pour la sélection de nos cellules, nous avons sélectionné la population exprimant le plus fortement la RFP par la réalisation de trois tris cellulaires successifs par cytométrie en flux. Nous avons ainsi généré une lignée SW620 sh-RPL22, une lignée HCT116 sh-RPL22 ainsi que deux lignées contrôles SW620 sh-Ctrl et HCT116 sh-Ctrl.

La répression de RPL22 a été évaluée à la fois par RT-qPCR et par une analyse en western blot.

Suite à l'insertion du sh-RPL22 dans les lignées SW620 et HCT116, et après sélection des cellules exprimant le plus fortement la RFP, nous avons constaté une diminution de l'expression de RPL22. Dans la lignée SW620 sh-RPL22, l'ARNm est diminué de 64% et la protéine de 30% par rapport à la lignée contrôle (FIGURE 50A, B). Dans la lignée HCT116 sh-RPL22, nous avons constaté une diminution significative de l'expression de la protéine de 49% (FIGURE 50C).

Parallèlement, nous avons cherché à savoir, si dans notre modèle d'étude, l'expression de RPL22L1 était augmentée lorsque RPL22 était réprimée. Les données que nous avons obtenues indiquent que la diminution d'expression de RPL22 est associée à une augmentation significative de son paralogue RPL22L1. En effet, dans la lignée SW620 sh-RPL22, l'ARNm est augmenté de 11.5 et la protéine de 4.4 fois par rapport à la lignée contrôle (FIGURE 50 A, B). Dans la lignée HCT116 sh-RPL22, nous avons également constaté une augmentation significative de l'expression de la protéine de 3.6 fois (FIGURE 50C).

Nous avons donc validé notre modèle d'étude en confirmant que, dans les lignées cellulaires SW620 et HCT116, **la diminution d'expression de RPL22 est associée à une augmentation significative de l'expression de son paralogue RPL22L1.**

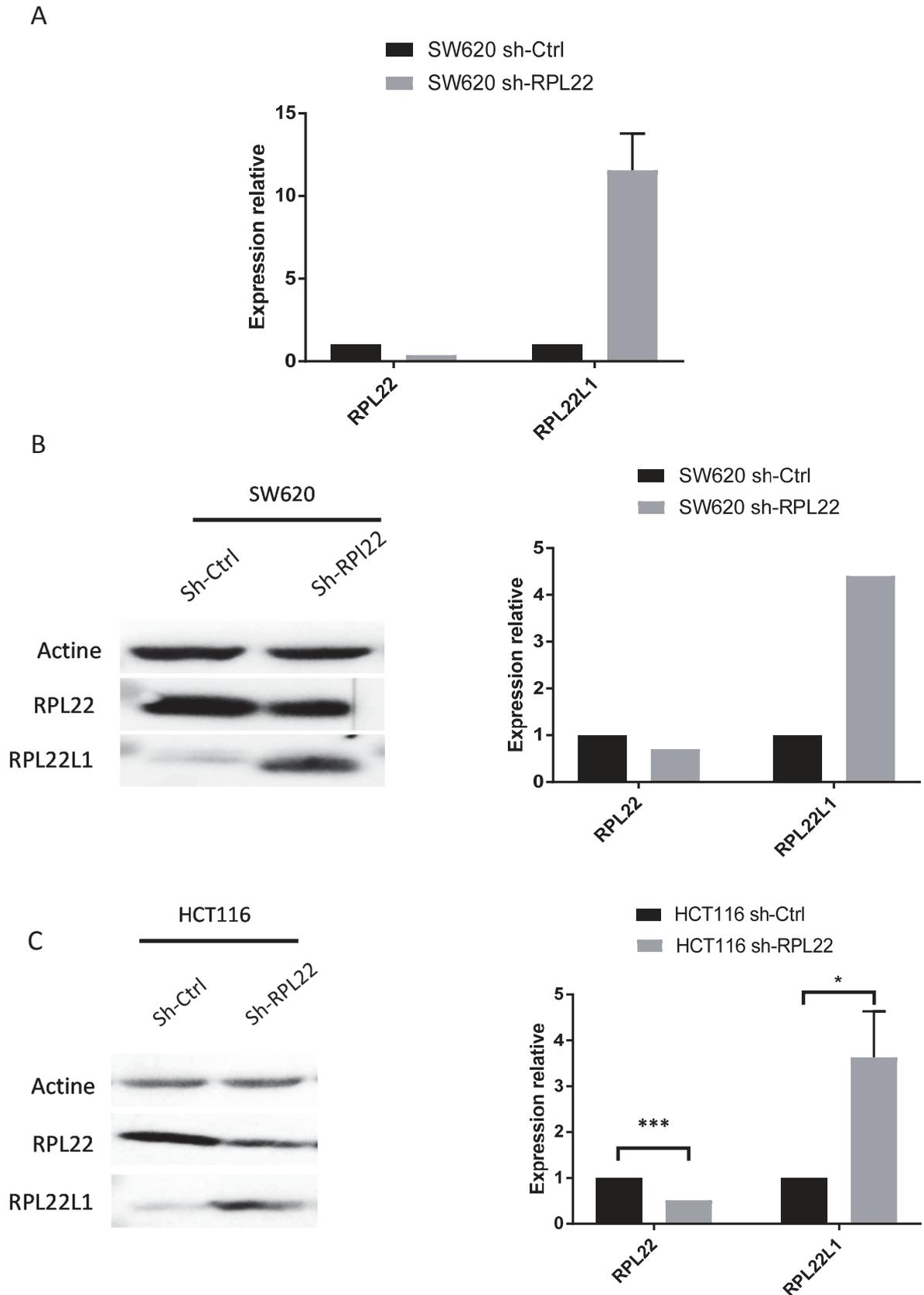


Figure 50 : L'introduction du sh-RPL22 dans la lignée SW620 induit une diminution de l'expression de RPL22 associée à une augmentation significative de l'expression de RPL22L1. **(A)** Analyse par RT-qPCR de l'expression de *RPL22* et *RPL22L1* dans la lignée SW620 après normalisation par rapport à l'actine et analyse par western blot dirigé contre RPL22 et RPL22L1 **(B)** dans la lignée SW620 sh-RPL22 et **(C)** dans la lignée HCT116 sh-RPL22 n=3 dans chaque groupe. Les valeurs moyennes sont indiquées, les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Unpaired t-test). Les lignées sh-Ctrl servent de contrôle et l'actine permet de contrôler la quantité de protéines.

2.2. La diminution d'expression de RPL22 n'affecte pas la prolifération des cellules en condition adhérente

Afin d'évaluer l'effet du changement d'expression de ces protéines ribosomiques sur la prolifération des cellules SW620 et HCT116, nous avons utilisé le système xCELLigence sur une période de 72h.

Comme le montre les figures, les cellules SW620 (FIGURE 51A) et HCT116 (FIGURE 51B) exprimant le sh-RPL22 présentent une courbe de croissance identique à leur contrôle respectif exprimant le sh-Ctrl.

Nous pouvons donc conclure que, dans les lignées cellulaires SW620 et HCT116, **la prolifération des cellules en condition adhérente n'est pas affectée par la modification d'expression de RPL22 et RPL22L1.**

2.3. La diminution d'expression de RPL22 n'affecte pas les capacités d'auto-renouvellement des cellules

Ensuite, les cellules SW620 sh-RPL22 ont été mises en culture en condition non adhérente afin d'évaluer leur capacité à former des sphères. En effet, le modèle de culture des cellules en suspension permet d'évaluer la prolifération et la survie des cellules souches cancéreuses.

Deux semaines après mise en culture en suspension des cellules SW620 sh-RPL22 nous avons évalué le nombre et la taille des sphères, et nous les avons comparé au contrôle (FIGURE 52). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre la condition test et la condition contrôle.

La capacité à former des sphères et la prolifération en condition non adhérente des cellules SW620 ne semblent pas être altérées par l'inhibition de RPL22.

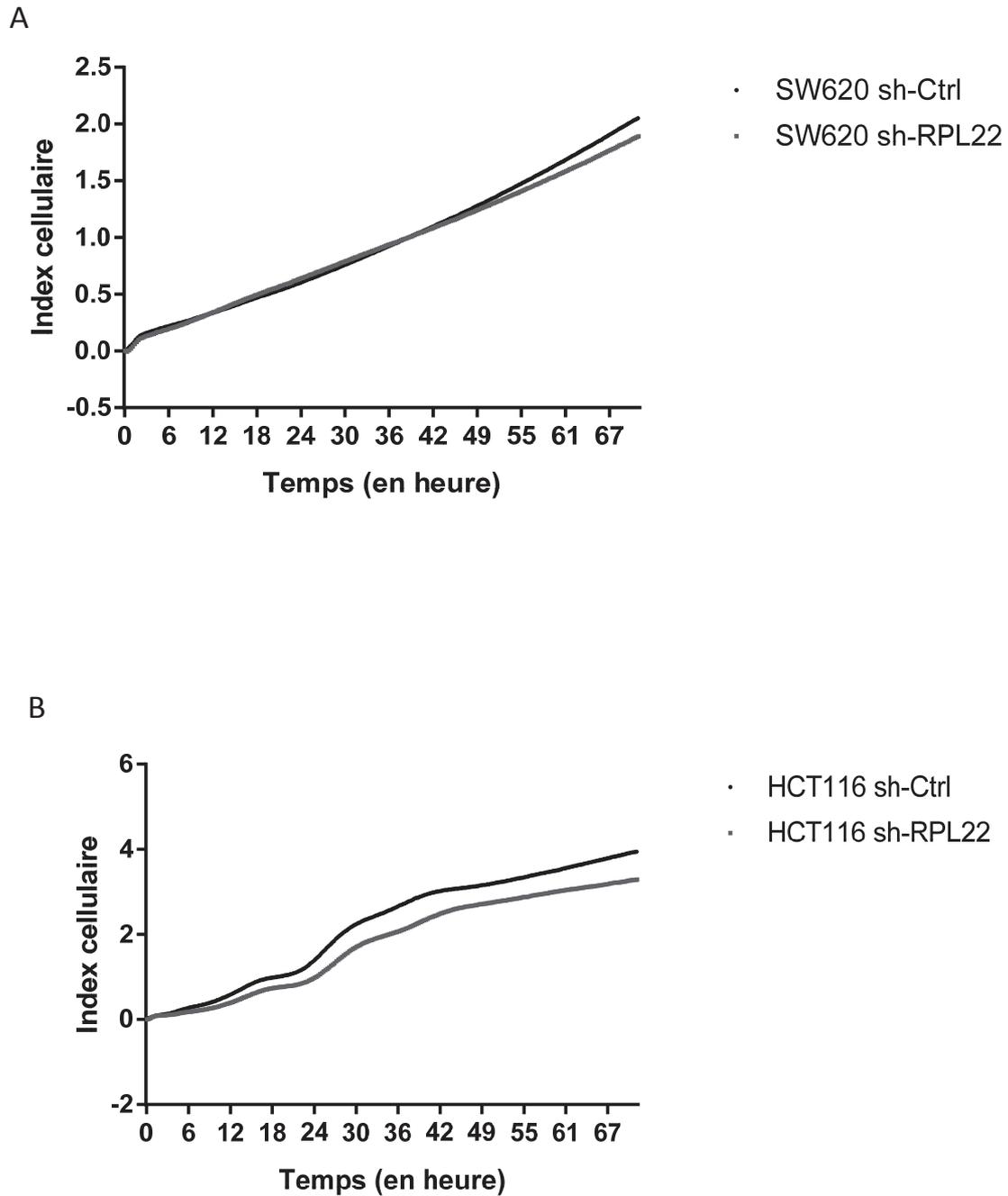


Figure 51 : La diminution d'expression de RPL22 associée à l'augmentation d'expression de RPL22L1 n'affecte pas la prolifération des cellules en condition adhérente. L'index cellulaire a été mesuré durant 72h sur le système Xcelligence (A) pour la lignée SW620 sh-RPL22 et (B) pour la lignée HCT116 sh-RPL22. Les lignées sh-Ctrl servent de contrôle. n=3 dans chaque groupe.

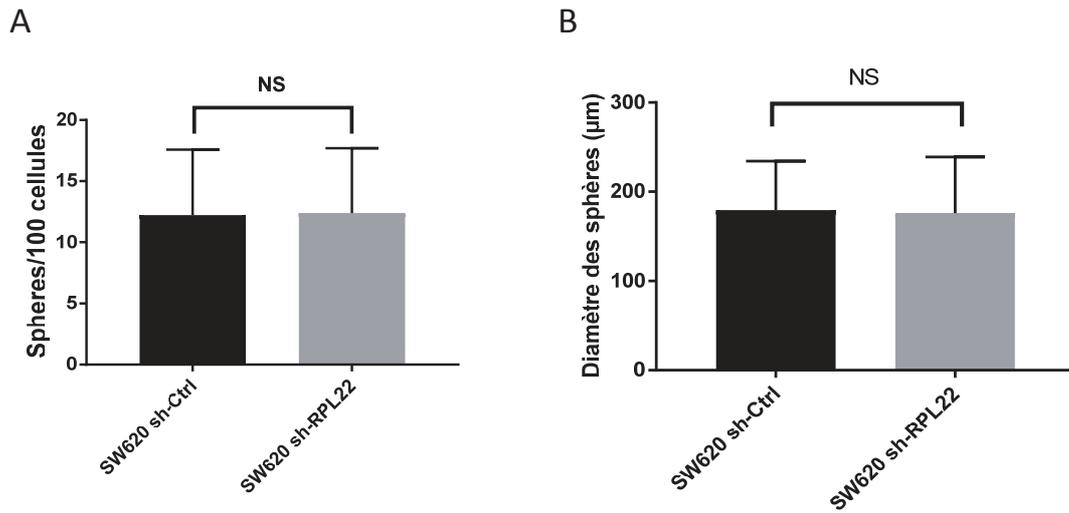


Figure 52 : L'introduction du sh-RPL22 dans la lignée SW620 n'affecte ni la capacité des cellules à former des sphères ni la prolifération de ces cellules en suspension. Les cellules SW620 sh-RPL22 et sh-Ctrl ont été ensemencées à la densité de 1 cellule/µl, en milieu appauvri et en condition non adhérente. Deux semaines plus tard, le nombre et la taille des sphères ont été évalués. n=3 dans chaque groupe. Les valeurs moyennes sont indiquées, les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). La lignée sh-Ctrl sert de contrôle.

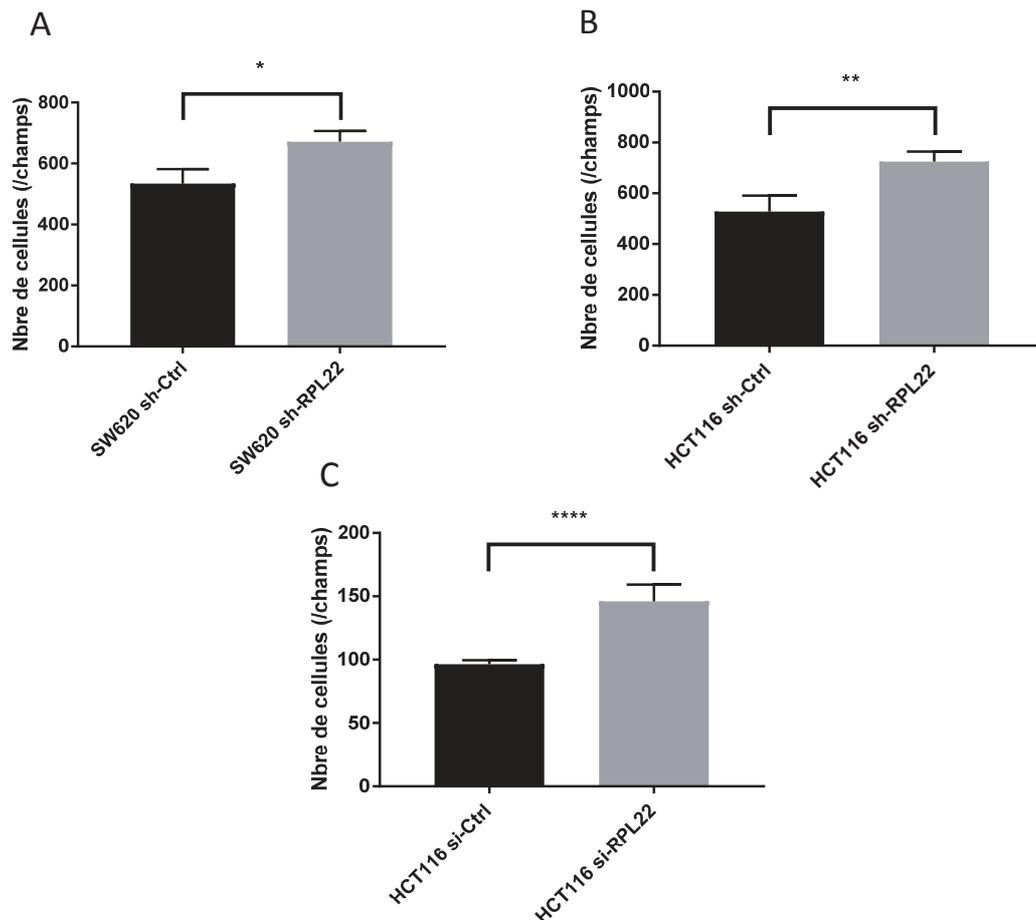


Figure 53 : L'inhibition de RPL22 augmente significativement les capacités migratoires des cellules SW620 et HCT116. Test de migration en chambre de Bowden réalisé (A) dans la lignée SW620 sh-RPL22 (B) dans la lignée HCT116 sh-RPL22 et (C) dans la lignée HCT116 72h après l'introduction du si-RPL22 ou du si-Ctrl. n=4 dans chaque groupe et pour chaque expérience. Les valeurs moyennes sont indiquées, les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 (Mann-Whitney) Les lignées sh-Ctrl et si-Ctrl servent de contrôle.

2.4. La diminution de RPL22 augmente les capacités migratoires et l'expression de marqueurs mésenchymateux

Afin d'évaluer les capacités migratoires des lignées SW620 sh-RPL22 et HCT116 sh-RPL22, nous avons réalisé un test de migration en chambre de Boyden. Nous avons également complété ces expériences par la réalisation de ce même test mais cette fois-ci en ayant inhibé RPL22 de manière transitoire à l'aide de siRNA. Le siRNA nous permet d'obtenir une diminution massive de l'expression de RPL22 tout en nous permettant d'initier les expériences dans un délai court suivant l'inhibition. Nous avons introduit dans la lignée HCT116 un siRNA ciblant RPL22 (HCT116 si-RPL22) ou un siRNA contrôle (HCT116 si-Ctrl). 72h après la transfection nous avons réalisé un test migratoire en chambre de Boyden.

Dans les deux lignées, et quelque soit l'approche utilisée, l'inhibition de RPL22 augmente de manière significative les capacités migratoires des cellules testées ; cependant, ce phénotype semble plus marqué dans la lignée HCT116-siRPL22 (FIGURE 53).

Nous avons alors cherché à savoir si cette augmentation était associée à l'expression d'un marqueur d'un phénotype mésenchymateux tel que la vimentine, dont l'expression est fréquemment induite lors de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Nous avons donc réalisé une RT-qPCR 72h après l'intégration du si-RPL22 et nous avons quantifié l'expression de RPL22, RPL22L1 et de la vimentine. L'expression de l'ARNm codant pour la vimentine est significativement augmentée dans les cellules ayant intégré le si-RPL22 par rapport à la condition contrôle (FIGURE 54).

L'inhibition de RPL22 entraîne une augmentation des capacités migratoires ainsi qu'une induction de l'expression d'un marqueur associé au phénotype mésenchymateux.

2.5. La diminution d'expression de RPL22 n'a pas d'effet sur la traduction globale

Pour étudier l'effet de cette déplétion sur la traduction globale, nous avons réalisé un profil de polysome sur les lignées SW620 sh-RPL22 et HCT116 sh-RPL22.

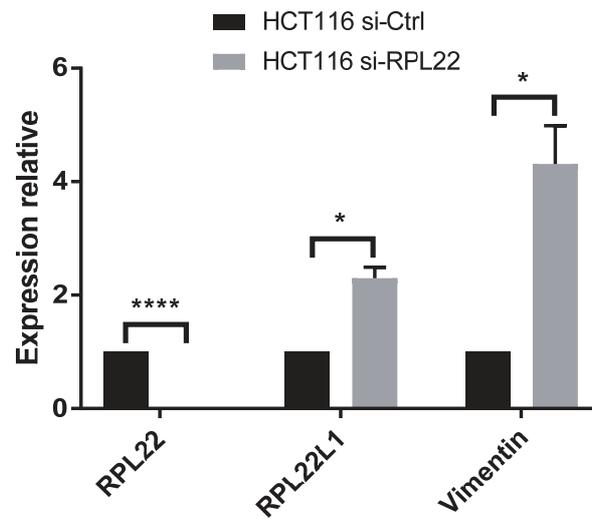


Figure 54 : L'inhibition de RPL22 associée à l'augmentation de RPL22L1 augmente significativement l'expression de la vimentine. Analyse par RT-qPCR de l'expression de RPL22, RPL22L1 et de la vimentine dans la lignée HCT116 si-RPL22 72h après l'introduction du si-RPL22 et après normalisation par rapport à l'actine. n=2 dans chaque groupe. Les valeurs moyennes sont indiquées, les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD) *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 (Unpaired t-test). La lignée HCT116 si-Ctrl sert de contrôle.

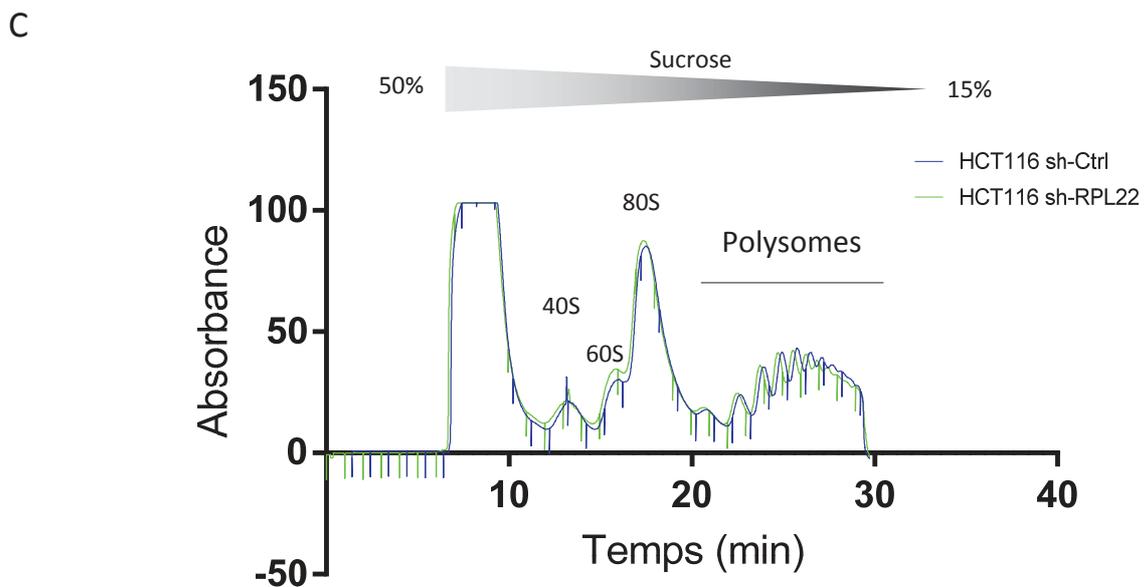
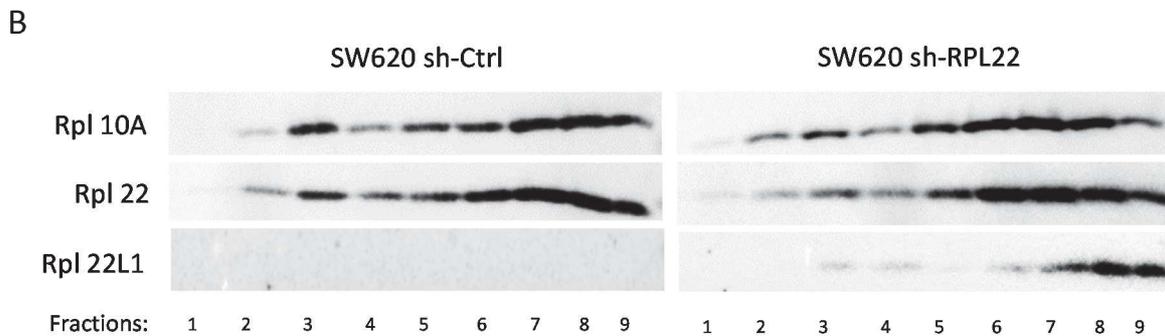
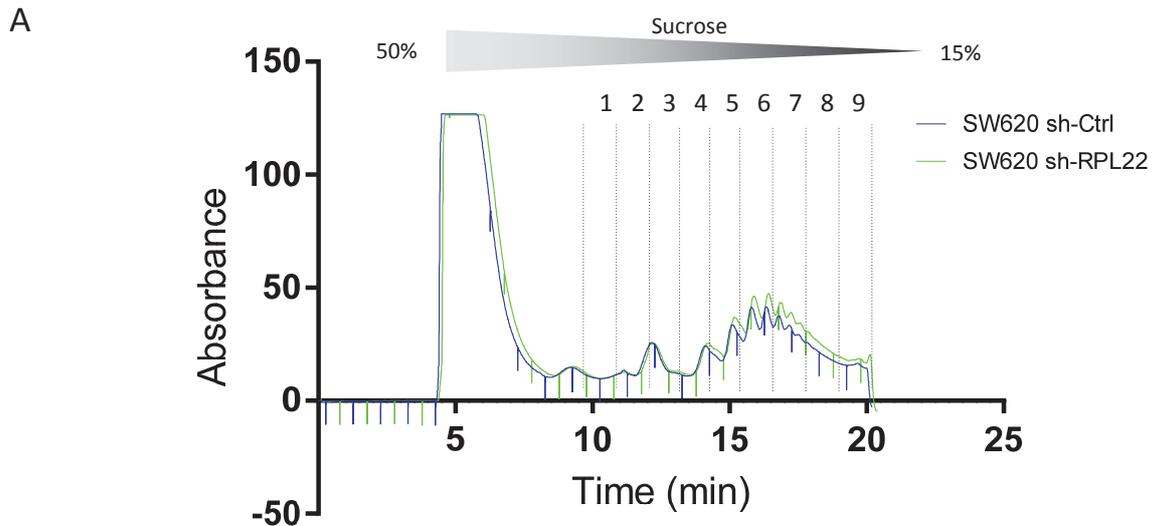


Figure 55 : Profil de polysome sur les lignées SW620 sh-RPL22 et HCT116 sh-RPL22. L'inhibition de RPL22 dans les lignées SW620 et HCT116 n'entraîne aucune modification du profil de polysomes. RPL22L1 est intégré dans les ribosomes en cours de traduction dans les lignées sh-RPL22. (A) Profil de polysomes réalisé sur la lignée SW620 sh-RPL22. (B) Western blot réalisé sur les fractions polysomales et dirigé contre RPL22 et RPL22L1. RPL10 sert de contrôle. (C) Profil de polysomes réalisé sur la lignée HCT116 sh-RPL22 (représentatif de n=3 expériences). Les lignées SW620 sh-Ctrl et HCT116 sh-Ctrl servent de contrôle.

L'étude des profils de polysomes réalisée sur les deux lignées cellulaires SW620 sh-RPL22 et HCT116 sh-RPL22 nous permet de confirmer que dans notre modèle d'étude, la déplétion de RPL22 n'a aucun impact sur l'activité globale de la traduction. La réalisation d'un western blot sur les différentes fractions polysomales nous indique que RPL22 est présente dans les fractions 60S, 80S et polysomales, et son expression dans la lignée sh-RPL22 n'est que faiblement altérée. Comme nous pouvons le voir, RPL22L1 co-sédimente avec les fractions 60S, 80S et les polysomes, ainsi que dans les fractions libres (données non présentées).

Cette observation suggère que RPL22L1 est intégrée au sein du ribosome et qu'elle est également présente dans la fraction libre lorsque l'expression de RPL22 est diminuée.

L'inhibition de RPL22 n'a aucun effet sur l'activité traductionnelle globale. De plus, RPL22L1 est présente au sein des ribosomes traduisant de manière active ainsi que dans la fraction libre.

La prochaine étape consiste à étudier le rôle de RPL22 dans la régulation de l'expression génique et notamment la traduction. Pour cela deux types d'échantillons ont été préparés :

1) les extraits totaux d'ARN issus des lignées HCT116 sh-RPL22 et HCT116 sh-Ctrl, à partir desquels une analyse de transcriptome par séquençage haut-débit sera réalisée (Illumina High-seq 2500). Nous avons choisi de réaliser ce séquençage en « paired-end » sur 2x125 paires de bases afin d'être en mesure d'analyser les réarrangements d'épissage,

2) les ARN issus des fractions monosomales et polysomales pour une analyse par *ribosome profiling*. Les fragments d'ARNm protégés par les ribosomes, *ribosomes protected fragment* (RPF) ont été purifiés, amplifiés, séquencés (single end, 50bp) et sont actuellement en cours d'analyse.

3. Discussion et conclusion

Dans ce projet nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'identification et la caractérisation de protéines ribosomiques pouvant être impliquées dans les différentes étapes de la carcinogenèse colorectale. La protéine RPL22 et son paralogue RPL22L1 représentent un modèle d'étude idéal nous permettant d'évaluer la possibilité d'un contrôle traductionnel dans le cancer du côlon.

En effet, la littérature fait état d'une expression compensatrice de RPL22L1 lorsque RPL22 est diminuée. De plus, ce paralogue a la capacité à s'intégrer dans le ribosome sans que la traduction globale n'en soit altérée (O'leary *et al.*, 2013). Parallèlement, les études menées sur RPL22 et RPL22L1 suggèrent que ces deux protéines occupent des rôles antagonistes dans différents processus physiologiques et pathologiques (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Dans le cas du cancer, des mutations de RPL22 sont fréquemment retrouvées, la plupart du temps il s'agit de mutation ponctuelle et hétérozygote aboutissant à la formation de protéines tronquées (Ferreira *et al.*, 2014). Les études suggèrent que RPL22 occuperait une fonction du suppresseur de tumeur, alors que son paralogue serait plutôt impliqué dans l'évolution tumorale, par sa capacité à soutenir les processus migratoires (Wu *et al.*, 2015).

L'étude des transcrits de RPL22 et de RPL22L1 dans des échantillons issus de tumeurs de patients atteints de cancer du côlon indique également une augmentation drastique de l'expression de RPL22L1 en comparaison avec le tissu sain adjacent ; cependant l'expression de l'ARNm de RPL22 ne semble pas varier (FIGURE 56). Cette observation n'exclut toutefois pas la possibilité d'une diminution de l'expression de RPL22 au niveau de la protéine.

L'ensemble des études menées sur ces deux protéines se focalisent exclusivement sur leurs fonctions extra-ribosomiques. En effet, en tant que protéines de liaison à l'ARN, elles ont la capacité à exercer un contrôle post-transcriptionnelle en se liant avec des ARNm possédant des structures tiges-boucles, spécifiquement reconnues par leur hélice de liaison (Fahl *et al.*, 2015). Au-delà de cette fonction, RPL22 a également été associée à la régulation transcriptionnelle (Ni *et al.*, 2006).

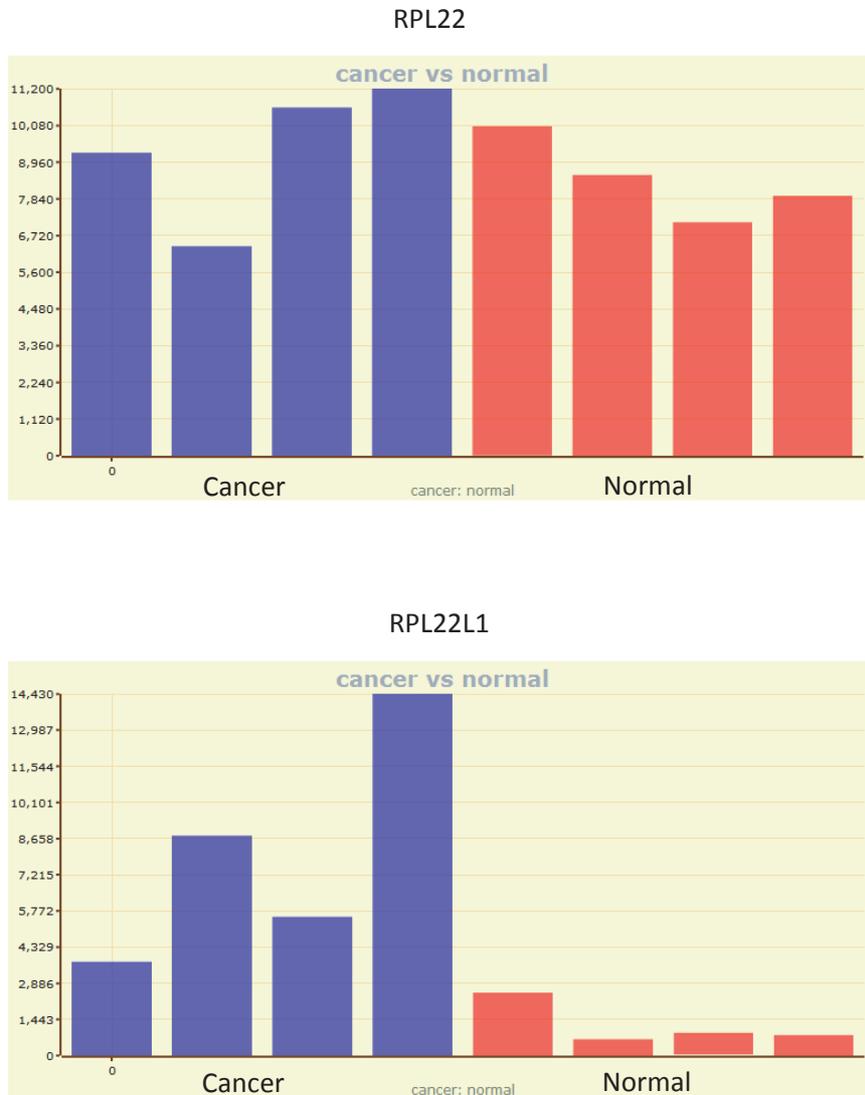


Figure 56 : Etude de l'expression des transcrit de RPL22 et RPL22L1 entre le tissu tumoral et le tissu sain. Les échantillons issus de patients sont analysés sur puce à ARN afin de déterminer les profils d'expression des gènes.

D'après Gene Expression across Normal and Tumor tissue (GENT)

Pour l'heure aucune étude ne s'est encore penchée sur la possibilité d'un contrôle traductionnel exercé par ces deux protéines dans le cadre de leur fonction « intra-ribosomique ». Dans cette étude nous proposons donc d'étudier un possible lien entre des caractéristiques phénotypiques propres aux cellules tumorales et un contrôle traductionnel exercé par RPL22 ou son paralogue. Ce contrôle pourrait être le fait de la formation d'un ribosome spécialisé qui orienterait le phénotype cellulaire par une traduction sélective, ou d'un contrôle post-transcriptionnel ; toutefois, nous n'excluons pas la possibilité d'un contrôle transcriptionnel.

Pour mener à bien ce projet, nous avons :

- 1) Développé et validé notre modèle d'étude cellulaire
- 2) Réalisé une caractérisation phénotypique,
- 3) Réalisé une étude transcriptomique et un ribosome profiling.

Nous avons entrepris d'inhiber RPL22 dans deux lignées cellulaires de cancer colorectal. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche shRNA nous permettant d'établir des lignées dans lesquelles RPL22 serait inhibé de manière stable. A la différence de la protéine RPL13, l'inhibition de RPL22 a pu être obtenue sans difficulté et nous avons été en mesure de diminuer son expression au niveau du message et de la protéine. A l'instar de ce qui a été décrit dans la littérature, nous avons observé une expression compensatrice de RPL22L1 suite à la diminution de RPL22, et ce dans nos deux lignées cellulaires (SW620 sh-RPL22 et HT116-shRPL22).

Une fois notre modèle d'étude validé, nous avons évalué l'effet de ces variations d'expression sur différents critères phénotypiques.

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la déplétion de RPL22 associée à l'augmentation de RPL22L1 n'a aucun effet sur la prolifération des cellules SW620 et HCT116 en condition adhérente ou en condition favorisant le maintien des cellules souches cancéreuses. Cette dernière observation indique que l'expression différentielle de ces deux protéines ne semble ni orienter les cellules vers une différenciation, ni vers un phénotype « souche ».

Nous avons ensuite évalué les capacités migratoires des cellules SW620 sh-RPL22 et HCT116 sh-RPL22 et nous avons pu constater une augmentation significative de la migration au sein de ces deux lignées. L'acquisition de capacités de motilité des cellules cancéreuses coliques est souvent liée à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux découlant d'une transition épithélio-mésenchymateuse. Celle-ci se traduit également par la perte des jonctions intercellulaires, une dépolarisation des cellules épithéliales et l'augmentation de l'expression de facteurs de transcriptions de la famille Twist, Snail et Zeb, induisant l'expression de gènes tels que la N-cadhérine, la fibronectine ou la vimentine (Thiery *et al.*, 2009). Nous avons donc analysé l'expression de la vimentine au sein de ces lignées et nous avons pu corrélérer l'augmentation de son expression avec l'acquisition du phénotype migratoire des cellules. Il est donc probable que l'inhibition de RPL22 induise une transition épithélio-mésenchymateuse, elle-même fréquemment associée aux processus métastatiques. Le lien entre inhibition de RPL22 et l'EMT a déjà été établi dans un modèle de cancer de l'ovaire et ce rôle dans l'EMT a été imputé à la protéine RPL22L1 sans que le mécanisme sous-jacent ne soit élucidé.

Dans ce projet, nous ne sommes pour l'heure pas en mesure de discriminer la part de RPL22 de celle de RPL22L1 ; afin d'attribuer ce phénotype à la diminution de RPL22 ou à l'augmentation de RPL22L1, des expériences consistant à surexprimer RPL22L1 dans les cellules SW620 et HCT116, sans modifier l'expression de RPL22, sont en cours. Nous prévoyons également d'inhiber ces deux protéines de manière concomitante, bien que comme précédemment rapporté (Wu *et al.*, 2015), il soit probable que cette expérience altère la viabilité des cellules.

Ensuite, nous nous sommes penchés sur l'aspect traductionnel. Afin d'évaluer l'activité traductionnelle globale au sein des cellules sh-RPL22, nous avons réalisé des profils de polysomes. Dans les deux lignées considérées, les profils sont identiques à ceux obtenus dans les lignées contrôles. En accord avec ce qui a été précédemment décrit chez les souris *Rpl22^{-/-}* (O'leary *et al.*, 2013) nous avons constaté l'incorporation de la protéine RPL22L1 au sein de la sous-unité 60S, des monosomes, des polysomes et dans la fraction libre. Nous détectons la présence de la protéine RPL22 dans ces mêmes fractions, ce qui sous-entend qu'il existe également une population de ribosomes en cours de traduction contenant RPL22.

La question est maintenant de savoir ce que traduisent ces ribosomes et, s'il existe une traduction spécifique, quel mécanisme est mis en jeu par ces deux protéines.

Afin de savoir si le programme transcriptionnel est modifié, nous avons réalisé une étude du transcriptome. Compte-tenu des paramètres de séquençage choisis, cette analyse nous

permettra également d'apprécier s'il existe des modifications au niveau de l'épissage de ces transcrits. Cette information est importante puisque ces protéines sont connues pour avoir la capacité de réguler l'épissage de certains transcrits. RPL22 et RPL22L1 peuvent également modifier le programme traductionnel par leur interaction avec des ARNm matures. Ce mécanisme a été décrit chez le *zebrafish* dans la régulation de l'ARNm de Smad1 pour lequel l'interaction avec Rpl22 ou Rpl22l1 conduit respectivement à l'inhibition ou à l'activation de sa traduction. Dans le cas où nous identifierons des protéines présentant une expression différentielle, il sera nécessaire de réaliser une analyse du type *Mfold* (Zuker, 2003) afin de mettre en évidence la présence d'une éventuelle séquence consensus reconnue par les hélices de liaison à l'ARN de RPL22 et RPL22L1.

Nous avons complété cette analyse par un *ribosome profiling* nous permettant d'identifier quels sont les ARNm traduits et comment sont-ils traduits, avec notamment des informations sur les sites d'initiation ou de terminaison alternatifs.

Dans les lignées que nous avons établies, la protéine RPL22 n'est pas complètement inhibée. De ce fait, nous détectons à la fois RPL22 et RPL22L1 au sein des ribosomes traductionnellement actifs. Il serait donc intéressant d'effectuer des expériences d'immunoprécipitation sur les fractions polysomales afin d'isoler les ribosomes pour étudier plus en détail leur composition. En effet, nous ne sommes pas en mesure de savoir s'il existe des ribosomes contenant exclusivement l'une ou l'autre de ces protéines, ou si les deux protéines peuvent être présentes de manière concomitante au sein d'un même ribosome. Si nous arrivons à isoler des ribosomes contenant soit RPL22, soit RPL22L1, nous pourrions envisager d'étudier les ARNm en cours de traduction par ces deux types de « ribosomes spécialisés ». Une autre approche nous permettant de répondre à cette question, serait de réaliser un knock-out de l'une ou de l'autre de ces protéines, de ce fait nous aurions une population homogène de ribosomes contenant soit RPL22, soit RPL22L1. Cependant, notre approche expérimentale est en accord avec l'histoire naturelle de la pathologie cancéreuse, à savoir que, même s'il existe une augmentation de l'expression de RPL22L1, l'expression de RPL22 n'est pas abolie dans les processus tumoraux.

D'autre part, RPL22 est située à la périphérie du ribosome et interagit physiquement avec RPL39. Il est possible que l'intégration de RPL22L1 à la place de RPL22 puisse modifier l'organisation structurale du ribosome

Cette étude sur le rôle de RPL22 et RPL22L1 dans le contrôle traductionnel lors de la tumorigenèse colique est la première du genre. Aucune étude n'a encore exploré par *ribosome profiling* le programme traductionnel induit par la présence de ribosomes spécialisés impliquant RPL22 ou RPL22L1. A terme, cette étude pourrait permettre de révéler de nouveaux mécanismes impliqués dans la dissémination tumorale, et de ce fait ouvrir de nouvelles voies d'exploration pour le développement de thérapies innovantes.

De plus, ces deux protéines paralogues, exprimées différemment dans le cancer, et semblant avoir des rôles antagonistes, ne sont ni essentielles à la biogenèse des ribosomes ni à la traduction générale. De ce fait, RPL22L1 pourrait dans un avenir lointain être envisagé comme une cible thérapeutique prometteuse.

Avec cette étude nous espérons apporter un éclairage supplémentaire sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la dissémination des cellules de cancer colorectal. En effet, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de RPL22 dans le ribosome pourrait aboutir à la formation d'un « ribosome spécialisé » qui induirait l'expression d'un programme traductionnel spécifique, permettant de soutenir les processus métastatiques.

Afin de répondre à cette question, l'étude comparative du transcriptome et du traductome devrait nous permettre de révéler une éventuelle implication de RPL22 et RPL22L1 dans le contrôle traductionnel dans les étapes clé de la tumorigenèse colorectale.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La régulation de l'expression des gènes est un processus complexe, intervenant à différents niveaux et impliquant de nombreux acteurs cellulaires. Aujourd'hui, il apparaît clair que la régulation traductionnelle est une étape cruciale de l'expression des gènes permettant de contrôler finement l'expression des protéines de manière quantitative, qualitative et spatio-temporelle, dans diverses situations biologiques, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques.

L'étude des fonctions cellulaires altérées au cours des processus de tumorigenèse a permis d'identifier la synthèse protéique comme étant une étape essentielle de la transformation néoplasique. En effet, une synthèse protéique élevée, accompagnée d'une dérégulation des composants de la machinerie de traduction est fortement associée au cancer. Ces dérégulations permettent de maintenir, d'une part une synthèse protéique élevée, nécessaire à la prolifération des cellules tumorales, et d'autre part l'expression spécifique de protéines pro-oncogéniques permettant la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse, la transformation, l'invasion et les processus métastatiques.

Au cœur de la machinerie traductionnelle se trouve le ribosome ; considéré pendant des années comme un acteur passif de la traduction, il semblerait jouer un rôle majeur dans la régulation de la synthèse protéique. En effet, des études récentes ont montré que la composition du ribosome était « flexible » et permettrait de favoriser la traduction de certains ARNm. De plus, l'expression de certaines protéines ribosomiques varie entre le tissu sain et le tissu cancéreux et parfois même entre la tumeur initiale et la métastase.

Au cours de ma thèse, je me suis principalement focalisée sur les mécanismes de régulation traductionnelle dans le contexte du cancer du côlon, en portant une attention particulière aux propriétés qui caractérisent les cellules souches cancéreuses (CSC).

Ces cellules, impliquées dans l'initiation et la dissémination tumorales ainsi que dans la résistance aux traitements, possèdent des capacités d'adaptation et de plasticité extraordinaires. Des modifications du contrôle traductionnel pourraient être à l'origine des changements rapides d'expression de gènes impliqués dans les propriétés particulières des CSC.

A ce jour, il n'existe pas de marqueur « idéal » des cellules souches cancéreuses et nous avons proposé de développer une nouvelle stratégie d'isolement des CSC. Celle-ci serait basée sur une activité traductionnelle différentielle permettant de séparer les CSC au sein d'une population hétérogène de cellules tumorales. Cette étude n'a pas donné les résultats

escomptés, mais c'est grâce à ce projet que j'ai découvert par sérendipité le rôle inhibiteur de certains antibiotiques sur certaines propriétés intrinsèques des CSC.

Nous avons alors testé leur impact sur la culture en suspension, condition qui promeut la survie des CSC, et nos résultats indiquent que l'addition du cocktail pénicilline/streptomycine (P/S) déclenche une diminution de la formation des sphères dans six lignées de cellules cancéreuses obtenues à partir de trois origines tissulaires distinctes. Cet effet est dose dépendant et est corrélé avec la réduction de la population de CSC. Cependant, l'ajout de P/S n'affecte pas la prolifération des cellules cultivées en condition adhérente. Cette étude met en garde contre l'utilisation systématique des antibiotiques dans la culture cellulaire. En effet, elle pourrait entraîner des biais expérimentaux qui entraveraient l'interprétation des résultats. Alors que le mécanisme précis par lequel la P/S inhibe la capacité de formation de sphères reste à déterminer, cette étude suggère potentiellement la possibilité d'utiliser les antibiotiques comme thérapie adjuvante permettant de cibler spécifiquement les CSC.

Depuis la publication de cette étude, les travaux visant à déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents ont permis d'identifier la streptomycine (SM) comme responsable de l'effet observé, et nous pensons que cette inhibition pourrait résulter de l'association de la SM avec des micro-ARN (miRNA) importants pour la survie des CSC. Une collaboration a été établie avec l'équipe du Dr Maria Duca (Université Nice Sophia Antipolis), experte dans la chimie des antibiotiques, et ce projet a permis l'obtention d'un financement de l'Institut National du Cancer cette année. Les objectifs actuels du projet sont de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents, de développer des analogues de la SM plus puissants et moins toxiques, et enfin de proposer les premières expériences *in-vivo* combinant chimiothérapie et antibiotiques afin d'évaluer l'impact sur la récurrence.

Par la suite, je me suis focalisée sur l'étude de la régulation traductionnelle dans les cellules souches cancéreuses. L'objectif initial était de réaliser une étude comparative entre les CSC, présentant une forte activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH^{bright}), et les cellules tumorales plus différenciées, présentant une faible activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH^{low}). Nous avons donc entrepris de réaliser un enrichissement de ces deux populations sur la base de ce critère et nous avons réalisé :

- 1- L'étude du transcriptome, basée sur le séquençage de tous les ARNm présents dans les cellules,
- 2- L'étude du traductome par *ribosome profiling* basée sur le séquençage des fragments d'ARNm protégés par le ribosome.

Nous avons alors tenté d'adapter la méthode du *ribosome profiling* initialement développée au sein du laboratoire pour de grandes quantités de cellules (plusieurs dizaines de millions), à une faible quantité de cellules (deux à trois millions) compatible avec l'étude d'une

population rare telle que les CSC. La méthode du *ribosome profiling* permet de caractériser l'état traductionnel d'une population cellulaire à un instant donné. Cette approche permet d'identifier la position du ribosome sur l'ARNm au codon prêt, rendant possible, entre autres, l'identification des sites d'initiation ou de terminaison alternatifs, ainsi que des variants d'épissage.

Nous avons toutefois été confrontés à des problèmes d'ordre technique et ce projet n'a pour l'heure pas pu aboutir. Cependant, une partie des échantillons a été utilisée pour la réalisation d'un transcriptome et d'un méthylome, dont les résultats constituent les données préliminaires d'un autre projet développé au sein du laboratoire. Parallèlement, une étude du traductome devrait être réalisée à partir des fractions de polysomes.

Ensuite, je me suis intéressée à l'identification et à la caractérisation de protéines ribosomiques pouvant être impliquées dans la régulation traductionnelle cruciale pour certaines étapes clés du cancer colorectal. Sur la base d'un premier crible et de certaines données de la littérature, nous avons sélectionné deux protéines ribosomiques potentiellement intéressantes: RPL13 et RPL22.

Nous avons donc entrepris d'inhiber l'expression de ces protéines dans des modèles cellulaires de cancer colorectal afin d'en déterminer l'impact phénotypique, et de caractériser les changements traductionnels impliqués.

Concernant la protéine RPL13, les résultats que nous avons obtenus suggèrent qu'elle soit impliquée dans les modifications morphologiques des cellules de cancer colorectal. Nous prévoyons d'étudier la possibilité d'une corrélation entre ces changements morphologiques et les capacités migratoires de ces cellules. Les difficultés que nous avons rencontrées pour inhiber cette protéine, et le fait qu'elle semble indispensable à la biogenèse de la sous-unité 60S des ribosomes, nous ont conduits à développer un outil précieux permettant de dégrader la protéine endogène, de manière dose-dépendante et réversible. Cet outil, basé sur l'association de la technologie CRIPR/Cas9 et d'un système de dégradation protéique inductible à l'auxine, nous permettra d'inhiber la protéine RPL13 au sein même des ribosomes fonctionnels. Il pourrait permettre de révolutionner l'étude des protéines ribosomiques rendue délicate par la finesse de la régulation de la biogenèse des ribosomes. Parallèlement, nous avons réalisé un transcriptome couplé à un *ribosome profiling*; les échantillons sont actuellement en cours d'analyse bioinformatique et les résultats devraient nous permettre d'identifier des cibles impliquées dans les changements morphologiques observés, mais également de mettre en lumière une régulation traductionnelle spécifique impliquant la protéine RPL13.

A terme, nous espérons également que la lignée SW620 TIR1-AID-GFP que nous avons établie permettra de mieux comprendre les fonctions de RPL13. Possède-t-elle des fonctions

extra-ribosomiques ? Est-elle impliquée dans une traduction localisée ? Participe-t-elle à la formation de ribosomes spécialisés favorisant la traduction d'ARNm impliqués dans le cancer colorectal?

L'étude de la protéine RPL22 nous a aussi amenés à nous intéresser à son paralogue RPL22L1. Ces deux protéines, connues pour leurs fonctions extra-ribosomiques semblent avoir des rôles antagonistes dans différents processus physiologiques ou pathologiques.

Dans notre modèle cellulaire de cancer colorectal, nous avons pu mettre en évidence une expression compensatrice de RPL22L1 lorsque l'expression de RPL22 est inhibée. Nous avons corrélé ces variations d'expression à l'augmentation des capacités migratoires et à l'expression d'un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Cependant nous n'avons observé aucun effet sur la prolifération des cellules ou sur l'acquisition d'un phénotype souche.

L'étude transcriptomique et le *ribosome profiling* que nous avons réalisés nous permettront d'identifier des mécanismes de régulation traductionnelle en lien avec des fonctions intra ou extra-ribosomiques.

Ces deux protéines RPL22 et RPL22L1 ne sont essentielles ni à la biogenèse des ribosomes, ni à la traduction générale, elles pourraient de ce fait, dans un avenir lointain, être envisagées comme cibles thérapeutiques potentielles.

Beaucoup de questions restent en suspens à l'issue de ce travail de thèse, mais il a toutefois permis le développement et la mise au point de différentes techniques de pointes permettant l'étude fine de la régulation traductionnelle. De plus, les résultats obtenus, et pour certains non présentés dans ce manuscrit, ont permis d'initier d'autres projets sur la thématique de la régulation traductionnelle dans le cancer du côlon.

Partie d'une simple observation, l'étude de l'effet des antibiotiques sur les cellules souches cancéreuses s'oriente dans un avenir proche vers l'exploration d'une possible utilisation clinique.

Concernant RPL13 et RPL22, les résultats des analyses en cours vont pouvoir être exploités sous peu ; ils aboutiront très certainement à l'identification de nouvelles cibles d'étude qui, je l'espère, permettront à leur tour d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires exploités par les cellules tumorales.

Comme disait André Brink : « (...) Vous devez d'abord apprendre à connaître votre ennemi ».

MATERIEL & METHODES

Lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires ont été utilisées pour cette étude.

La lignée SW620 (ATCC® CCL-227™) est une lignée commerciale établie à partir d'une métastase ganglionnaire de cancer colorectal ; cette lignée est mutée pour le gène p53.

La lignée HCT116 (ATCC® CCL-247™) est une lignée commerciale établie à partir d'un carcinome colorectal ; cette lignée est sauvage pour le gène p53.

La lignée RKO (ATCC® CRL-2577™) est une lignée commerciale établie à partir d'un carcinome colorectal ; cette lignée est sauvage pour le gène p53.

La lignée CRC1 est une lignée de cancer colorectal établie au laboratoire à partir d'une tumeur primaire de patient et qui a été établit au laboratoire.

Milieu de culture des cellules adhérentes (DMEM complet)

Dulbecco/s Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-12491-015) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio), 2mmol/L de L-glutamine et 100 unités/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

Milieu M11 pour culture des cellules en suspension

DMEM-F12 avec glutamax (Gibco), 3% de glucose, supplément N2 (Gibco), 20ng/ml d'EGF (R&D), 10ng/ml de βFGF (R&D) et 20µg/ml d'insuline (Sigma Aldrich).

Composition du supplément N2 (Gibco)

Transferrine humaine (Holo), Insuline, Progesterone, Putrescine, Selenite.

Liste des plasmides utilisés

pRS19-U6-(sh)-Ubic-TagRFP-2A-Puro
peGFP-C3-RPL13
peGFP-N1-RPL13
pUC57-Rc-RPL13
pUC57-AID-GFP-IRES-Neo
pUC57-Rc-RPL13-AID-GFP-Neo
pUC57 attBU6 BbSI
pUC57-attBU6-sgRNA-Guide A
pUC57-attBU6-sgRNA-Guide B
pBabe-TIR1-Puro
pBabe-Hygro
pBabe-TIR1-Hygro

pRS19-U6-(sh)-Ubic-TagRFP-2A-Puro : il s'agit d'un vecteur lentiviral permettant l'expression du sh-RPL13, du sh-RPL22 et du sh-Ctrl. Il possède un gène de résistance à la Puromycine et un rapporteur constitutif RFP.

Les lentivirus permettant l'introduction de ces séquences ont été produits sur la plateforme de Vectorologie de Montpellier (PVM).

peGFP-C3-RPL13 Rfc: la séquence CDS de RPL13 clonée dans ce vecteur d'expression est exprimée en fusion à l'extrémité C-terminale de l'eGFP.

peGFP-N1-RPL13 Rfc: la séquence CDS de RPL13 clonée dans ce vecteur d'expression est exprimée en fusion à l'extrémité N-terminale de l'eGFP.

Ces deux plasmides ont été générés par la plateforme Montpellier Genomic Collection (MGC).

pUC57-Rc-RPL13 : ce plasmide a été commandé chez Genscript. Il s'agit d'un plasmide pUC57 dans lequel la cassette de réparation a été clonée entre les sites de restriction EcorI et HindII. La cassette de réparation est constituée des bras d'homologie correspondant à une séquence de 1000nt homologue de la séquence de RPL13 avec 500 nt de part et

d'autre du codon stop de RPL13. Cette séquence contient également des sites de restriction XbaI, NheI et XhoI permettant l'insertion ultérieure de l'étiquette AID-GFP-IRES-Neo.

pUC57-Rc-RPL13-AID-GFP-Neo : pour construire ce plasmide, le pUC57-AID-GFP-IRES-Neo, gracieusement fourni par l'équipe du Dr Edouard Bertrand, a été digéré avec les enzymes XbaI, XhoI et SspI-HF afin de récupérer la séquence AID-GFP-IRES-Neo que nous avons inséré dans le pUC57-Rc-RPL13 entre les sites XbaI et XhoI.

pUC57-attBU6-sgRNA-Guide A : les primers sens et anti-sens correspondant au guide A ont été hybridés puis insérés dans le pUC57 préalablement linéarisé par digestion avec BpiI.

pUC57-attBU6-sgRNA-Guide B : les primers sens et anti-sens correspondant au guide B ont été hybridés puis insérés dans le pUC57 préalablement linéarisé par digestion avec BpiI.

pBabe-TIR1-Hygro : il s'agit d'un vecteur rétroviral qui a été généré à partir du plasmide pBabe-TIR1-Puro gracieusement fourni par l'équipe du Dr Edouard Bertrand et d'un plasmide pBabe-Hygro. Le plasmide pBabe-TIR1-Puro a été digéré avec les enzymes XmnI, EcoRI et BsiWI afin de récupérer la séquence TIR1. Celle-ci a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pBabe-Hygro au niveau des sites XmnI et EcoRI.

Le rétrovirus permettant l'introduction de cette séquence a été produit sur la plateforme de Vectorologie de Montpellier (PVM).

Séquences cibles des siRNA

si-RPL13 : GGAACGUCUAUAAGAAGGA

si-Ctrl : ACTCTATCGCCAGCGTGAC

si-RPL13 5'FAM : GGAACGUCUAUAAGAAGGA

si-Ctrl 5'FAM : ACTCTATCGCCAGCGTGAC

si-RPL22 : Dharmacon™ siGENOME SMARTpool siRNA

0-011143-01, RPL22 : GAAGUUCACUCUUGAUUGC

D-011143-02, RPL22 : CGAGGUGCCUUUCUCCAAA

0-011143-03, RPL22 : UGUAGAAGAUGGAAUCAUG

D-011143-04, RPL22 : AAGAAUAAUCUACGUGACU

Si-Ctrl : Dharmacon™ siGENOME Non-Targeting siRNA Pool#2

D-001206-14-05 : UAAGGCUAUGAAGAGAUAC, AUGUAUUGGCCUGUAUUAG,
AUGAACGUGAAUUGCUCUCAA, UGGUUUACAUGUC

Séquences cibles des shRNA

sh-RPL13 : TTGGTTAGTGACTGATGTAAA

sh-RPL22 : CCCTGTAGAAGATGGAATCAT

sh-Ctrl : GTCGCCCTCG

Séquences des guides

Guide A

5' CACC GCCGACTGATTCCAAGTCCCC 3'

5' AAACGGGGACTTGGGAATCAGTCGGC 3'

Guide B

5' CACC GGGCGCCCAGCCGGAATGGCA 3'

5' AAAGTCCATTCCGGCTGGGCGCCC 3'

Tableau des amorces de qPCR

Gène	Séquence Sens	Séquence anti-sens
βActine	AGGCACCAGGGCGTGAT	GCCCACATAGGAATCCTTCTG
RPL13	GGTGGCCAGTTTCAGTTCTT	AACAAGTCCACGGAGTCCC
RPL22	TGTTAGCAACTACGCGCAAC	GACCATCGAAAGGAGCAAGA
RPL22L1	AGAAAGACAGGAAGCCCAAGAGGT	CCTTCTCCCGTAGAAATTGCTCAA
Vimentine	TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT	CCCTCACCTGTGAAGTGGAT

Amorces pour le séquençage des clones issus de la lignée CRISPR

Geno 1:

For: AATCCAGGCTTCAGACGAGA

Rev: TGATACCTTCACGAACGCC

Geno 2:

For: GGCCGCTTTTCTGGATTCAT

Rev: GTTCTGACATGTTGGCCAGG

Liste des anticorps utilisés pour le western blot et leur dilution

Anti-RPL13 Abcam Ab50880 1/16000^{ème}Anti-RPL22 Proteintech 25002-1-AP 1/20000^{ème}Anti-RPL22L1 Santa Cruz Sc100126 1/200^{ème}Anti-βActine Sigma-Aldrich Ab5441 1/20000^{ème}Anti-mouse-HRP Sigma-Aldrich A9044 1/80000^{ème}Anti-Rabbit-HRP Santa Cruz Sc2357 1/500^{ème}

Conditions de culture cellulaire

Les cellules SW620, HCT116, RKO et CRC1 ont été cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂ en milieu DMEM complet pour la culture en condition adhérente ou en M11 pour la culture en suspension.

Prolifération cellulaire en condition adhérente

La prolifération a été mesurée en temps réel avec l'appareil Xcelligence E-Plate.

2.10⁴ cellules SW620 ou 1,5.10⁴ cellules HCT116 ont étéensemencées dans chaque puits dans du milieu DMEM complet. La mesure de l'impédance est effectuée automatiquement par le système XCELLigence pendant 72h et la valeur est exprimée en *cell index* (CI).

Migration en chambre de Boyden

La migration cellulaire a été évaluée par l'utilisation combinée d'insert *FluoroBlok*[™] 8 µm (BD Falcon[™]-351152) et de plaque Companion 24 puits (BD Falcon[™]-353504). 250 µl de suspension cellulaire (3.10⁴ cellules) en milieu 0% SVF sont introduits dans l'insert (chambre supérieure), puis 750 µl de milieu complet sont introduits dans le puits (chambre inférieure). Après 1 h d'incubation à 37°C, les inserts sont transférés dans un puits contenant 4µg/ml de Calcein AM (Sigma-17783) dans 750 µl de PBS. Après 1h d'incubation à 37°C, la mesure de la fluorescence est réalisée avec un microscope à fluorescence inversé et la quantification est réalisée sur le logiciel ImageJ.

Mesure du nombre et de la taille des sphères

Les cellules sontensemencées à la densité de 1 cellule/µl dans 100 µl de milieu M11 d'une plaque 96 puits préalablement traités au polyhème (low adherence) (20 puits/condition). Après 2 semaines, les sphères d'une taille supérieure à 50µm sont comptées manuellement et leur taille est évaluée sur le logiciel ImageJ.

Extraction des ARN par la méthode du TRIzol

Les culots cellulaires repris dans 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) puis placés à -80°C pendant minimum 15 min. Après décongélation, 0,2 ml de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont secoués vigoureusement à la main pendant 15 s avant une incubation de 5 mn à température ambiante et une centrifugation à 12000 g pendant 15 mn à 4°C. Le mélange se sépare en trois phases et la phase aqueuse (supérieure), contenant les acides nucléiques, est transférée dans un nouveau tube. Les acides nucléiques sont précipités par ajout de 0,5 ml d'isopropanol suivie d'une incubation de 10 min à température ambiante. Après centrifugation de 30 mn à 12000 g à 4°C, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 70% puis les tubes sont de nouveau centrifugés 15 min à 12000g. Les culots sont séchés puis repris dans 50 à 100 µl d'H₂O dépourvue de RNase.

Extraction d'ARN sur colonne Qiagen et RT-qPCR

Les ARNm sont extraits sur colonnes *RNeasy mini-kit* (Qiagen-74104) selon les recommandations du fournisseur. La transcription inverse est effectuée à partir de 1 µg d'ARN par la retro-transcriptase *MML-V* (Invitrogen-28025013). La qPCR en temps réel est effectuée dans des plaques 384 puits *LightCycler® 480* (Roche-04729749001) en présence de 1 µM de mix d'amorces sens et anti-sens, 10 ng d'ADNc et le mix *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche-4707516001). La méthode de quantification de l'ARNm est basée sur la méthode des $\Delta\Delta Ct$: $\Delta Ct = (CT \text{ Actine} - CT \text{ Gène d'intérêt})$, et le fold change = $2^{(\Delta Ct \text{ lignée d'intérêt} - \Delta Ct \text{ de référence})}$.

Western-Blot

Les extraits protéiques sont préparés dans du tampon RIPA (1%NP40, 0.25% DOC) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche-11697498001). Les échantillons sont préalablement dénaturés dans un tampon Laemmli à 95°C pendant 5 min et 50 µg de protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 12% puis transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec. Après 1h de saturation dans du PBS 0.1% tween contenant 5% de lait écrémé la membrane est incubée avec les anticorps primaires pendant la nuit à 4°C puis, après trois lavages au PBS 0.1% tween, la membrane est incubée pendant 1 h à 20°C avec les anticorps secondaires couplés à la HRP. La lecture est réalisée sur l'appareil *Chemidoc touch* (BioRad) après révélation avec le

kit Amersham™ ECL™ Prime ou Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare-RPN2232)

Transduction virale

Les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits à raison de $30 \cdot 10^4$ cellules/puits dans du milieu DMEM complet. Le lendemain, les cellules sont transduites avec les virus puis 24h plus tard, le milieu est renouvelé. Le cas échéant la sélection antibiotique est débutée pour une période de 2 semaines avec changement du milieu toutes les 48h avec 1 µg/ml de Puromycine ou 700 µg/ml d'hygromycine.

Transfection des cellules par siRNA

Les cellules sont ensemencées en boîte de Pétri 100 mm à raison de $1,2 \cdot 10^6$ cellules dans 10 ml de milieu complet sans antibiotique. Le lendemain, les cellules sont transfectées selon les recommandations du fournisseur avec un mix comprenant 50nM de RNAi duplex, 25µL de *lipofectamine RNAiMAX® Transfection Reagent* (Invitrogen-13778075) dans 2 ml de milieu *Opti-MEM™ Reduced Serum Media* (Gibco-11058021). Le lendemain le milieu est changé pour du milieu complet.

Transfection plasmidique des cellules

Transfection de la lignée SW620 avec les plasmides peGFP-C3-RPL13 ou peGFP-N1-RPL13

Les cellules sont ensemencées en boîte de Pétri 100 mm à raison de $3 \cdot 10^6$ cellules dans 10mL de milieu complet sans antibiotique. Le lendemain, le milieu est changé pour 8 ml de milieu frais sans antibiotique et les cellules sont transfectées selon les recommandations du fournisseur avec un mix contenant 2,5 µg, 5 µg ou 10 µg de plasmide, 30 µl de *Lipofectamine® 2000 transfection reagent* et 2 ml de milieu *Opti-MEM™*. Le lendemain le milieu est changé pour du milieu complet.

Transfection de la lignée SW620 Os TIR1 pour la réalisation du CRISPR

Les cellules sont ensemencées dans un plaque 6 puits à raison de $350 \cdot 10^3$ cellules/puits

dans 2ml de milieu complet sans antibiotique. Le lendemain, le milieu est changé pour 2 ml de milieu frais sans antibiotique et les cellules sont transfectées selon les recommandations fournies par le fabricant avec un mix contenant 0,6 µg de pUC57-attBU6-sgRNA-Guide A, 0,6 µg de pUC57-attBU6-sgRNA-Guide B, 0,6 µg de pUC57-Rc RPL13-AID-GFP-Neo, 0,2 µg de CAS9-D10A-Nickase, 7,5 µl de *Lipofectamine® 2000 transfection reagent* (Invitrogen-11668019) et 250 µl de milieu *Opti-MEM™*. Le lendemain le milieu est changé et la sélection antibiotique avec 800 µg/ml de G418 (Sigma-A1720) est débutée.

Surface sensing of translation (SUnSET)

Brièvement, $5 \cdot 10^4$ cellules sont incubées pendant 2h à 37°C en présence de 4 µg/ml de Puromycine (Sigma-Aldrich-P8833) suivi de 1h de chasse à 37°C. Les cellules sont lavées au PBS froid puis mises à incuber sur glace pendant 1h avec l'anticorps anti-Puromycine (2A4-Mo « *home-made* ») au 1/1000^{ème} dans du PBS 0,5% SVF. Après lavage au PBS 0,5% SVF glacé, les cellules sont mises à incuber sur glace pendant 1h avec l'anticorps anti-mouse Alexa 647 au 1/1000^{ème}. Après 2 lavages au PBS 0,5% SVF glacé les cellules sont reprises dans 500 µl de PBS 0,5% SVF glacé et l'analyse est réalisée sur le cymomètre MACSQuant® Analyzer 10.

Profil de polysomes

Environ 20 à $30 \cdot 10^6$ de cellules sont traitées avec 20 µg/ml d'Emétine (Sigma-E2375) pendant 5 min à 37°C puis lavées deux fois avec du PBS froid. Les culots cellulaires sont repris dans 1 ml tampon de lyse (sucrose 7%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, KCl 25 mM, NP-40 0,1%, inhibiteurs de protéase sans EDTA, 10U / ml RNase out) et lysées 20 sec à 4m/sec à l'aide de bille de céramique de 1.4mm (Lysing Matrix D MP Bio) dans un appareil Fastprep. Le lysat est centrifugé 10 min à 16000 g et le surnageant est déposé sur un gradient de sucrose 15-50% et les polysomes sont fractionnés par ultracentrifugation à 35000 rpm pendant 2h30 à 4°C. Les fractions sont collectées avec un système de fractionnement en continu (Lincoln, NE) et congelés à -80°C.

Coussin de sucrose

Les cellules sont traitées avec 20 µg/ml d'Emétine (Sigma-E2375) pendant 5 min à 37 °C puis lavées deux fois avec du PBS froid. Les culots cellulaires sont repris dans 1 ml tampon de lyse (sucrose 7%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, KCl 25 mM, NP-40 0,1%, inhibiteurs de protéase sans EDTA, 10U / ml RNase out) et lysées 20 sec à 4m/sec à l'aide de bille de céramique de 1.4mm (Lysing Matrix D MP Bio) et d'un appareil Fastprep. Le lysat est centrifugé 10 min à 16000 g et le surnageant est déposé sur un coussin de sucrose 30% puis les monosomes et les polysomes sont sédimentés par ultracentrifugation à 35000 rpm pendant 24h à 4°C.

Ribosome profiling

Génération des empreintes des ribosomes

Les fractions monosomales et polysomales sont poolées à raison de 60ul de chaque fraction. 160 UDO de ce mix sont digérés pendant 1h à 4°C par 1200 U (750U RNase/100UDO) de RNase I (ThermoFisher-EN0601). Les ARN sont purifiés après extraction phénolique en TRIzol. L'extrémité 3' des fragments d'ARN est déphosphorylée par 10 U de T4 polynucléotide kinase (NEB-M0201S) à 37°C pendant 2h, puis l'enzyme est inactivée 20 min à 65°C. Les empreintes sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide Novex denaturing 15% TBE Urea Gel (Invitrogen EC68855BOX) puis les bandes de gel correspondant aux fragments de 28 nucléotides sont découpées, broyées et l'ARN est élué sur la nuit dans un tampon d'éluion (NaOac 300 mM pH 5.5, EDTA 1mM, 0.1 U/µl de Ambion™ SUPERase-In™ RNase Inhibitor (Invitrogen-AM2696)). Les débris du gel sont éliminés par centrifugation pendant 4 min à 12000 rpm sur colonne Corning® Costar® Spin-X® (Corning-CLS8160) et les empreintes sont purifiées par précipitation à l'éthanol

Élimination des ARN ribosomaux

Les ARN ribosomaux sont éliminés avec le kit *Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits* (Illumina-MRZH116) selon les recommandations du fournisseur. Les fragments d'ARN déplétés des ARN ribosomaux sont précipités à l'éthanol.

Polyadénylation et rétro-transcription des empreintes

Les fragments d'ARN sont polyadénylés pendant 45 min à 37°C en présence de 1 mM d'ATP et 3 U of E. coli Poly(A) Polymerase (NEB-0276) puis ils sont retro-transcrits pendant 50 min à 50°C en présence de 200 U de Superscript™III reverse transcriptase (Invitrogen-

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'aide du logiciel GraphPad Prism® 7. Les valeurs moyennes sont représentées \pm SEM et les tests statistiques utilisés sont des tests unpaired t-test ou Mann-Whitney. Les données statistiquement significatives ($p < 0.1$) entre deux conditions sont repérées par une étoile (*), $p < 0.01$ par deux étoiles (**), $p < 0.001$ par trois étoiles (***) et $p < 0.0001$ par quatre étoiles (****).

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS, S. M. et al. Isolation and characterization of a novel gene with differential expression in benign and malignant human breast tumours. **Hum Mol Genet**, v. 1, n. 2, p. 91-6, May 1992. ISSN 0964-6906. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1301162> >.

AGRAWAL, R. K. et al. EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 7, p. 643-7, Jul 1999. ISSN 1072-8368.

AGRAWAL, R. K. et al. Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the Escherichia coli ribosome. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 1000-2, Feb 16 1996. ISSN 0036-8075.

AHMAD, Y. et al. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D181-4, Jan 2009. ISSN 1362-4962. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18984612> >.

ALLFREY, V.; DALY, M. M.; MIRSKY, A. E. Synthesis of protein in the pancreas. II. The role of ribonucleoprotein in protein synthesis. **J Gen Physiol**, v. 37, n. 2, p. 157-75, Nov 20 1953. ISSN 0022-1295.

ANDERSON, S. J. et al. Ablation of ribosomal protein L22 selectively impairs alphabeta T cell development by activation of a p53-dependent checkpoint. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 759-72, Jun 2007. ISSN 1074-7613. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555992> >.

ANGER, A. M. et al. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 80-85, 05/02/print 2013. ISSN 0028-0836. < <http://dx.doi.org/10.1038/nature12104> >.

AUGER-BUENDIA, M. A.; LONGUET, M.; TAVITIAN, A. Kinetic studies on ribosomal proteins assembly in preribosomal particles and ribosomal subunits of mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 563, n. 1, p. 113-28, Jun 1979. ISSN 0006-3002. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/497202> >.

BARKER, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 19-33, Jan 2014. ISSN 1471-0080. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326621> >.

BARKER, N. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 608-11, Jan 2009. ISSN 1476-4687. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092804> >.

BARNUM, C. P.; HUSEBY, R. A. Some quantitative analyses of the particulate fractions from mouse liver cell cytoplasm. **Arch Biochem**, v. 19, n. 1, p. 17-23, Oct 1948. ISSN 0096-9621.

BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-12, Mar 2007. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379808> >.

BARRETT, L. W.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. In: (Ed.). **Cell Mol Life Sci**. Basel, v.69, 2012. p.3613-34. ISBN 1420-682X.

BAYLISS, F. T.; INGRAHM, J. L. Mutation in *Saccharomyces cerevisiae* conferring streptomycin and cold sensitivity by affecting ribosome formation and function. **J Bacteriol**, v. 118, n. 2, p. 319-28, May 1974. ISSN 0021-9193. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4133351> >.

BAYLISS, F. T.; VINOPAL, R. T. Selection of ribosomal mutants by antibiotic suppression in yeast. **Science**, v. 174, n. 4016, p. 1339-41, Dec 1971. ISSN 0036-8075. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4944401> >.

BEE, A. et al. Ribosomal protein l19 is a prognostic marker for human prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 7 Pt 1, p. 2061-5, Apr 2006. ISSN 1078-0432. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609016> >.

BEN-SHEM, A. et al. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. **Science**, v. 330, n. 6008, p. 1203-9, Nov 2010. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109664> >.

BHATTACHARJEE, A. et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 24, p. 13790-5, Nov 2001. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707567> >.

BIOPHYSICAL SOCIETY. SYMPOSIUM CAMBRIDGE, M.; ROBERTS, R. B. **Microsomal particles and protein synthesis**; papers presented at the First Symposium of the Biophysical Society, at the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, February 5, 6, and 8, 1958. Richard B. Roberts, editor. New York: Published on behalf of the Washington Academy of Sciences, Washington, D.C., by Pergamon Press, 1958. < <http://www.biodiversitylibrary.org/item/28205> >.

BIRCH, J. L.; ZOMERDIJK, J. C. Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 4, p. 619-24, Aug 2008. ISSN 0300-5127. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18631128> >.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-8, May 24 2007. ISSN 0028-0836.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med**, v. 3, n. 7, p. 730-7, Jul 1997. ISSN 1078-8956. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212098> >.

BORTOLUZZI, S. et al. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1152-7, Dec 2001. ISSN 1367-4803. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751223> >.

BOSE, D. et al. The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 51, n. 4, p. 1019-23, Jan 2012. ISSN 1521-3773. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173871> >.

BRADATSCH, B. et al. Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel. **Nat Struct Mol Biol**, v. 19, n. 12, p. 1234-41, Dec 2012. ISSN 1545-9985. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142978> >.

BROWN, D. D.; GURDON, J. B. Absence of ribosomal rna synthesis in the anucleolate mutant of xenopus laevis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 51, p. 139-46, Jan 1964. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14106673> >.

CARROLL, A. J. et al. Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 347-69, Feb 2008. ISSN 1535-9484. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934214> >.

CASTLE, J. C. et al. Digital Genome-Wide ncRNA Expression, Including SnoRNAs, across 11 Human Tissues Using PolyA-Neutral Amplification. **PLOS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11779, 2010. < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011779> >.

CHAO, F.-C.; SCHACHMAN, H. K. The isolation and characterization of a macromolecular ribonucleoprotein from yeast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 1, p. 220-230, 1956/03/01 1956. ISSN 0003-9861. < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986156903344> >.

CHEN, T. et al. m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 289-301, Mar 2015. ISSN 1875-9777. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25683224> >.

CHENG, L. et al. Mouse models for cancer stem cell research. **Toxicol Pathol**, v. 38, n. 1, p. 62-71, Jan 2010. ISSN 1533-1601. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920280> >.

CHERCIU, I. et al. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations. **Curr Health Sci J**, v. 40, n. 3, p. 153-61, 2014 Jul-Sep 2014. ISSN 2067-0656. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25729599> >.

CHESTER, K. A. et al. Identification of a human ribosomal protein mRNA with increased expression in colorectal tumours. **Biochim Biophys Acta**, v. 1009, n. 3, p. 297-300, Dec 1989. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2597680> >.

CHEUTIN, T. et al. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 16, p. 3297-307, Aug 2002. ISSN 0021-9533. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140261> >.

CHICOINE, J. et al. Bicaudal-C recruits CCR4-NOT deadenylase to target mRNAs and regulates oogenesis, cytoskeletal organization, and its own expression. **Dev Cell**, v. 13, n. 5, p. 691-704, Nov 2007. ISSN 1534-5807. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981137> >.

CHO, P. F. et al. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 411-23, May 2005. ISSN 0092-8674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882623> >.

CHU, P. et al. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. **Int J Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1312-21, Mar 2009. ISSN 1097-0215. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19072981> >.

CLAUDE, A. Particulate components of cytoplasm. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 9, p. 263-271, January 1, 1941 1941. < <http://symposium.cshlp.org/content/9/263.short> >.

CLAUDE, A. Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation; experimental procedures and results. **J Exp Med**, v. 84, p. 61-89, Jul 1946. ISSN 0022-1007.

COHEN, S. et al. Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures. **Tissue Eng**, v. 12, n. 7, p. 2025-30, Jul 2006. ISSN 1076-3279. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889530> >.

COOPER, G. **The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.**: Sunderland (MA): Sinauer Associates 2000.

DABEVA, M. D.; WARNER, J. R. Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript. **J Biol Chem**, v. 268, n. 26, p. 19669-74, Sep 1993. ISSN 0021-9258. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366109> >.

DARKEN, M. A. Puromycin inhibition of protein synthesis. **Pharmacol Rev**, v. 16, p. 223-43, Sep 1964. ISSN 0031-6997. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14211122> >.

DAVID, A. et al. Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromylation. **J Cell Biol**, v. 197, n. 1, p. 45-57, Apr 2012. ISSN 1540-8140. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472439> >.

DAVID, A. et al. RiboPuromylation Method (RPM): A New Technique for Visualizing Active Cellular Translation Sites and Exploring Translation Compartmentalization. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1 Supplement, p. 521.2-521.2, 2011. < http://www.fasebj.org/content/25/1_Supplement/521.2.abstract >.

- DE LA CRUZ, J.; KARBSTEIN, K.; WOOLFORD, J. L. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. **Ann Rev Biochem**, v. 84, p. 93-129, 2015. ISSN 1545-4509. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25706898> >.
- DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275-84, Apr 2005. ISSN 1474-175X.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803154> >.
- DECATUR, W. A.; FOURNIER, M. J. rRNA modifications and ribosome function. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n. 7, p. 344-51, Jul 2002. ISSN 0968-0004.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114023> >.
- DELAPORTA, P. et al. Clinical phenotype and genetic analysis of RPS19, RPL5, and RPL11 genes in Greek patients with Diamond Blackfan Anemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 61, n. 12, p. 2249-55, Dec 2014. ISSN 1545-5017.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132370> >.
- DEMOINET, E. et al. The Hsp40 chaperone Jjj1 is required for the nucleo-cytoplasmic recycling of preribosomal factors in *Saccharomyces cerevisiae*. **RNA**, v. 13, n. 9, p. 1570-81, Sep 2007. ISSN 1355-8382. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652132> >.
- DEUSSER, E. Heterogeneity of ribosomal populations in *Escherichia coli* cells grown in different media. **Mol Gen Genet**, v. 119, n. 3, p. 249-58, 1972. ISSN 0026-8925.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4567158> >.
- DEVER, T. E. Gene-specific regulation by general translation factors. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 545-56, Feb 2002. ISSN 0092-8674.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909525> >.
- DEVER, T. E. Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 545-556, 2002. ISSN 0092-8674.
< [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00642-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00642-6) >.
- DEVER, T. E.; GREEN, R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 7, p. a013706, Jul 2012. ISSN 1943-0264. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22751155> >.
- DIXON, J. et al. Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 36, p. 13403-8, Sep 2006. ISSN 0027-8424.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938878> >.
- DOBBELSTEIN, M.; SHENK, T. In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. **J Virol**, v. 69, n. 12, p. 8027-34, Dec 1995. ISSN 0022-538X.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494316> >.

DOKTOROVA, H. et al. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 159, n. 2, p. 166-77, Jun 2015. ISSN 1213-8118.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26001024> >.

DOMINISSINI, D. et al. The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 441-6, Feb 2016. ISSN 1476-4687.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26863196> >.

DONNELLY, N. et al. The eIF2 α kinases: their structures and functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 19, p. 3493-511, Oct 2013. ISSN 1420-9071.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354059> >.

DRYGIN, D.; RICE, W. G.; GRUMMT, I. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 131-56, 2010. ISSN 1545-4304. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20055700> >.

EL MOUEDDEN, M. et al. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 3, p. 665-75, Mar 2000. ISSN 0066-4804. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681336> >.

ELLIS, S. R. Nucleolar stress in Diamond Blackfan anemia pathophysiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 6, p. 765-8, Jun 2014. ISSN 0006-3002.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412987> >.

ELVIN, P. et al. Isolation and preliminary characterisation of cDNA clones representing mRNAs associated with tumour progression and metastasis in colorectal cancer. **Br J Cancer**, v. 57, n. 1, p. 36-42, Jan 1988. ISSN 0007-0920.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450556> >.

ENNIFAR, E. et al. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 8, p. 2328-39, 2006. ISSN 1362-4962. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679451> >.

ENYENIHI, A. H.; SAUNDERS, W. S. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 47-54, Jan 2003. ISSN 0016-6731. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586695> >.

ETCHISON, D. et al. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. **J Biol Chem**, v. 257, n. 24, p. 14806-10, Dec 1982. ISSN 0021-9258.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6294080> >.

EYLER, D. E.; WEHNER, K. A.; GREEN, R. Eukaryotic release factor 3 is required for multiple turnovers of peptide release catalysis by eukaryotic release factor 1. **J Biol Chem**, v. 288, n. 41, p. 29530-8, Oct 2013. ISSN 1083-351X.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23963452> >.

FAHL, S. P. et al. Regulatory Roles of Rpl22 in Hematopoiesis: An Old Dog with New Tricks. **Crit Rev Immunol**, v. 35, n. 5, p. 379-400, 2015. ISSN 1040-8401.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853850> >.

FERREIRA, A. M. et al. High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors. **Hum Mutat**, v. 35, n. 12, p. 1442-5, Dec 2014. ISSN 1098-1004. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25196364> >.

FERREIRA-CERCA, S. et al. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. **Mol Cell**, v. 20, n. 2, p. 263-75, Oct 2005. ISSN 1097-2765. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246728> >.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 2, p. 102-14, Feb 2008. ISSN 1471-0064.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197166> >.

FINAK, G. et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 518-27, May 2008. ISSN 1546-170X.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438415> >.

FLEISCHER, T. C. et al. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. **Genes Dev**, v. 20, n. 10, p. 1294-307, May 2006. ISSN 0890-9369.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702403> >.

FOK, V. et al. Multiple domains of EBER 1, an Epstein-Barr virus noncoding RNA, recruit human ribosomal protein L22. **RNA**, v. 12, n. 5, p. 872-82, May 2006. ISSN 1355-8382. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556938> >.

FONSECA, B. D. et al. La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). **The Journal of Biological Chemistry**, U.S.A., v. 290, n. 26, p. 15996-16020, 2015. ISSN 0021-9258.
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481205/> >.

FRANK, J. Advances in the field of single-particle cryo-electron microscopy over the last decade. **Nat Protoc**, v. 12, n. 2, p. 209-212, Feb 2017. ISSN 1750-2799.

FRANK, J. et al. The process of mRNA-tRNA translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 50, p. 19671-8, Dec 2007. ISSN 1091-6490.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003906> >.

FRANK, J. et al. A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome. **Nature**, v. 376, n. 6539, p. 441-4, Aug 03 1995. ISSN 0028-0836.

FREED, E. F. et al. When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 3, p. 481-93, Mar 2010. ISSN 1742-2051.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20174677> >.

- FREEDMAN, V. H.; SHIN, S. I. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. **Cell**, v. 3, n. 4, p. 355-9, Dec 1974. ISSN 0092-8674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4442124> >.
- FROLOVA, L. et al. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 701-3, Dec 1994. ISSN 0028-0836. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7990965> >.
- FUKUDA, Y.; MALMBORG, A. S.; APERIA, A. Gentamicin inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat kidney cells. **Acta Physiol Scand**, v. 141, n. 1, p. 27-34, Jan 1991. ISSN 0001-6772. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1647125> >.
- GALLAGHER, J. E. et al. RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. **Genes Dev**, v. 18, n. 20, p. 2506-17, Oct 2004. ISSN 0890-9369. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489292> >.
- GAMALINDA, M. et al. A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. **Genes Dev**, v. 28, n. 2, p. 198-210, Jan 2014. ISSN 1549-5477. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449272> >.
- GENTILELLA, A.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G. A liaison between mTOR signaling, ribosome biogenesis and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, n. 7, p. 812-20, Jul 2015. ISSN 0006-3002. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25735853> >.
- GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 913-63, 1999. ISSN 0066-4154. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872469> >.
- GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev**, v. 15, n. 7, p. 807-26, Apr 2001. ISSN 0890-9369. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297505> >.
- GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635-8, Feb 23 2007. ISSN 0092-8674.
- GRADY, W. M.; CARETHERS, J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1079-99, Oct 2008. ISSN 1528-0012. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773902> >.
- GRAY, N. K.; HENTZE, M. W. Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. **EMBO J**, v. 13, n. 16, p. 3882-91, Aug 1994. ISSN 0261-4189. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070415> >.
- GRAY, W. M. et al. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. **Genes Dev**, v. 13, n. 13, p. 1678-91, Jul 1999. ISSN 0890-9369. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398681> >.

- GRILLET, F. et al. Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture. **Gut**, Jul 2016. ISSN 1468-3288.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27456153> >.
- GUNDERSON, J. H. et al. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in Plasmodium. **Science**, v. 238, n. 4829, p. 933-7, Nov 1987. ISSN 0036-8075.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3672135> >.
- GUNIŠOVÁ, S.; VALÁŠEK, L. S. Fail-safe mechanism of GCN4 translational control--uORF2 promotes reinitiation by analogous mechanism to uORF1 and thus secures its key role in GCN4 expression. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 9, p. 5880-93, May 2014. ISSN 1362-4962.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623812> >.
- GURDON, J. B. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. **Dev Biol**, v. 4, p. 256-73, Apr 1962. ISSN 0012-1606.
- HAGGAR, F. A.; BOUSHEY, R. P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clin Colon Rectal Surg**, v. 22, n. 4, p. 191-7, Nov 2009. ISSN 1530-9681. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037809> >.
- HAMILTON, M. G.; PETERMANN, M. L. Ultracentrifugal Studies on Ribonucleoprotein from Rat Liver Microsomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 6, p. 1441-1446, 1959. < <http://www.jbc.org/content/234/6/1441.short> >.
- HANNAN, K. M. et al. Signaling to the ribosome in cancer--It is more than just mTORC1. **IUBMB Life**, v. 63, n. 2, p. 79-85, Feb 2011. ISSN 1521-6551.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21360636> >.
- HANNAN, K. M. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 3-4, p. 342-60, 2013 Mar-Apr 2013. ISSN 0006-3002.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153826> >.
- HARRIS, M. A. et al. Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. **Cancer Res**, v. 68, n. 24, p. 10051-9, Dec 2008. ISSN 1538-7445.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074870> >.
- HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 7, p. 522-31, Jul 2004. ISSN 1471-0056.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15211354> >.
- HEISS, N. S. et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. **Nat Genet**, v. 19, n. 1, p. 32-8, May 1998. ISSN 1061-4036. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590285> >.
- HELD, W. A.; MIZUSHIMA, S.; NOMURA, M. Reconstitution of Escherichia coli 30 S ribosomal subunits from purified molecular components. **J Biol Chem**, v. 248, n. 16, p. 5720-30, Aug 25 1973. ISSN 0021-9258.

- HELPS, N. R. et al. The *Drosophila melanogaster* homologue of the human BBC1 gene is highly expressed during embryogenesis. **Gene**, v. 162, n. 2, p. 245-8, Sep 1995. ISSN 0378-1119. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557437> >.
- HENDRIX, D. V.; WARD, D. A.; BARNHILL, M. A. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. **Am J Vet Res**, v. 62, n. 10, p. 1664-9, Oct 2001. ISSN 0002-9645. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592337> >.
- HERBERT, A.; WAGNER, S.; NICKERSON, J. A. Induction of protein translation by ADAR1 within living cell nuclei is not dependent on RNA editing. **Mol Cell**, v. 10, n. 5, p. 1235-46, Nov 2002. ISSN 1097-2765.
- HO, J. H.; KALLSTROM, G.; JOHNSON, A. W. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. **J Cell Biol**, v. 151, n. 5, p. 1057-66, Nov 2000. ISSN 0021-9525. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086007> >.
- HOLMBERG OLAUSSON, K.; NISTÉR, M.; LINDSTRÖM, M. S. p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. **Cells**, v. 1, n. 4, p. 774-98, Oct 2012. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710530> >.
- HOU, Y. M.; GAMPER, H.; YANG, W. Post-transcriptional modifications to tRNA--a response to the genetic code degeneracy. **RNA**, v. 21, n. 4, p. 642-4, Apr 2015. ISSN 1469-9001. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25780173> >.
- HOUMANI, J. L.; DAVIS, C. I.; RUF, I. K. Growth-promoting properties of Epstein-Barr virus EBER-1 RNA correlate with ribosomal protein L22 binding. **J Virol**, v. 83, n. 19, p. 9844-53, Oct 2009. ISSN 1098-5514. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640998> >.
- HUGHES, M. E. et al. Deep sequencing the circadian and diurnal transcriptome of *Drosophila* brain. **Genome Res**, v. 22, n. 7, p. 1266-81, Jul 2012. ISSN 1549-5469. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472103> >.
- HÜGEL, A.; WERNERT, N. Loss of heterozygosity (LOH), malignancy grade and clonality in microdissected prostate cancer. **Br J Cancer**, v. 79, n. 3-4, p. 551-7, Feb 1999. ISSN 0007-0920. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027329> >.
- IBORRA, F. J.; JACKSON, D. A.; COOK, P. R. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1139-42, Aug 2001. ISSN 0036-8075. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423616> >.
- IERUSALIMSKII, N. D.; SHEVCHENKO, L. A.; GRISHANKOVA, E. V. [Change of some physiological requirements of yeasts as a result of adaptation to streptomycin]. **Mikrobiologiya**, v. 32, p. 13-6, 1963 Jan-Feb 1963. ISSN 0026-3656. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13956212> >.

INGOLIA, N. T. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. **Nat Rev Genet**, v. 15, n. 3, p. 205-13, 03 2014. ISSN 1471-0064. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468696> >.

INGOLIA, N. T. et al. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 218-23, Apr 2009. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19213877> >.

ISHIMURA, R. et al. RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. **Science**, v. 345, n. 6195, p. 455-9, Jul 2014. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25061210> >.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **J Bacteriol**, v. 169, n. 12, p. 5429-33, Dec 1987. ISSN 0021-9193. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316184> >.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 113-27, Feb 2010. ISSN 1471-0080. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094052> >.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U.; PESTOVA, T. V. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 86, p. 45-93, 2012. ISSN 1876-1631. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22243581> >.

JALKANEN, A. L.; COLEMAN, S. J.; WILUSZ, J. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size--does this protein make my tail look big? **Semin Cell Dev Biol**, v. 34, p. 24-32, Oct 2014. ISSN 1096-3634.

JEFFERIES, H. B. et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. **EMBO J**, v. 16, n. 12, p. 3693-704, Jun 16 1997. ISSN 0261-4189.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1542-4863. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855> >.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-80, Aug 10 2001. ISSN 0036-8075.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-21, Aug 2012. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249> >.

JYONOUCHI, S. et al. Dyskeratosis congenita: a combined immunodeficiency with broad clinical spectrum--a single-center pediatric experience. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 22, n. 3, p. 313-9, May 2011. ISSN 1399-3038. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284747> >.

KAI, T.; WILLIAMS, D.; SPRADLING, A. C. The expression profile of purified Drosophila germline stem cells. **Dev Biol**, v. 283, n. 2, p. 486-502, Jul 2005. ISSN 0012-1606. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927177> >.

- KAPASI, P. et al. L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. **Mol Cell**, v. 25, n. 1, p. 113-26, Jan 2007. ISSN 1097-2765. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218275> >.
- KAPP, L. D.; LORSCH, J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 657-704, 2004. ISSN 0066-4154. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189156> >.
- KARDOS, G. R.; DAI, M. S.; ROBERTSON, G. P. Growth inhibitory effects of large subunit ribosomal proteins in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 27, n. 5, p. 801-12, Sep 2014. ISSN 1755-148X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807543> >.
- KASAI, H. et al. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. **J Histochem Cytochem**, v. 51, n. 5, p. 567-74, May 2003. ISSN 0022-1554. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704204> >.
- KEELING, K. M.; BEDWELL, D. M. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. **J Mol Med (Berl)**, v. 80, n. 6, p. 367-76, Jun 2002. ISSN 0946-2716. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072912> >.
- KHATTER, H. et al. Structure of the human 80S ribosome. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 640-5, Apr 2015. ISSN 1476-4687. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25901680> >.
- KIM, T. H.; LESLIE, P.; ZHANG, Y. Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability. **Oncotarget**, v. 5, n. 4, p. 860-71, Feb 2014. ISSN 1949-2553. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658219> >.
- KIRCHNER, S.; IGNATOVA, Z. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. **Nat Rev Genet**, v. 16, n. 2, p. 98-112, Feb 2015. ISSN 1471-0064. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534324> >.
- KOBAYASHI, T. et al. Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. **Int J Mol Med**, v. 18, n. 1, p. 161-70, Jul 2006. ISSN 1107-3756. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16786168> >.
- KOMAR, A. A.; HATZOGLU, M. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. **Cell Cycle**, v. 10, n. 2, p. 229-40, Jan 2011. ISSN 1551-4005. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220943> >.
- KOMAROVA, N. Stochastic modeling of drug resistance in cancer. **J Theor Biol**, v. 239, n. 3, p. 351-66, Apr 2006. ISSN 0022-5193. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194548> >.
- KONDRASHOV, N. et al. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 383-97, Apr 2011. ISSN 1097-4172. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529712> >.

KORNEEVA, N. L. et al. Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 52, p. 41369-76, Dec 2000. ISSN 0021-9258. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022043> >.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, Feb 23 2007. ISSN 0092-8674.

KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 20, p. 8125-48, Oct 26 1987a. ISSN 0305-1048.

KOZAK, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. **J Mol Biol**, v. 196, n. 4, p. 947-50, Aug 1987b. ISSN 0022-2836. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3681984> >.

KRIEG, J.; HOFSTEENGE, J.; THOMAS, G. Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. **J Biol Chem**, v. 263, n. 23, p. 11473-7, Aug 1988. ISSN 0021-9258. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3403539> >.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 8, p. 626-37, Aug 2003. ISSN 1471-0056.

KURLAND, C. G. et al. Physical and functional heterogeneity of E. coli ribosomes. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 34, p. 17-24, 1969. ISSN 0091-7451. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4909497> >.

LABARGE, M. A.; BISSELL, M. J. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? **J Clin Invest**, v. 118, n. 6, p. 2021-4, Jun 2008. ISSN 0021-9738. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497883> >.

LAFONTAINE, D. L. A 'garbage can' for ribosomes: how eukaryotes degrade their ribosomes. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 5, p. 267-77, May 2010. ISSN 0968-0004. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097077> >.

LAI, M. D.; XU, J. Ribosomal proteins and colorectal cancer. **Curr Genomics**, v. 8, n. 1, p. 43-9, Mar 2007. ISSN 1389-2029. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645623> >.

LAKE, J. A. Ribosome structure determined by electron microscopy of Escherichia coli small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 105, n. 1, p. 131-159, 1976/07/25 1976. ISSN 0022-2836. < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002228367690200X> >.

LAMB, R. et al. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. **Oncotarget**, v. 6, n. 7, p. 4569-84, Mar 2015. ISSN 1949-2553. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625193> >.

LAPIDOT, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645-8, Feb 1994. ISSN 0028-0836.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509044> >.

LAURENT, G.; KISHORE, B. K.; TULKENS, P. M. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. **Biochem Pharmacol**, v. 40, n. 11, p. 2383-92, Dec 1990. ISSN 0006-2952. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268362> >.

LAVERGNE, J. P. et al. Role of acidic phosphoproteins in the partial reconstitution of the active 60 S ribosomal subunit. **FEBS Lett**, v. 216, n. 1, p. 83-8, May 1987. ISSN 0014-5793. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3582668> >.

LAVERGNE, J. P. et al. Reconstitution of the active rat liver 60 S ribosomal subunit from different preparations of core particles and split proteins. **FEBS Lett**, v. 236, n. 2, p. 345-51, Aug 1988. ISSN 0014-5793. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3044828> >.

LE GUELTE, A.; DWYER, J.; GAVARD, J. Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer. **Biol Cell**, v. 103, n. 12, p. 593-605, Dec 2011. ISSN 1768-322X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054419> >.

LE, S.; STERNGLANZ, R.; GREIDER, C. W. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 3, p. 999-1010, Mar 2000. ISSN 1059-1524. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712515> >.

LEE, S. W. et al. Direct mass spectrometric analysis of intact proteins of the yeast large ribosomal subunit using capillary LC/FTICR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 5942-7, Apr 2002. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983894> >.

LEI, E. P.; SILVER, P. A. Protein and RNA export from the nucleus. **Dev Cell**, v. 2, n. 3, p. 261-72, Mar 2002. ISSN 1534-5807. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879632> >.

LI, P. et al. Identification of nucleolus-localized PTEN and its function in regulating ribosome biogenesis. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 10, p. 6383-90, Oct 2014. ISSN 1573-4978. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969487> >.

LI, X. et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N(1)-methyladenosine methylome. **Nat Chem Biol**, v. 12, n. 5, p. 311-6, May 2016. ISSN 1552-4469. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26863410> >.

LI, Z.; RICH, J. N. Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 345, p. 21-30, 2010. ISSN 0070-217X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582533> >.

LIANG, X. H.; LIU, Q.; FOURNIER, M. J. Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. **RNA**, v. 15, n. 9, p. 1716-28, Sep 2009. ISSN 1469-9001. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628622> >.

LIAO, G. et al. Control of cell migration through mRNA localization and local translation. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1757-7012.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264217> >.

LIAO, J. M. et al. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. **Oncogene**, v. 33, n. 41, p. 4916-23, Oct 2014. ISSN 1476-5594. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141778> >.

LOPES, A. M. et al. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. **BMC Mol Biol**, v. 11, p. 33, May 2010. ISSN 1471-2199. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459660> >.

LÉGER-SILVESTRE, I. et al. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. **EMBO J**, v. 23, n. 12, p. 2336-47, Jun 2004. ISSN 0261-4189. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15167894> >.

MACARI, F. et al. TRM6/61 connects PKC α with translational control through tRNAi(Met) stabilization: impact on tumorigenesis. **Oncogene**, v. 35, n. 14, p. 1785-96, Apr 2016. ISSN 1476-5594. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26234676> >.

MACEJAK, D. G.; SARNOW, P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. **Nature**, v. 353, n. 6339, p. 90-4, Sep 1991. ISSN 0028-0836. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652694> >.

MALAGOBADAN, S.; NAGOOR, N. H. Evaluation of MicroRNAs Regulating Anoikis Pathways and Its Therapeutic Potential. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 716816, 2015. ISSN 2314-6141. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26587543> >.

MALYGIN, A. A. et al. Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 19, p. 6414-23, 2007. ISSN 1362-4962. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881366> >.

MARCATO, P. et al. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1378-84, May 2011. ISSN 1551-4005. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21552008> >.

MARCEL, V. et al. p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. **Cancer Cell**, v. 24, n. 3, p. 318-30, Sep 2013. ISSN 1878-3686. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24029231> >.

MAURO, V. P.; EDELMAN, G. M. The ribosome filter hypothesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12031-6, Sep 2002. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221294> >.

MAURO, V. P.; EDELMAN, G. M. The ribosome filter redux. **Cell Cycle**, v. 6, n. 18, p. 2246-51, Sep 2007. ISSN 1551-4005. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890902> >.

MAYER, C.; GRUMMT, I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. **Oncogene**, v. 25, n. 48, p. 6384-91, Oct 2006. ISSN 0950-9232.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041624> >.

MAZUMDER, B. et al. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 187-98, Oct 2003. ISSN 0092-8674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567916> >.

MAŠEK, T.; VALÁŠEK, L.; POSPÍŠEK, M. Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients. **Methods Mol Biol**, v. 703, p. 293-309, 2011. ISSN 1940-6029. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125498> >.

MCCLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 21, n. 2, p. 294-326, 1934// 1934. ISSN 1432-0878. < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00374060> >.

MCQUILLEN, K.; ROBERTS, R. B.; BRITTEN, R. J. Synthesis of nascent protein by ribosomes in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 45, n. 9, p. 1437-1447, 1959. ISSN 0027-8424. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC222733/> >.

MCREYNOLDS, L. J. et al. Smad1 and Smad5 differentially regulate embryonic hematopoiesis. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3881-90, Dec 2007. ISSN 0006-4971. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761518> >.

MEDIONI, C.; MOWRY, K.; BESSE, F. Principles and roles of mRNA localization in animal development. **Development**, v. 139, n. 18, p. 3263-76, Sep 2012. ISSN 1477-9129. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22912410> >.

MELCHIOR, J. B.; TARVER, H. Studies in protein synthesis in vitro; on the synthesis of labeled cystine (S35) and its attempted use as a tool in the study of protein synthesis. **Arch Biochem**, v. 12, n. 2, p. 301-8, Feb 1947. ISSN 0096-9621. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20283582> >.

MELNIKOV, S. et al. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. **Nat Struct Mol Biol**, v. 19, n. 6, p. 560-567, 06//print 2012. ISSN 1545-9993. < <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2313> >.

MENDEZ, R.; RICHTER, J. D. Translational control by CPEB: a means to the end. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 7, p. 521-9, Jul 2001. ISSN 1471-0072. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433366> >.

MERIC, F. et al. Masking and unmasking maternal mRNA. The role of polyadenylation, transcription, splicing, and nuclear history. **J Biol Chem**, v. 271, n. 48, p. 30804-10, Nov 1996. ISSN 0021-9258. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940061> >.

MERRICK, W. C.; HERSHEY, J. W. B. **2 The Pathway and Mechanism of Eukaryotic Protein Synthesis**. 1996. < <https://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/3303> >.

- MEYER, K. D. et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1635-46, Jun 2012. ISSN 1097-4172. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22608085> >.
- MEYUHAS, O.; DREAZEN, A. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 90, p. 109-53, 2009. ISSN 1878-0814. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374740> >.
- MIGNONE, F. et al. Untranslated regions of mRNAs. In: (Ed.). **Genome Biol.** London, v.3, 2002. p.reviews0004.1-reviews0004.10. ISBN 1465-6906.
- MILKEREIT, P. et al. Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. **Cell**, v. 105, n. 4, p. 499-509, May 2001. ISSN 0092-8674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371346> >.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: nephrotoxicity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 5, p. 1003-12, May 1999. ISSN 0066-4804. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223907> >.
- MIYAMOTO-SATO, E. et al. Specific bonding of puromycin to full-length protein at the C-terminus. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 5, p. 1176-82, Mar 2000. ISSN 1362-4962. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666460> >.
- MOCCIA, R. et al. An unbiased cDNA library prepared from isolated Aplysia sensory neuron processes is enriched for cytoskeletal and translational mRNAs. **J Neurosci**, v. 23, n. 28, p. 9409-17, Oct 2003. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561869> >.
- MOERLAND, E. et al. Exclusion of BBC1 and CMAR as candidate breast tumour-suppressor genes. **Br J Cancer**, v. 76, n. 12, p. 1550-3, 1997. ISSN 0007-0920. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413939> >.
- MOKREJS, M. et al. IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D131-6, Jan 2010. ISSN 1362-4962. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917642> >.
- MOROZ, L. L. et al. Neuronal transcriptome of Aplysia: neuronal compartments and circuitry. **Cell**, v. 127, n. 7, p. 1453-67, Dec 2006. ISSN 0092-8674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190607> >.
- MUKHOPADHYAY, R. et al. The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 7, p. 324-31, Jul 2009. ISSN 0968-0004. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535251> >.
- MULLINEUX, S. T.; LAFONTAINE, D. L. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? **Biochimie**, v. 94, n. 7, p. 1521-32, Jul 2012. ISSN 0300-9084.

- MÉLÈSE, T.; XUE, Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, n. 3, p. 319-24, Jun 1995. ISSN 0955-0674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7662360> >.
- NAORA, H.; TAKAI, I.; ADACHI, M. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis. **J Cell Biol**, v. 141, n. 3, p. 741-53, May 1998. ISSN 0021-9525. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566973> >.
- NARLA, A.; EBERT, B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. **Blood**, v. 115, n. 16, p. 3196-205, Apr 2010. ISSN 1528-0020. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194897> >.
- NATHANS, D. Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of puromycin into peptide chains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 51, p. 585-92, Apr 1964. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14166766> >.
- NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 220-8, Mar 2010. ISSN 1471-0080. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177397> >.
- NEWBURY, S. F. Control of mRNA stability in eukaryotes. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 1, p. 30-4, Feb 2006. ISSN 0300-5127. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246172> >.
- NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-84, Apr 2009. ISSN 1474-1768. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308067> >.
- NI, J. Q. et al. Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. **Genes Dev**, v. 20, n. 14, p. 1959-73, Jul 2006. ISSN 0890-9369. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816001> >.
- NICOLAS, E. et al. Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. **Nat Commun**, v. 7, p. 11390, Jun 2016. ISSN 2041-1723. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27265389> >.
- NIERHAUS, K. H.; DOHME, F. Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 12, p. 4713-7, Dec 1974. ISSN 0027-8424.
- NISHIMURA, K. et al. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. **Nat Methods**, v. 6, n. 12, p. 917-22, Dec 2009. ISSN 1548-7105. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915560> >.
- NOMOTO, A.; LEE, Y. F.; WIMMER, E. The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with m7G(5')ppp(5')Np. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 2, p. 375-80, Feb 1976. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/174106> >.

NOVETSKY, A. P. et al. Frequent mutations in the RPL22 gene and its clinical and functional implications. **Gynecol Oncol**, v. 128, n. 3, p. 470-4, Mar 2013. ISSN 1095-6859. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127973> >.

NURNBERGER, J. I. Cell growth and cell function. A cytochemical study. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 3, n. 1, p. 120-121, ISSN 0013-4694. < [http://dx.doi.org/10.1016/0013-4694\(51\)90071-5](http://dx.doi.org/10.1016/0013-4694(51)90071-5) >.

O'BRIEN, C. A. et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 106-10, Jan 2007. ISSN 1476-4687. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122772> >.

O'DONOHUE, M. F. et al. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. **J Cell Biol**, v. 190, n. 5, p. 853-66, Sep 2010. ISSN 1540-8140. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819938> >.

O'LEARY, M. N. et al. The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl22l1. **PLoS Genet**, v. 9, n. 8, p. e1003708, 2013. ISSN 1553-7404. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990801> >.

ODINTSOVA, T. I. et al. Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. **J Protein Chem**, v. 22, n. 3, p. 249-58, Apr 2003. ISSN 0277-8033. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962325> >.

OHMAYER, U. et al. Studies on the assembly characteristics of large subunit ribosomal proteins in *S. cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68412, 2013. ISSN 1932-6203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874617> >.

OLSZEWSKI, U. et al. Overexpression of CYP3A4 in a COLO 205 Colon Cancer Stem Cell Model in vitro. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 1467-79, Mar 2011. ISSN 2072-6694. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212669> >.

OLVERA, J.; WOOL, I. G. The primary structure of rat ribosomal protein L13. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 201, n. 1, p. 102-7, May 1994. ISSN 0006-291X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198561> >.

ORSOLIC, I. et al. The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms. **Semin Cancer Biol**, v. 37-38, p. 36-50, Jun 2016. ISSN 1096-3650. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26721423> >.

PALADE, G. E. A small particulate component of the cytoplasm. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 1, n. 1, p. 59-68, Jan 1955. ISSN 0095-9901.

PALADE, G. E.; SIEKEVITZ, P. Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study, **J Biophys Biochem Cytol**, v. 2, n. 2, p. 171-200, 1956a. <http://jcb.rupress.org/content/2/2/171/tab-pdf>

PALADE, G. E.; SIEKEVITZ, P. Pancreatic microsomes. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 2, n. 6, p. 671-690, 1956b. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2224000/> >

PANSE, V. G.; JOHNSON, A. W. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 5, p. 260-6, May 2010. ISSN 0968-0004. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137954> >.

PELLETIER, J.; SONENBERG, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 320-5, Jul 1988. ISSN 0028-0836. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2839775> >.

PERRY, R. P. THE CELLULAR SITES OF SYNTHESIS OF RIBOSOMAL AND 4S RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, n. 12, p. 2179-2186, 1962. ISSN 0027-8424 1091-6490. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC221141/> >.

PETERMANN, M. L. The macromolecular nucleoprotein particles of normal rat liver and azo-dye induced liver tumors. **Tex Rep Biol Med**, v. 12, n. 4, p. 921-30, 1954. ISSN 0040-4675. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13238263> >.

PETERMANN, M. L.; HAMILTON, M. G. An Ultracentrifugal Analysis of the Macromolecular Particles of Normal and Leukemic Mouse Spleen. **Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 373-378, 1952.

PETERMANN, M. L.; HAMILTON, M. G. The purification and properties of cytoplasmic ribonucleoprotein from rat liver. **J Biol Chem**, v. 224, n. 2, p. 725-36, Feb 1957. ISSN 0021-9258. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13405901> >.

PETERMANN, M. L.; HAMILTON, M. G.; MIZEN, N. A. Electrophoretic analysis of the macromolecular nucleoprotein particles of mammalian cytoplasm. **Cancer Res**, v. 14, n. 5, p. 360-6, Jun 1954. ISSN 0008-5472. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160964> >.

PETERMANN, M. L.; MIZEN, N. A.; HAMILTON, M. G. The macromolecular particles of normal and regenerating rat liver. **Cancer Res**, v. 13, n. 4-5, p. 372-5, 1953 Apr-May 1953. ISSN 0008-5472. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13042835> >.

PEĆINA-ŠLAUS, N.; PEĆINA, M. Only one health, and so many omics. **Cancer Cell Int**, v. 15, p. 64, 2015. ISSN 1475-2867. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101467> >.

PHIZICKY, E. M.; HOPPER, A. K. tRNA biology charges to the front. **Genes Dev**, v. 24, n. 17, p. 1832-60, Sep 2010. ISSN 1549-5477. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810645> >.

PICHON, X. et al. Visualization of single endogenous polysomes reveals the dynamics of translation in live human cells. **J Cell Biol**, v. 214, n. 6, p. 769-81, Sep 2016. ISSN 1540-8140. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27597760> >.

PILIPENKO, E. V. et al. Conservation of the secondary structure elements of the 5'-untranslated region of cardio- and aphthovirus RNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 17, n. 14, p. 5701-11, Jul 1989. ISSN 0305-1048. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548167> >.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2059-72, Jun 2010. ISSN 1528-0012. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420946> >.

PISAREV, A. V. et al. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. **Mol Cell**, v. 37, n. 2, p. 196-210, Jan 2010. ISSN 1097-4164. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122402> >.

PLANQUE, C. et al. Pregnane X-receptor promotes stem cell-mediated colon cancer relapse. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56558-56573, Aug 2016. ISSN 1949-2553. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448961> >.

POGUE-GEILE, K. et al. Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 3842-9, Aug 1991. ISSN 0270-7306. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1712897> >.

POPP, W.; WACHTLER, F. Changes in nucleolar structure, number and size in cellular activation and inactivation. Observations in human phytohaemagglutinin-treated lymphocytes. **Cell Tissue Res**, v. 234, n. 2, p. 377-88, 1983. ISSN 0302-766X.

POSWILLO, D. The pathogenesis of the Treacher Collins syndrome (mandibulofacial dysostosis). **Br J Oral Surg**, v. 13, n. 1, p. 1-26, Jul 1975. ISSN 0007-117X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/807232> >.

PÖLL, G. et al. rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8249, Dec 2009. ISSN 1932-6203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20011513> >.

RAMAGOPAL, S. Covalent modifications of ribosomal proteins in growing and aggregation-competent dictyostelium discoideum: phosphorylation and methylation. **Biochem Cell Biol**, v. 69, n. 4, p. 263-8, Apr 1991. ISSN 0829-8211. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2054158> >.

RAMAGOPAL, S.; ENNIS, H. L. Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of Dictyostelium discoideum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 5, p. 3083-7, May 1981. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16593020> >.

RAO, S. et al. Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. **Blood**, v. 120, n. 18, p. 3764-73, Nov 2012. ISSN 1528-0020. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22976955> >.

RETZ, K. C.; STEELE, W. J. Ribosome turnover in rat brain and liver. **Life Sci**, v. 27, n. 25-26, p. 2601-4, 1980 Dec 22-29 1980. ISSN 0024-3205.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012513> >.

RICHICHI, C. et al. Marker-independent method for isolating slow-dividing cancer stem cells in human glioblastoma. **Neoplasia**, v. 15, n. 7, p. 840-7, Jul 2013. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23814495> >.

RITOSSA, F. M.; SPIEGELMAN, S. Localization of dna complementary to ribosomal rna in the nucleolus organizer region of drosophila melanogaster. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 53, n. 4, p. 737-745, 1965. ISSN 0027-8424 1091-6490. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC221060/> >.

ROBLEDO, S. et al. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. **RNA**, v. 14, n. 9, p. 1918-29, Sep 2008. ISSN 1469-9001. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697920> >.

ROCCHI, L. et al. Dyskerin depletion increases VEGF mRNA internal ribosome entry site-mediated translation. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 17, p. 8308-18, Sep 2013. ISSN 1362-4962. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23821664> >.

ROSETTANI, P. et al. Structures of the human eIF4E homologous protein, h4EHP, in its m7GTP-bound and unliganded forms. **J Mol Biol**, v. 368, n. 3, p. 691-705, May 2007. ISSN 0022-2836. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368478> >.

ROSSI, A. et al. Evidences for a leaky scanning mechanism for the synthesis of the shorter M23 protein isoform of aquaporin-4: implication in orthogonal array formation and neuromyelitis optica antibody interaction. **J Biol Chem**, v. 285, n. 7, p. 4562-9, Feb 2010. ISSN 1083-351X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007705> >.

ROTHBLUM, L. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. A. A. Hadjiolov. **The Quarterly Review of Biology**, v. 61, n. 1, p. 89-89, 1986/03/01 1986. ISSN 0033-5770. < <https://doi.org/10.1086/414760> >.

ROUT, M. P.; BLOBEL, G.; AITCHISON, J. D. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 715-25, May 1997. ISSN 0092-8674. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182759> >.

ROUX, P. P. et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 19, p. 14056-64, May 2007. ISSN 0021-9258. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360704> >.

RUGGERO, D. The role of Myc-induced protein synthesis in cancer. **Cancer Res**, v. 69, n. 23, p. 8839-43, Dec 2009. ISSN 1538-7445. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934336> >.

RUVINSKY, I. et al. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. **Genes Dev**, v. 19, n. 18, p. 2199-211, Sep 2005. ISSN 0890-9369. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166381> >.

RYAZANOV, A. G.; DAVYDOVA, E. K. Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation. **FEBS Lett**, v. 251, n. 1-2, p. 187-90, Jul 1989. ISSN 0014-5793.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2753158> >.

SAFER, B. Nomenclature of initiation, elongation and termination factors for translation in eukaryotes. Recommendations 1988. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). **Eur J Biochem**, v. 186, n. 1-2, p. 1-3, Dec 08 1989. ISSN 0014-2956.

SCHACHT, J. Biochemistry and pharmacology of aminoglycoside-induced hearing loss. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam**, v. 49, n. 4, p. 251-6, 1999. ISSN 0327-6309. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797868> >.

SCHAEFER, E. et al. Autosomal recessive POLR1D mutation with decrease of TCOF1 mRNA is responsible for Treacher Collins syndrome. **Genet Med**, v. 16, n. 9, p. 720-4, Sep 2014. ISSN 1530-0366. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603435> >.

SCHLOSSER, I. et al. A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 21, p. 6148-56, Nov 2003. ISSN 1362-4962.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576301> >.

SCHMEICHEL, K. L.; BISSELL, M. J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 12, p. 2377-88, Jun 2003. ISSN 0021-9533.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766184> >.

SCHMEING, T. M.; RAMAKRISHNAN, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1234-42, Oct 29 2009. ISSN 0028-0836.

SCHMIDT, E. K. et al. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. **Nat Methods**, v. 6, n. 4, p. 275-7, Apr 2009. ISSN 1548-7105.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19305406> >.

SCHWANHAUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337-42, May 19 2011. ISSN 0028-0836.

SCHÄRER-HERNÁNDEZ, N.; HOHN, T. Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA in transgenic tobacco plants. **Virology**, v. 242, n. 2, p. 403-13, Mar 1998. ISSN 0042-6822. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9514980> >.

SENGER, B. et al. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. **Mol Cell**, v. 8, n. 6, p. 1363-73, Dec 2001. ISSN 1097-2765.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779510> >.

SENGUPTA, J. et al. Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. **J Cell Biol**, v. 189, n. 7, p. 1079-86, Jun 2010. ISSN 1540-8140. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20584915> >.

SHANKAR, J. et al. Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. **Cancer Res**, v. 70, n. 9, p. 3780-90, May 2010. ISSN 1538-7445. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388789> >.

SHARP, M. G. et al. A sequence previously identified as metastasis-related encodes an acidic ribosomal phosphoprotein, P2. **Br J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 83-8, Jan 1990. ISSN 0007-0920. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153399> >.

SHAW, P. J. Nucleolus. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 9780470015902.

SHIGENOBU, S. et al. Isolation of germline cells from Drosophila embryos by flow cytometry. **Dev Growth Differ**, v. 48, n. 1, p. 49-57, Jan 2006. ISSN 0012-1592. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16466393> >.

SHIGENOBU, S. et al. Molecular characterization of embryonic gonads by gene expression profiling in Drosophila melanogaster. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 37, p. 13728-33, Sep 2006. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950879> >.

SHOEMAKER, C. J.; GREEN, R. Translation drives mRNA quality control. **Nat Struct Mol Biol**, v. 19, n. 6, p. 594-601, Jun 2012. ISSN 1545-9985. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664987> >.

SHU-NU, C.; LIN, C. H.; LIN, A. An acidic amino acid cluster regulates the nucleolar localization and ribosome assembly of human ribosomal protein L22. **FEBS Lett**, v. 484, n. 1, p. 22-8, Oct 2000. ISSN 0014-5793. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11056215> >.

SHUKLA, G. C.; SINGH, J.; BARIK, S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. **Mol Cell Pharmacol**, v. 3, n. 3, p. 83-92, 2011. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468167> >.

SOKABE, M.; FRASER, C. S. Human eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAⁱ ternary complex and eIF3 stabilize the 43 S preinitiation complex. **J Biol Chem**, v. 289, n. 46, p. 31827-36, Nov 2014. ISSN 1083-351X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246524> >.

SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B.; MATHEWS, M. B. **Translational control of gene expression**. 2000. < <https://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/3231> >.

SONG, M. J. et al. RPL36 as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. **Pathol Int**, v. 61, n. 11, p. 638-44, Nov 2011. ISSN 1440-1827. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029674> >.

SOSSIN, W. S.; DESGROSEILLERS, L. Intracellular trafficking of RNA in neurons. **Traffic**, v. 7, n. 12, p. 1581-9, Dec 2006. ISSN 1398-9219. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17054760> >.

SPAHN, C. M. T. et al. Structure of the 80S Ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-Ribosome and Subunit-Subunit Interactions. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 373-386, 11/2/2001. ISSN 0092-8674.

< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867401005396> >.

SPRIGGS, K. A. et al. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. **Biol Cell**, v. 100, n. 1, p. 27-38, Jan 2008. ISSN 1768-322X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18072942> >.

STARCK, S. R. et al. Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. **Science**, v. 351, n. 6272, p. aad3867, Jan 2016. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823435> >.

STARK, H. et al. The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. **Structure**, v. 3, n. 8, p. 815-21, Aug 15 1995. ISSN 0969-2126.

STRUNK, B. S.; KARBSTEIN, K. Powering through ribosome assembly. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2083-2104, 2009. ISSN 1355-8382.

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2779681/> >.

STUMPF, C. R.; RUGGERO, D. The cancerous translation apparatus. **Curr Opin Genet Dev**, v. 21, n. 4, p. 474-83, Aug 2011. ISSN 1879-0380.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21543223> >.

SUGIHARA, Y. et al. Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. **J Proteome Res**, v. 9, n. 3, p. 1351-66, Mar 2010. ISSN 1535-3907.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20063902> >.

SUN, X. et al. MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield. **Oncogene**, v. 33, n. 42, p. 4967-77, Oct 2014. ISSN 1476-5594.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24240682> >.

TAFFOREAU, L. et al. The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors. **Molecular Cell**, v. 51, n. 4, p. 539-551, 8/22/ 2013. ISSN 1097-2765.

< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276513005844> >.

TANENBAUM, M. E. et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. **Cell**, v. 159, n. 3, p. 635-46, Oct 2014. ISSN 1097-4172. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25307933> >.

TCHERKEZIAN, J. et al. Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 632-44, May 2010. ISSN 1097-4172. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434207> >.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 11, p. 847-59, Nov 2006. ISSN 1471-0072. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990790> >.

- TEKOTTE, H.; DAVIS, I. Intracellular mRNA localization: motors move messages. **Trends Genet**, v. 18, n. 12, p. 636-42, Dec 2002. ISSN 0168-9525.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446149> >.
- THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, Nov 2009. ISSN 1097-4172.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945376> >.
- THIRY, M.; LAFONTAINE, D. L. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. In: (Ed.). **Trends Cell Biol**. England, v.15, 2005. p.194-9. ISBN 0962-8924.
- TISSIERES, A.; WATSON, J. D. Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. **Nature**, v. 182, n. 4638, p. 778-80, Sep 20 1958. ISSN 0028-0836.
- TRAN, T. P. et al. Ribosome-targeting antibiotics as inhibitors of oncogenic microRNAs biogenesis: Old scaffolds for new perspectives in RNA targeting. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 17, p. 5334-44, Sep 2015. ISSN 1464-3391.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264847> >.
- TRAPMAN, J.; RETÈL, J.; PLANTA, R. J. Ribosomal precursor particles from yeast. **Exp Cell Res**, v. 90, n. 1, p. 95-104, Jan 1975. ISSN 0014-4827.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1122947> >.
- TRAUT, R. R.; MONRO, R. E. THE PUROMYCIN REACTION AND ITS RELATION TO PROTEIN SYNTHESIS. **J Mol Biol**, v. 10, p. 63-72, Oct 1964. ISSN 0022-2836.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14222897> >.
- TSAI, J. H.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. **Genes Dev**, v. 27, n. 20, p. 2192-206, Oct 2013. ISSN 1549-5477.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142872> >.
- TSCHOCHNER, H.; HURT, E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. **Trends Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 255-63, May 2003. ISSN 0962-8924.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742169> >.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-92, Oct 2011. ISSN 1097-4172.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000009> >.
- VALDEZ, B. C. et al. 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**, v. 101, n. 29, p. 10709-14, Jul 2004. ISSN 0027-8424.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249688> >.
- VAN DUIN, J.; KURLAND, C. G. Functional heterogeneity of the 30S ribosomal subunit of E. coli. **Mol Gen Genet**, v. 109, n. 2, p. 169-76, 1970. ISSN 0026-8925. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4923592> >.

- VAN RIGGELEN, J.; YETIL, A.; FELSHER, D. W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 4, p. 301-9, Apr 2010. ISSN 1474-1768. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332779> >.
- VASILIEV, V. D. Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data. **Acta Biol Med Ger**, v. 33, n. 5-6, p. 779-93, 1974. ISSN 0001-5318.
- VATTEM, K. M.; WEK, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 31, p. 11269-74, Aug 2004. ISSN 0027-8424. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15277680> >.
- VERMEULEN, L. et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 36, p. 13427-32, Sep 2008. ISSN 1091-6490. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765800> >.
- VILLAESCUSA, J. C. et al. Cytoplasmic Prep1 interacts with 4EHP inhibiting Hoxb4 translation. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5213, 2009. ISSN 1932-6203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365557> >.
- VISINTIN, R.; AMON, A. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. In: (Ed.). **Curr Opin Cell Biol**. England, v.12, 2000. p.372-7. ISBN 0955-0674.
- WANG, X. et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase activity is controlled by multiple inputs from oncogenic signaling. **Mol Cell Biol**, v. 34, n. 22, p. 4088-103, Nov 2014. ISSN 1098-5549. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182533> >.
- WANG, X. et al. N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. **Cell**, v. 161, n. 6, p. 1388-99, Jun 2015. ISSN 1097-4172. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046440> >.
- WARNER, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 11, p. 437-40, Nov 1999. ISSN 0968-0004.
- WATKINS, N. J.; BOHNSACK, M. T. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 3, n. 3, p. 397-414, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1757-7012. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065625> >.
- WATKINS-CHOW, D. E. et al. Mutation of the diamond-blackfan anemia gene Rps7 in mouse results in morphological and neuroanatomical phenotypes. **PLoS Genet**, v. 9, n. 1, p. e1003094, 2013. ISSN 1553-7404. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382688> >.
- WEIJERS, D. et al. An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4289-99, Nov 2001. ISSN 0950-1991. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684664> >.

WEIS, B. L.; SCHLEIFF, E.; ZERGES, W. Protein targeting to subcellular organelles via mRNA localization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 2, p. 260-73, Feb 2013. ISSN 0006-3002.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1-15, Jan 2015. ISSN 1476-5586.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25622895> >.

WEISWALD, L. B. et al. Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. **Br J Cancer**, v. 101, n. 3, p. 473-82, Aug 2009. ISSN 1532-1827. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603013> >.

WILD, T. et al. A Protein Inventory of Human Ribosome Biogenesis Reveals an Essential Function of Exportin 5 in 60S Subunit Export. **PLOS Biology**, v. 8, n. 10, p. e1000522, 2010. < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000522> >.

WONG, Q. W. et al. RPL39L is an example of a recently evolved ribosomal protein paralog that shows highly specific tissue expression patterns and is upregulated in ESCs and HCC tumors. **RNA Biol**, v. 11, n. 1, p. 33-41, 2014. ISSN 1555-8584.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452241> >.

WOOD, J. et al. Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins. **J Virol**, v. 75, n. 3, p. 1348-58, Feb 2001. ISSN 0022-538X.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152508> >.

WOOL, I. G. The structure and function of eukaryotic ribosomes. **Annu Rev Biochem**, v. 48, p. 719-54, 1979. ISSN 0066-4154.

WOOLFORD, J. L.; BASERGA, S. J. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 195, n. 3, p. 643-681, 05/31/received 08/26/accepted 2013. ISSN 0016-6731 1943-2631.

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813855/> >.

WU, N. et al. Ribosomal L22-like1 (RPL22L1) Promotes Ovarian Cancer Metastasis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143659, 2015. ISSN 1932-6203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26618703> >.

XI, Q.; CUESTA, R.; SCHNEIDER, R. J. Regulation of translation by ribosome shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs. **J Virol**, v. 79, n. 9, p. 5676-83, May 2005. ISSN 0022-538X.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827182> >.

XUE, S. et al. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. **Nature**, v. 517, n. 7532, p. 33-8, Jan 2015. ISSN 1476-4687.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409156> >.

YANG, C. L.; DU, X. H.; HAN, Y. X. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. **Ren Fail**, v. 17, n. 1, p. 21-6, Jan 1995. ISSN 0886-022X. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7770640> >.

YANG, M. et al. Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer. **Med Oncol**, v. 30, n. 3, p. 646, 2013. ISSN 1559-131X.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797773> >.

YANG, W.; HINNEBUSCH, A. G. Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 11, p. 6603-16, Nov 1996. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887689> >.

YANG, Z. Y. et al. Metalloproteinase-1 regulates invasion and migration of gastric cancer cells partially through integrin β 4. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 12, p. 2851-60, Dec 2013. ISSN 1460-2180. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803695> >.

YIN, A. H. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 5002-12, Dec 1997. ISSN 0006-4971.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389720> >.

YOON, A. et al. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 902-6, May 2006. ISSN 1095-9203. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690864> >.

YU, Y. et al. Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: native and HCV IRES-bound complexes. **Protein Sci**, v. 14, n. 6, p. 1438-46, Jun 2005. ISSN 0961-8368. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15883184> >.

YUEH, A.; SCHNEIDER, R. J. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. **Genes Dev**, v. 14, n. 4, p. 414-21, Feb 2000. ISSN 0890-9369. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691734> >.

YUSUPOV, M. M. et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. **Science**, v. 292, n. 5518, p. 883-96, May 04 2001. ISSN 0036-8075.

YUSUPOVA, G. Z. et al. The path of messenger RNA through the ribosome. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 233-41, Jul 2001. ISSN 0092-8674.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511350> >.

ZEMP, I.; KUTAY, U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. **FEBS Lett**, v. 581, n. 15, p. 2783-93, Jun 2007. ISSN 0014-5793.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509569> >.

ZHANG, Y. et al. Control of hematopoietic stem cell emergence by antagonistic functions of ribosomal protein paralogs. **Dev Cell**, v. 24, n. 4, p. 411-25, Feb 2013. ISSN 1878-1551.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449473> >.

ZHANG, Y.; LU, H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. **Cancer Cell**, v. 16, n. 5, p. 369-77, Nov 2009. ISSN 1878-3686.
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878869> >.

Bibliographie

ZHANG, Y. et al. Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl2211 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing. **Cell Rep**, v. 18, n. 2, p. 545-556, Jan 2017. ISSN 2211-1247. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28076796> >.

ZHOU, X. et al. Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity. **J Biol Chem**, v. 288, n. 30, p. 21793-801, Jul 2013. ISSN 1083-351X.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775087> >.

ZOMZELY, C. E. et al. Cerebral protein synthesis. I. Physical properties of cerebral ribosomes and polyribosomes. **J Mol Biol**, v. 19, n. 2, p. 455-68, Aug 1966. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5969075> >.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3406-15, Jul 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824337> >.

ANNEXES

ANNEXE I

Titre : “*TRM6/61 connects PKC α with translational control through tRNAⁱ^{MET} Stabilization: impact on tumorigenesis*”

Macari F, El-houfi Y, Boldina G, Xu H, Khoury-Hanna S, Ollier J, **Yazdani L**, Zheng G, Bièche I, Legrand N, Paulet D, Durrieu S, Byström A, Delbecq S, Lapeyre B, Pannequin J, Hollande F, Pan T, Teichmann M, Vagner S, David A, Choquet A *and* Joubert D



ORIGINAL ARTICLE

TRM6/61 connects PKC α with translational control through tRNA_i^{Met} stabilization: impact on tumorigenesis

F Macari^{1,2,3,18}, Y El-houfi^{1,2,3,18}, G Boldina^{4,5,6,7}, H Xu⁸, S Khoury-Hanna^{1,2,3}, J Ollier^{1,2,3}, L Yazdani^{1,2,3}, G Zheng⁹, I Bièche¹⁰, N Legrand^{1,2,3}, D Paulet¹¹, S Durrieu¹², A Byström⁸, S Delbecq¹³, B Lapeyre^{14,15}, L Bauchet¹⁶, J Pannequin^{1,2,3}, F Hollande^{1,2,3,17}, T Pan⁹, M Teichmann¹², S Vagner^{4,5,6,7}, A David^{1,2,3,19}, A Choquet^{1,2,3,19} and D Joubert^{1,2,3,19}

Accumulating evidence suggests that changes of the protein synthesis machinery alter translation of specific mRNAs and participate in malignant transformation. Here we show that protein kinase C α (PKC α) interacts with TRM61, the catalytic subunit of the TRM6/61 tRNA methyltransferase. The TRM6/61 complex is known to methylate the adenosine 58 of the initiator methionine tRNA (tRNA_i^{Met}), a nuclear post-transcriptional modification associated with the stabilization of this crucial component of the translation-initiation process. Depletion of TRM6/61 reduced proliferation and increased death of C6 glioma cells, effects that can be partially rescued by overexpression of tRNA_i^{Met}. In contrast, elevated TRM6/61 expression regulated the translation of a subset of mRNAs encoding proteins involved in the tumorigenic process and increased the ability of C6 cells to form colonies in soft agar or spheres when grown in suspension. In TRM6/61/tRNA_i^{Met}-overexpressing cells, PKC α overexpression decreased tRNA_i^{Met} expression and both colony- and sphere-forming potentials. A concomitant increase in TRM6/TRM61 mRNA and tRNA_i^{Met} expression with decreased expression of PKC α mRNA was detected in highly aggressive glioblastoma multiforme as compared with Grade II/III glioblastomas, highlighting the clinical relevance of our findings. Altogether, we suggest that PKC α tightly controls TRM6/61 activity to prevent translation deregulation that would favor neoplastic development.

Oncogene (2016) 35, 1785–1796; doi:10.1038/onc.2015.244; published online 3 August 2015

INTRODUCTION

Translation initiation is a rate-limiting step of gene expression, leading to the assembly of a fully functional 80S ribosome at the start codon of engaged mRNAs. It requires the recruitment of a 43S ribosome-initiation complex, which consists of 40S ribosomal subunit, the charged initiator methionyl-tRNA (tRNA_i^{Met}) and eukaryotic initiator factors (eIFs).^{1,2} Among them, eIF2, a heterotrimeric (α , β , γ) complex, is essential for the formation of a ternary complex eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} that delivers tRNA_i^{Met} to the P-site of ribosome.¹ In response to a wide range of stress, including hypoxia and nutrient deprivation, eIF2 α is phosphorylated and prevents eIF2 recycling for further ternary complex formation, leading to a global protein synthesis decrease with the exception of specific mRNAs involved in the stress response whose translation is increased.³ Low levels of ternary complex promote selective translation of downstream open reading frames and internal ribosome entry site-containing mRNAs.^{4,5} Although the involvement of eIF2 α phosphorylation in tumorigenic process has been thoroughly explored,⁶ it still remains unclear whether its molecular partner, tRNA_i^{Met}, could likewise contribute to disease evolution. tRNA_i^{Met} expression level relies on two finely controlled

mechanisms: transcription and stabilization. The latter is driven by methylation of the N1 position of adenosine at position 58 of T Ψ C loop (m1A58) by the TRM6/61 methyltransferase (MTase) complex, encoded by two essential genes in the yeast.^{7–9} This stabilization-based regulation is a hallmark of tRNA_i^{Met} that is remarkably conserved among eukaryotes,¹⁰ most likely to temper any excessive production of tRNA_i^{Met}. Indeed, elevated level of tRNA_i^{Met} has been previously correlated with reprogramming of global tRNA expression profile, augmented metabolic activity and cell proliferation.¹¹ An appealing hypothesis would be that elevated TRM6/61 MTase activity would contribute to sustain high tRNA_i^{Met} levels and favor malignant transformation and/or progression.

Most signaling pathways involved in cancer initiation and progression affect translational control. This is tied to the crucial role of the translational machinery in governing real-time gene expression, relentlessly adapting its activity to cellular needs and extracellular signaling cues. Our team has long been interested in protein kinase C (PKC) isoforms,^{12–14} major players of cell signaling pathways.¹⁵ In this study, we focused our attention on PKC α , a serine/threonine kinase that has a central role in diverse

¹Department of Oncology, CNRS, UMR-5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier, France; ²INSERM, U1191, Montpellier, France; ³Université de Montpellier, Montpellier, France; ⁴Institut Curie, Centre de Recherche, Orsay, France; ⁵CNRS UMR3348, Orsay, France; ⁶University Paris-Sud XI, Orsay, France; ⁷PSL Research University, Paris, France; ⁸Department of Molecular Biology, Umeå University Umeå Sweden; ⁹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, Chicago, IL, USA; ¹⁰Laboratory of Oncogenetic, Institut Curie, Hôpital René Huguenin, St-Cloud, France; ¹¹Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier, Montpellier, France; ¹²University of Bordeaux, Institut Européen de Chimie et Biologie, ARNA Laboratory, Pessac, France; ¹³Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université Montpellier 1, Montpellier, France; ¹⁴USR 3278, CNRS-UPHE-UPVD, CRILOBE, Moorea, French Polynesia; ¹⁵Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, CNRS-UMRS237, Montpellier, France; ¹⁶Department of Neurosurgery, Hôpital Gui de Chauliac, Montpellier, France and ¹⁷Molecular Mechanisms of Tumor Progression Laboratory, Department of Pathology, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia. Correspondence: Dr A David or Dr A Choquet, Department of Oncology, CNRS, UMR-5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, Montpellier 34094, France.

E-mail: amelle.choquet@igf.cnrs.fr or alexandre.david@igf.cnrs.fr

¹⁸These authors contributed equally to this work

¹⁹These authors jointly supervised this work.

Received 31 October 2014; revised 29 April 2015; accepted 16 May 2015; published online 3 August 2015

signaling pathways including those that trigger cell proliferation, differentiation and apoptosis. PKC α expression often correlates with tumor aggressiveness and increase resistance to drug treatments,^{16–18} although this issue is a matter of growing debate. In the particular case of primary brain tumor, high levels of PKC α were first associated with lower grade gliomas.¹⁹ By contrast, *in vitro* analysis revealed increased expression of PKC α in cell lines derived from glioblastoma multiforme (GBM),^{20,21} the most aggressive malignant primary brain tumor in humans. However, this last assumption was called into question when cell lines were compared with patient biopsies.²² Furthermore, besides its expression in gliomas, even the role played by this kinase throughout the tumorigenic process remains controversial.^{23–25}

While searching for new molecular partners of PKC α in a glioma context, we identified TRM61, the catalytic subunit of the TRM6/61 tetrameric MTase. In this study, we show that TRM6/61 overexpression sustains high levels of tRNA^{Met} and favors selective translation of mRNA that are frequently deregulated in cancer. Finally, we provide evidence that PKC α controls this process and has an anti-oncogenic role by restraining TRM6/61 activity.

RESULTS

PKC α interacts with TRM61 in the cytoplasm of mammalian cells. To identify new partners of PKC α , we immunoprecipitated this enzyme from the glioma cell line C6 cell lysates and separated proteins by two-dimensional (2D) gel analysis (Supplementary Figure 1A). Our attention was drawn to the presence of TRM61 (Figure 1a), the catalytic subunit of the 1-methyladenosine 58 methyltransferase (m1A58 Mtase), because of its peculiar function in tRNA processing, a growing topic of interest in cell biology and human health.²⁶ TRM61 association with PKC α was further confirmed by immunoblotting (Figure 1b). However, this interaction seemed disconnected from PKC α activity as phorbol 12-myristate 13-acetate, a potent activator of PKC α , had no effect on this association (Figure 1a).

Based on studies in yeast, TRM61 was believed to associate with TRM6 as an heterotetrameric complex (two subunits of each protein) and relocate to the nucleus where it could carry out its enzymatic function.²⁷ PKC α , on the other hand, is mainly expressed in the cytoplasm.²⁸ By immunofluorescence staining, we visualized PKC α in the cytoplasm and TRM6 in the nucleus, whereas TRM61 was found in both compartments (Figure 1c). Using fluorescence-tagged proteins (immunoblots in Supplementary Figure 1B), we recapitulated endogenous proteins' localization: TRM61-mCherry was found not only in the nucleus but also in the cytoplasm (Figure 1d), where it co-localizes with PKC α -green fluorescent protein (GFP). TRM6-mCherry localization was restricted to the nucleus (Figure 1e), in accordance with a predicted nuclear localization signal on its N-terminal end (Figure 1f). In yeast, TRM61 carries the predicted nuclear localization signal in place of TRM6 (Figure 1f) and, while both subunits associate to form the MTase complex, only TRM6 was co-immunoprecipitated with PKC1, unique PKC isoform present in yeast (Figure 1g). From this observation, we could draw two conclusions: first, although subtle variations may exist between

species, this molecular mechanism is conserved; second, this 'organism-specific' switch between TRM6 and TRM61 as molecular partner of PKC suggested a direct connection between PKC and TRM6/61 complex formation and/or activity. Building on this postulate, we then focused on elucidating the meaning of such regulation.

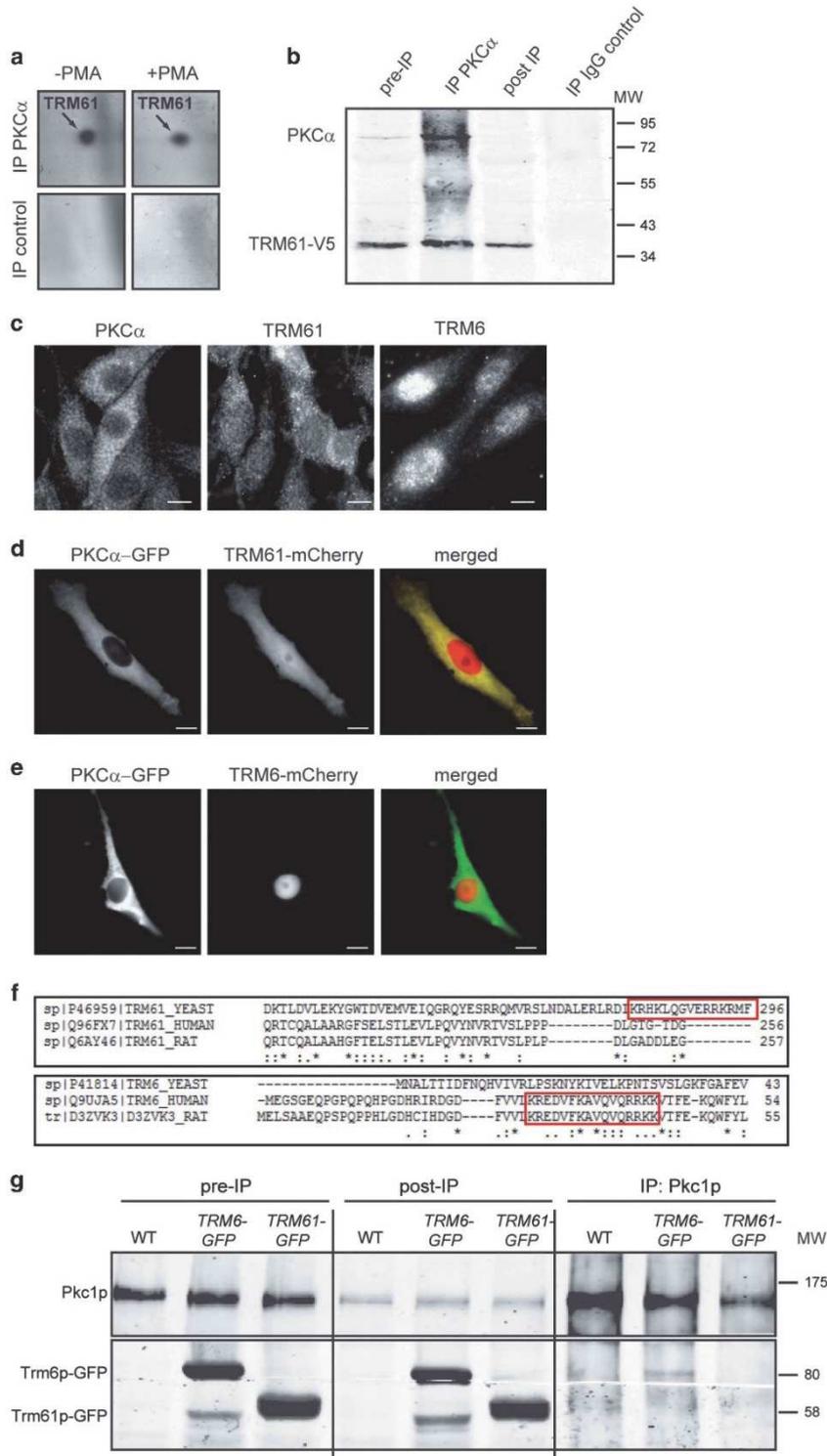
Trm6 and *Trm61* are essential genes in mammalian cells, crucial for tRNA^{Met} stabilization

The large majority of mammalian tRNAs contains m1A58 modifications, although most of them are 'optional' and might be associated with diverse but still unknown functions.²⁹ Only tRNA^{Met} stands out as an exception since its structural stability relies on efficient A58 methylation.^{7,8,30} Consequently, deletion of either TRM6 or TRM61 in yeast triggers selective and lethal reduction of steady-state tRNA^{Met}.⁹ Accordingly, in mammalian C6 cells, small interfering RNA (siRNA)-mediated depletion of either TRM6 or TRM61, or both (Figure 2a) decreased significantly cell growth (Figure 2b) and caused up to 50% of cell death following 72 h as visualized by annexin V staining (Figure 2c). This effect could be a direct consequence of tRNA^{Met} destabilization as tRNA^{Met} level is significantly reduced (about 40%) following 48 h of *Trm6/61* silencing (Figure 2d). Furthermore, increased tRNA^{Met}—but not tRNA^{Leu}—expression (Figure 2e) can partially counterbalance the lethal effect of TRM6/61 depletion (Figure 2f). Nevertheless, tRNA^{Met} overexpression cannot fully compensate for m1A58 Mtase activity loss, most probably because of the rapid degradation of unmethylated tRNA^{Met} by nuclear exosome complex.³⁰ In yeast, hypomodified tRNA^{Met} and 3'-end unprocessed tRNAs are polyadenylated by TRAMP complex, and then degraded by exonuclease Rex1p and exosome.³¹ Consequently, Rex1p deficiency triggers accumulation of precursor tRNA^{Met}. In C6 cells, silencing of *Rexo1* (Figure 2g), which encodes a mammalian homolog of yeast *REX1*, led to accumulation of tRNA^{Met}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Glu} (Figure 2h), suggesting similar degradation pathway between yeast and human.

TRM6/61 overexpression affects translational control

Controlling tRNA^{Met} stabilization may influence ternary complex availability and restrain 43S formation. Hence, we predicted that TRM6/61 activity could not only influence protein synthesis but also favor translation of selected mRNAs as was shown following eIF2 α phosphorylation.^{4,5} To verify this hypothesis, we generated C6 cell lines overexpressing both TRM61-V5 and TRM6-Myc. These fusion proteins were expressed at levels similar to endogenous proteins (Figure 3a and Supplementary Figure 2A) and capable of assembling into MTase complex (Figure 3b). TRM6/61 overexpression increased the levels of both tRNA^{Met} and tRNA^{Leu}, as shown by both quantitative PCR (qPCR; Figure 3c) and northern blot analysis (Supplementary Figure 2B). As previously reported,²⁹ regardless of expression level, the entire pool of tRNA^{Met} is methylated, as revealed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) analysis (Figure 3d and Supplementary Figure 6) and primer extension assay (Supplementary Figure 3). To evaluate the impact of increased TRM6/61 expression on cellular translation rate, we used the RiboPuromycylation method. This technique is

Figure 1. PKC α interacts with TRM61 in the cytoplasm. (a) C6 cells were treated or not with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) before protein extraction, immunoprecipitation (IP), 2D electrophoresis and silver staining. Only TRM61 spots, identified by mass spectrometry, are shown. (b) Same IP procedure as in a, this time using TRM61-V5-expressing cells. Co-IP of PKC α and TRM61-V5 was evaluated by immunoblot. (c) Immunofluorescent stainings of endogenous TRM6, TRM61 and PKC α proteins in C6 cells. Scale bar: 10 μ m. (d) Live imaging of PKC α -GFP/TRM61-mCherry-expressing C6 cells. Scale bar: 10 μ m. (e) Live imaging of PKC α -GFP/TRM6-mCherry-expressing C6 cells. Scale bar: 10 μ m. (f) Predicted nuclear localization signal localization from aligned sequences of TRM6 and TRM61 from Yeast, Rat and Human by myhits/motifscan analysis (red square). (g) IP of Pkc1p from either wild type (WT), *Trm6p*-GFP-expressing or *Trm61p*-GFP-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strains, followed by pkc1 or GFP immunoblot analysis.



based on puromycin incorporation in 'immobilized' translating ribosome where it covalently associates with nascent chain.^{32,33} Anti-puromycin antibody staining permits to locate and

quantify cellular translation via immunofluorescence microscopy. RiboPuromylation method revealed a slight increase of global translation rate following TRM6/61 overexpression that concurs

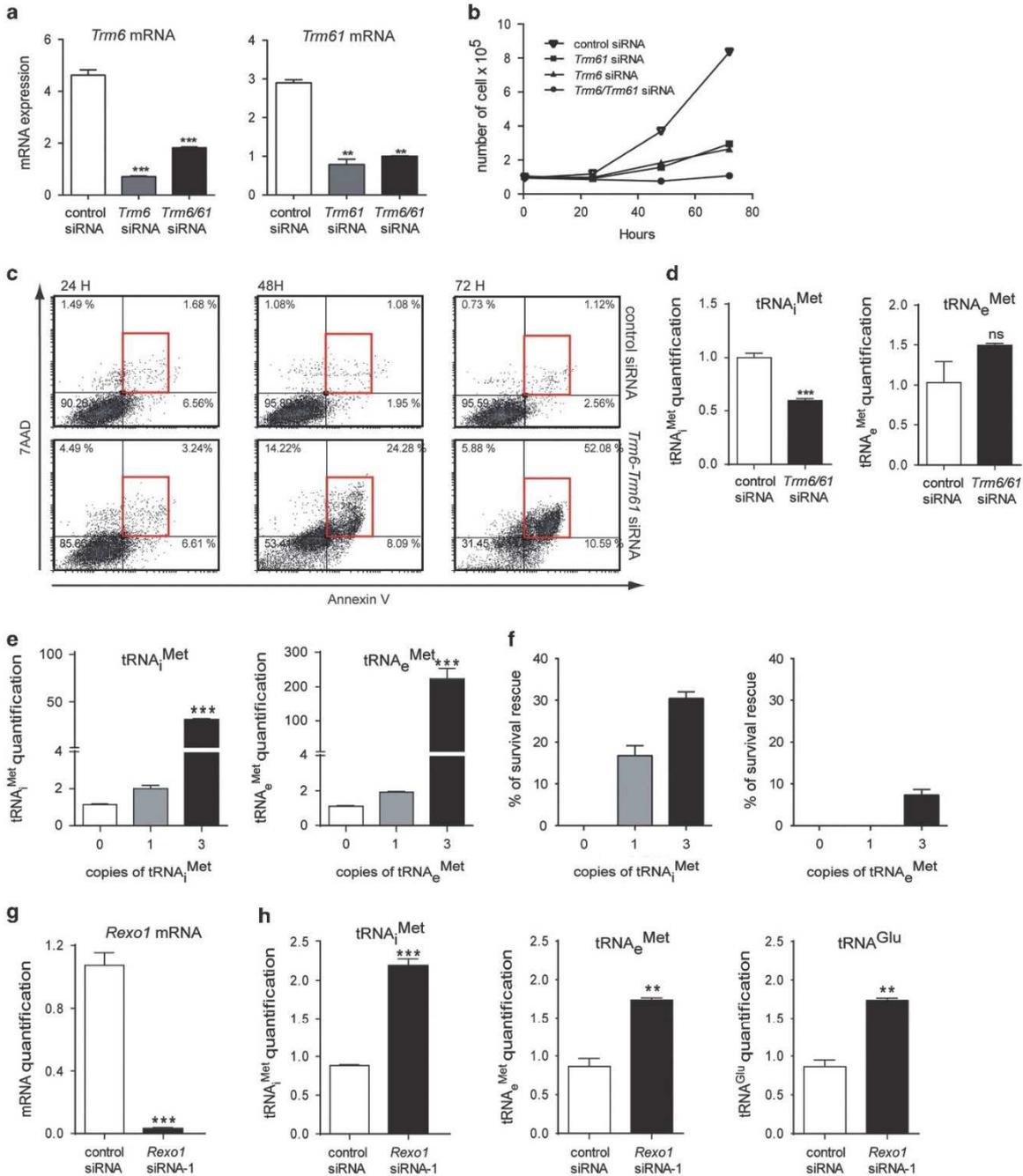


Figure 2. *Tm6* and *Tm61* are essential genes for cell survival. (a) Assessment of *Tm6* and *Tm61* siRNA silencing efficiency by reverse transcriptase–quantitative PCR (RT–qPCR) analysis. (b) Cell proliferation analysis following siRNA silencing. (c) Cell death quantification by flow cytometry analysis. (d) Evaluation of tRNA_i^{Met} and tRNA_e^{Met} levels by qPCR analysis following 48h of siRNA silencing. (e) qPCR analysis of tRNA_i^{Met} or tRNA_e^{Met} levels from C6 cells stably expressing one or three copy of either tRNA_i^{Met} or tRNA_e^{Met}. (f) Cell counting following 72 h transfection with either *Tm6/61*-siRNA or *Luc*-siRNA. (g) Evaluation of *Rexo1* siRNA silencing efficiency in C6 cells by RT–qPCR analysis. (h) Quantification of tRNA_i^{Met}, tRNA_e^{Met} and tRNA^{Glu} levels by qPCR analysis following 48h of *Rexo1* siRNA silencing. Statistical analysis: (a, d, e, g, h) Mean ± s.d., n = 3 (biological replicates N = 3); ***P < 0.01, ****P < 0.001 based on two-tailed unpaired t-test.

with near-identical polysome profiles obtained from sucrose gradient fractionations (Figures 3e and f). Therefore, high cellular levels of this complex have only little effect on global protein synthesis in C6 cells.

The next step was to verify whether TRM6/61 levels could trigger preferential translation of selected mRNAs. To achieve this goal, we size-fractionated polysomes by mean of sucrose density gradient centrifugation. Then, we extracted mRNAs from heavy polysome fractions (fractions 17–22, Figure 3f) and analyzed them by microarray. At the translational level, 257 mRNAs showed significant changes following TRM6/61 overexpression (Figure 3g and Supplementary Table 1): translation efficiency was increased for 158 of them, whereas 99 were underexpressed, as illustrated by the Volcano plot (Figure 3h). To identify functional gene sets, we performed an ingenuity pathway analysis: a significant proportion of these mRNAs were involved in gene expression, cell cycle and DNA replication (Figure 3i and Supplementary Table 2A, B, C). Some of these genes were accurately analyzed by qPCR and their expression in total cellular mRNA was compared with that of polysomal fractions (Figure 3j). This comparative analysis revealed a trend toward significant adjustment of gene expression at the translational level, which was further confirmed by immunoblots (Supplementary Figure 4). Furthermore, from a pathological standpoint, one-fifth (45 genes) of 'translationally regulated genes' are deregulated in cancer (Figure 3i and Supplementary Table 2D), which suggests that increased TRM6/61 levels may contribute to tumorigenicity.

TRM6/61 expression is connected to tumor progression

Wide variations of tRNA expression have been observed in both cancer cell lines and patient tumors, correlating with increased proliferation and elevated protein synthesis.³⁴ However, no direct comparison of tRNA expression—and more particularly tRNA^{Met} levels—between tumor grades has been carried out. We focused our attention on gliomas, tumors of the central nervous system characterized histologically by their grade assigned by the World Health Organization.³⁵ Grade II designates a low grade, whereas grade III represents a transition toward GBM, the most aggressive state. However, in practice, grades II and III cannot be easily distinguished,³⁶ which led us to compare pooled patient samples from grade II/III with those from GBM. tRNA^{Met} and tRNA^{eMet} levels were increased in high-grade tumors (Figures 4a and b). In addition, both TRM6 and TRM61 mRNA expression levels followed the same trend (Figure 4c), suggesting that elevated tRNA methylation activity might contribute to tRNA^{Met} accumulation throughout tumor progression. Furthermore, the strong correlation between TRM6 and TRM61 expression in patient samples concurs with their role as molecular complex rather than as individual proteins (Figure 4d).

TRM6/61 promotes tRNA^{Met} accumulation and potentiates both colony- and sphere-forming abilities of C6 cells

As increased glioma aggressivity correlates with elevated levels of both TRM6/61 and tRNA^{Met}, we decided to study the impact of their overexpression on cell properties associated with oncogenic transformation. Neither TRM6/61 nor tRNA^{Met} overexpression changed C6 cell proliferation (Supplementary Figure 5A) or metabolism (Supplementary Figures 5B and C), as previously observed in non-tumorigenic human breast epithelial cell lines.²⁹ However, anchorage-independent growth on soft agar was significantly affected, as well as sphere-forming capacity in non-adherent culture (Figures 5a and b). Remarkably, these effects were clearly enhanced when both TRM6/61 and tRNA^{Met} were enhanced (Figures 5a and b), suggesting an 'additive effect' of tRNA^{Met} synthesis and stabilization. On this last point, we concluded that tRNA^{Met} overexpression could not by itself surpass a critical threshold, above which TRM6/61 tRNA methylation

capacity was exceeded. This assumption was supported by two observations: first, our analysis of tRNA^{Met} levels—but not tRNA^{eMet} levels—in the different overexpression cell lines showed the most elevated ones in the TRM6/61/tRNA^{Met}-overexpressing cells (Figures 5c and d); second, the m1A58 modification status of the tRNA^{Met} was analyzed by UPLC and revealed that, regardless of tRNA^{Met} level, the ratio m1A/G was constant (Figure 5e and Supplementary Figure 6). This finding indicated that nearly every single tRNA^{Met} was methylated, thus underlining the fundamental importance of this modification to achieve structural stability and avoid immediate nuclear degradation by REXO1 (Figures 5f and g). Finally, we demonstrated that tRNA^{Met} effects were specific as tRNA^{eMet} overexpression, alone or in combination with TRM6/61, was unable to reproduce them (Figures 5a and b). It is worth noting that tRNA^{eMet} overexpression was able to influence tRNA^{Met} levels, and vice versa, in agreement with the idea that modulating one tRNA may affect others (Figures 5c and d).¹¹ However, tRNA^{eMet}- and TRM6/61/tRNA^{Met}-overexpressing cells accumulated similar levels of tRNA^{Met} (Figure 5d), as can be expected since tRNA^{eMet} methylation is optional for its stability.

PKCα controls TRM6/61 activity and restrains anchorage-independent growth and sphere formation

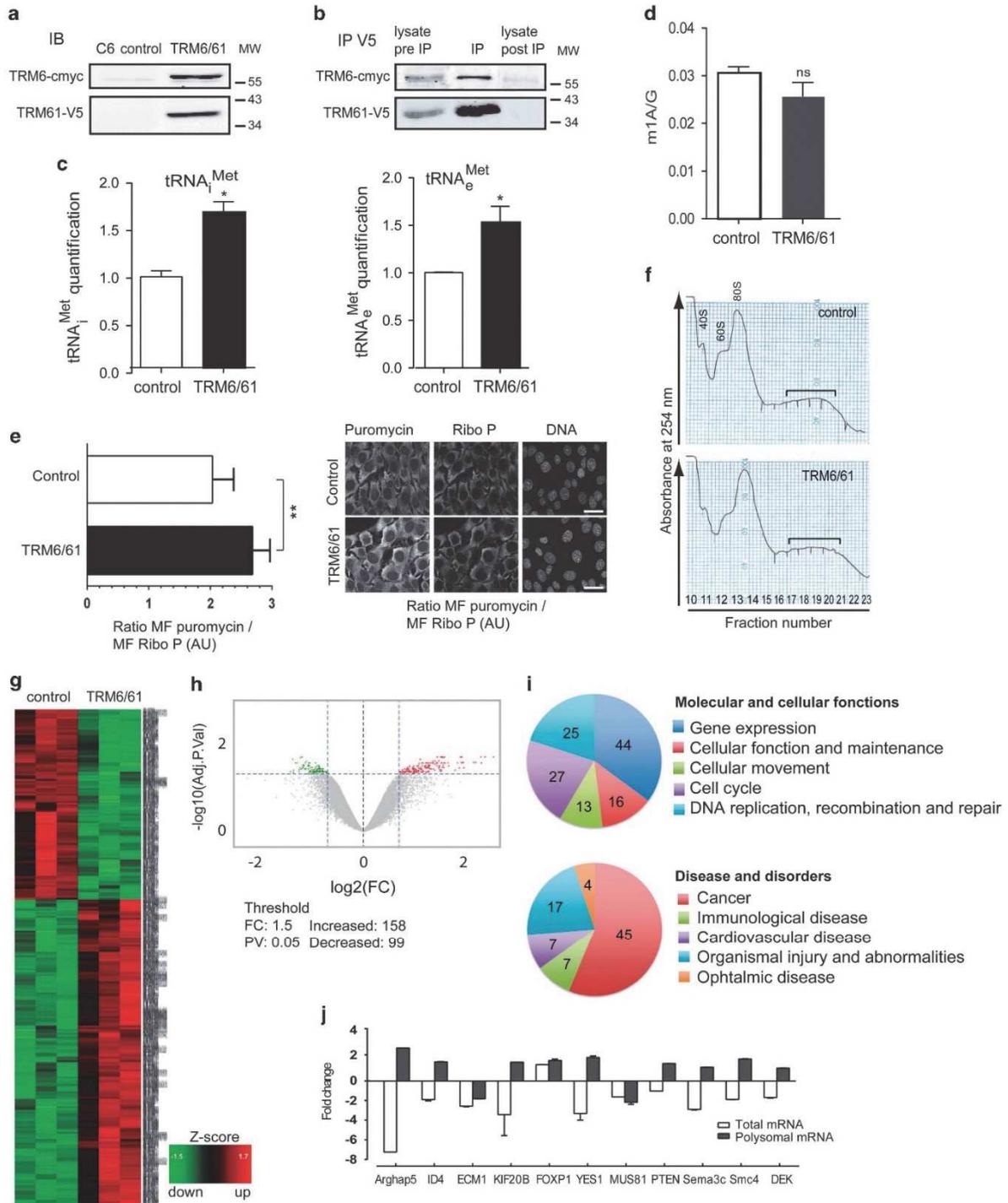
Next, we tested how PKCα, through its interaction with TRM61, could affect tRNA^{Met} levels. PKCα overexpression (about twofold increase, Figure 6d) in C6 cells did not affect tRNA^{Met} levels and, had neither an impact on anchorage-independent growth nor on sphere formation (Figures 6a–c). Yet, in TRM6/61/tRNA^{Met}-overexpressing cells, PKCα overexpression was able to downregulate tRNA^{Met} levels and to decrease cell growth in both culture conditions (Figures 6a–c). At least two lines of evidence suggested that this effect was unrelated to PKCα kinase activity: first, phorbol 12-myristate 13-acetate treatment did not affect PKCα/TRM61 association (Figure 1a); second, despite repeated attempts, we failed to show that TRM61 was a substrate of PKCα *in vitro* (Supplementary Figure 7). Alternatively, PKCα could have a role on TRM61 'availability' by impacting on TRM6/61 formation and its subsequent translocation into the nucleus. To challenge this hypothesis, we monitored TRM61 intracellular distribution following PKCα overexpression. Under this condition, nuclear (insoluble fraction) pool of TRM61 significantly decreased, whereas its cytoplasmic (soluble fraction) level increased, concomitantly with PKCα-GFP accumulation in this compartment (Figure 6d). Although this observation is not sufficient to elucidate the precise mechanism by which PKCα regulates TRM61 function, we may nevertheless assume that TRM61 sequestration—in the absence of phosphorylation—is part of it. Based on this model, PKCα/TRM61 ratio becomes a critical parameter to ensure proficient restraint of TRM6/61 activity and prevent any translation deregulation that could promote tumor progression. Accordingly, patient samples analysis revealed a declined PKCα mRNA expression throughout cancer progression (Figure 6e), which parallels gradual increase of both TRM61 and TRM6 mRNA levels (Figures 6f and g) and correlates with increased tumor aggressiveness (Figure 4c). As a control, we did not recapitulate this observation when looking at another MTase expression, TRM8 (Figure 6h), which does not bind PKCα.

DISCUSSION

In this study, we establish that both Trm6 and Trm61 are mammalian essential genes, which encode proteins that associate to form a nuclear enzymatic complex. However, taken individually, they present distinct subcellular distribution: TRM61 is both cytoplasmic and nuclear, whereas TRM6 is strictly localized in the nucleus. Remarkably, augmented TRM6/61 expression is sufficient to alter ribosomal engagement of selected mRNAs

involved in the tumorigenic process. We provide strong evidence suggesting that these consequences arise from high levels of stabilized tRNA^{Met}, although the precise underlying mechanism remains unclear. We also confirm that m1A58 is crucial for tRNA^{Met}

stability and our results suggest that hypomodified tRNA^{Met} are degraded through a mechanism similar to yeast³¹ and involving REXO1. We show that PKCα associates with TRM61 in the cytoplasm and postulate that it may control the complex



formation—thereby influencing subsequent nuclear translocation—and, as a consequence, prevent A58 methylation of tRNA in physiological conditions.

Our data show that TRM6/61 levels impact on mRNA engagement in heavy polysome fractions, most likely by adjusting ternary complex formation through tRNA^{Met} stabilization. However, we explored another possibility: in non-tumorigenic breast epithelial cell lines, deregulation of a single tRNA impacts on global tRNA pattern¹¹ that may, in turn, affect translational control. Can TRM6/61 overexpression trigger similar effect? The answer is yes, it does, but in a manner very similar to that of tRNA^{Met}-overexpressing cells (Supplementary Figures 8A and B). Accordingly, we could not establish a parallel between the known list of TRM6/61 tRNA substrates and deregulated tRNA species, strengthening the idea that global

tRNA level alteration is directly attributable to high cellular levels of tRNA^{Met}. Finally, following a thorough bioinformatics analysis, we could not connect the enrichment of certain tRNAs with increased representation of corresponding codons in polysome-associated mRNAs (Supplementary Figure 9). Therefore, the tRNA^{Met}-mediated global tRNA pattern alteration observed in TRM6/61-overexpressing cells does not appear to participate in fine-tuning translational control.

In our cell model, high levels of tRNA^{Met} did not affect cell proliferation—as shown in previous report—but affected anchorage-independent growth and sphere-forming ability. This observation may be explained either by the genetic differences between human and rodents³⁷ or by the fact that, unlike breast epithelial cell lines used in previous report, C6 is a tumorigenic cell line that already possesses tremendous proliferation capabilities.

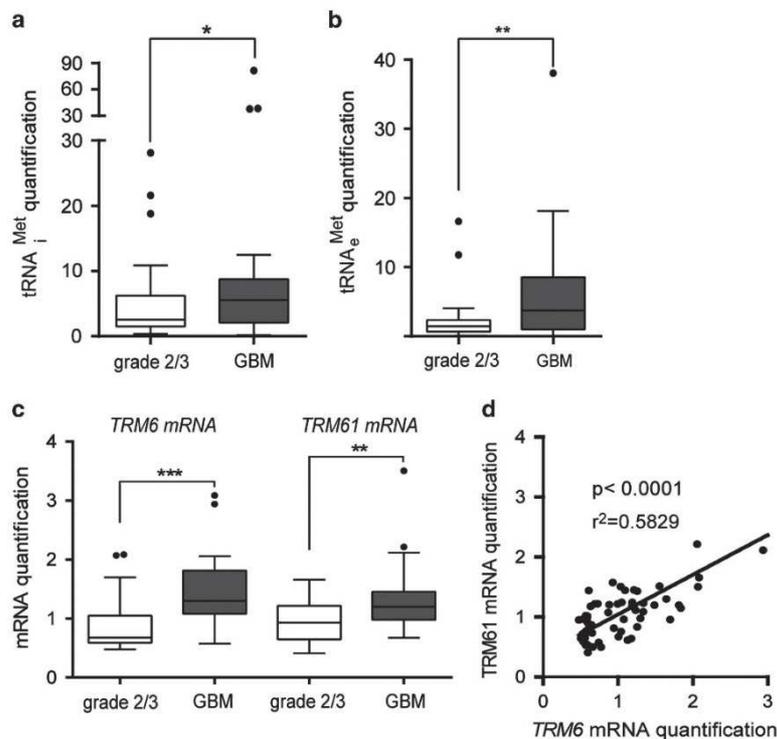


Figure 4. Increased expression of TRM6/61 and tRNA^{Met} is associated with glioma tumor progression and cancer aggressiveness. (a–c) qPCR analysis from 40 samples of grades II/III gliomas and 20 samples of glioblastomas (GBM). (d) Tumor by tumor correlation analysis of TRM6 and TRM61 mRNA expression. Statistical analysis: (a–c) Tukey boxplots that express the first and the third quartiles by the upper and lower horizontal lines in a rectangular box, inside which the horizontal line represents the median. ****P* < 0.0001; ***P* < 0.002; **P* < 0.0297, two-tailed unpaired *t*-test; (d) *P* < 0.0001, Spearman test.

Figure 3. TRM6/61 overexpression affects translational control of gene expression. (a) Quantification of TRM61-V5 and TRM6-cMyc by immunoblot (IB) from stably overexpressing C6 cell lines. (b) Evaluation of TRM61-V5 and TRM6-cMyc interaction by V5-immunoprecipitation (IP) and IB. (c) Evaluation of tRNA^{Met} and tRNA^e levels from TRM6/61-overexpressing cells by qPCR analysis. (d) UPLC analysis: m¹A/G ratio was evaluated to estimate the proportion of tRNA^{Met} m¹A methylated. G was used as an internal standard. (e) Quantification of actively translating ribosomes by RiboPuromycylation Method. Briefly, C6 cells were labeled for ribosomal P proteins (Ribo P) and incorporated puromycin. Six fields were acquired for each condition and the mean fluorescence ratio of puromycin/ribosome staining for each field was quantitated using ImageJ software. Values are plotted on the right. (f–j) Translatome analysis of TRM6/61-overexpressing cells. Lysates from control or Trm6/61 cells were fractionated on sucrose gradient to isolate polysomes. (f) Absorbance profile (at 254 nm). RNA extracted from heavy polysomal fractions (17–22) was analyzed by microarray. (g) Heatmap visualization of top-ranked genes (fold-change > 1.5 and *P*-value < 0.05). (h) Corresponding Volcano plot. (i) Ingenuity pathway analysis. (j) Comparative expression by reverse transcriptase–qPCR of a subset of mRNAs in the total mRNA extract and in the actively translated polysomal fractions. Statistical analysis: (c) Mean ± s.d., **P* < 0.05, *n* = 3 (biological replicates *N* = 5), (e) mean ± s.d., *n* = 3 (biological replicates *N* = 2), ***P* = 0.01 based on two-tailed unpaired *t*-test. NS, not significant.

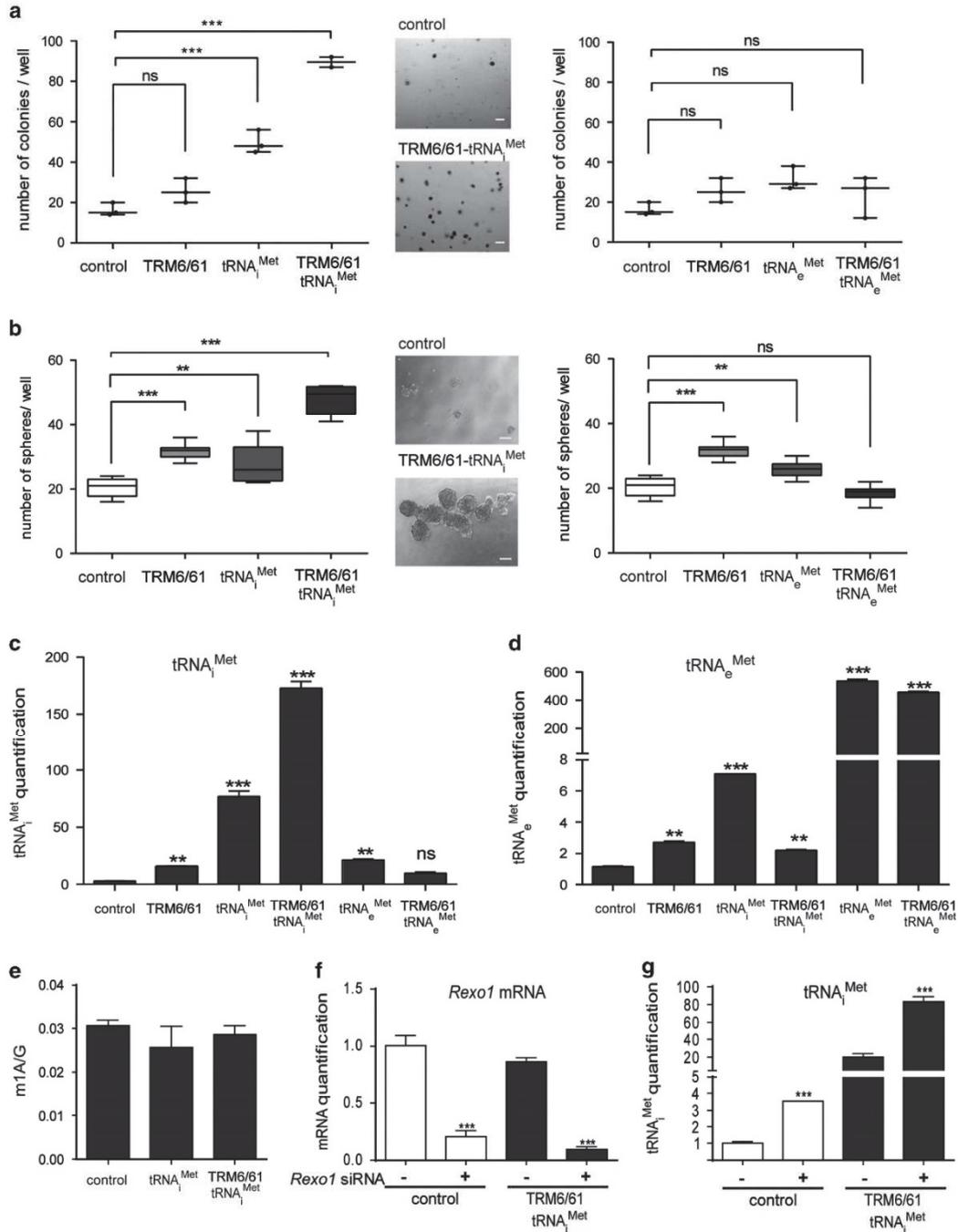


Figure 5. TRM6/61 potentiates colony- and sphere-forming potentials. **(a)** Stable C6 cell lines were tested for their capacity to form colonies in soft agar. One of five independent experiments is shown. Pictures show representative field. Scale bar: 100 μ m. **(b)** The same transfected cells as in **a** were tested for their ability to form spheres. Pictures show representative field. Scale bar: 100 μ m. From these cell lines, expression of tRNA^{Met}_i **(c)** and tRNA^{Met}_e **(d)** were quantified by qPCR. **(e)** UPLC analysis: m1A/G ratio was evaluated to estimate the proportion of m1A methylated tRNA^{Met}_i, G being an internal standard. **(f)** Assessment of *Rexo1* siRNA silencing in stable C6 cell lines by reverse transcriptase-qPCR. **(g)** qPCR analysis of tRNA^{Met}_i level following 48h of *Rexo1* siRNA silencing. Statistical analysis: **(a)** Mean \pm s.d. *** P < 0.001 based on two-way analysis of variance (ANOVA). **(b)** Tukey boxplots that express the first and the third quartiles by the upper and lower horizontal lines in a rectangular box, inside which the horizontal line represents the median. Biological replicates $N=4$, *** P < 0.0001; ** P < 0.002; **(c, d)** mean \pm s.d., $n=3$ (biological replicates $N=4$), ** P = 0.01, *** P < 0.001 based on two-way ANOVA; **(f, g)** mean \pm s.d., $n=3$ (biological replicates $N=3$), ** P < 0.01, *** P < 0.001 based on two-tailed unpaired t -test. NS, not significant.



siRNA transfection

Transfection of 50 nM of siRNA duplex was performed using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The sequences of siRNA were: 5'-GTGTATGTGCTGCAC CCTATT-3' for *Trm61*; 5'-GAGACAGCACTGCAGTTAA-3' for *Trm6*, 5'-TA ATTTGAACGTGAAAG AC-3' for PKC α and 5'-GGTTGTGCCATGAGGTT-3' for *Rex1*.

Reverse transcriptase-qPCR analysis

RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions and treated by DNase I (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). RNA (1 μ g) was subjected to reverse transcription with 200 ng of random hexamers (Applied Biosystems/Life Technologies) and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies). qPCR was performed using the QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen, Les Ulis, France). Results were normalized with actin expression and analyzed using the $\Delta\Delta$ Ct method. See Supplementary Table 3 for the list of primers used for qPCR analysis.

Cell extracts and western blotting analysis

Adherent cells were lysed in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 2 mM sodium orthovanadate, 50 mM Sodium fluoride, 50 mM β -glycerophosphate, 2 mM EGTA; pH 7.5). Samples were separated by a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane, blocked for 1 h in 5% (w/v) non-fat dry milk in phosphate-buffered saline and probed overnight at 4 °C with primary antibodies. After 1 h incubation with IRDye-conjugated secondary antibodies (Rockland, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France), proteins were quantified by the LI-COR Odyssey system (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

Extraction on cell monolayer

C6 cells were grown on six-well plates to reach 60–80% confluence the day of the experiment. Extraction procedure³² was performed on ice. Cells were extracted with 200 μ l of NP-40 buffer (containing 1% NP-40, 150 mM NaCl, phosphate-buffered saline and protease inhibitors) for 5 min. Soluble 'cytoplasmic' extracts were recovered from each condition. Wells were gently washed twice with the same buffer lacking NP-40. Then, 200 μ l of NP-40 buffer were added in the well and the insoluble fraction—containing both nucleus and cytoskeleton—was scraped.

Immunoprecipitation

Supernatants of 1 mg pre-cleared cell extracts were incubated overnight at 4 °C with 4 μ g of rabbit anti-PKC α or mouse anti-V5 antibody or pre-immune rabbit sera, or anti-mouse IgG previously crosslinked on protein G-agarose beads with dimethylpimelimidate (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Before immunoblotting or 2D gel electrophoresis, beads were washed three times with the RIPA buffer and twice with 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5.

Antibodies

Antibodies used in this study are as follows: anti-PKC α (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-bio, sc-8393 (WB), or Sigma Aldrich, P-4334 (IP)), anti-Trm61 and anti-Trm6 (rabbit pAb generated by Eurogentec, Angers, France), anti-GFP (Roche, Meylan, France, 11814460001), anti-actin (Sigma Aldrich, A-5441), anti-cmyc (Sigma Aldrich, M-5546), anti-V5 (Life Technologies, R960-25), anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-bio, sc-2025), anti-PKC1 (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-bio, sc-6801), anti-Histone H1 (Millipore, Molsheim, France, 05-457), anti-Rabbit IgG DyLight680 conjugated (Rockland, Tebu-bio, 611-730-127), anti-mouse IgG DyLight800 conjugated (Rockland, Tebu-bio, 610-732-124).

2D gel electrophoresis

At 80% confluency, cells were treated or not for 15 min at 37 °C with 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate or 0.1% dimethyl sulfoxide (control). Proteins were then extracted and PKC α were immunoprecipitated following the procedure described above. Immunoprecipitates were recovered in isoelectrofocusing medium containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 8 mg/ml ampholines (preblended, pI 3.5–9.5, GE Healthcare, Velizy, Villacoublay, France), 100 mM dithiothreitol, 0.2% tertitol NP7 (Sigma Aldrich) and traces

of bromophenol blue. 2D gel electrophoresis was then performed.⁴⁶ Gels were silver stained.⁴⁷

Protein identification by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

See Supplementary Materials and Methods for details.

Soft agar colony formation assay

Cells (10⁵) were plated in triplicate into 60-mm cell culture dishes in 2 ml of 0.3% agar in 'complete Dulbecco's modified Eagle's medium' with 2.44 g/l Na₂CO₃, on top of a layer of 4 ml of 0.5% agar. After 14 days of culture, colonies were fixed with 70% ethanol, and stained with 0.005% crystal violet. At least 30 randomly selected fields were photographed with a CCD camera coupled to a light microscope. Colonies with diameter equal or larger than 30 μ m were counted.

Sphere formation assays

Number of cell-forming sphere was determined after plating of 1000 cells/ml M11 medium (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (1:1) glutamax medium, N2 supplement (Life Technologies), 3 mM glucose 0.3%, insulin 20 μ g/ml, penicillin G 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, hBasic-fibroblast growth factor 10 ng/ml, (Miltenyi Biotech, Paris, France) human epidermal growth factor 20 ng/ml) (Miltenyi Biotech) in ultra-low attachment p24-well plates (11 wells/condition) (Corning, Amsterdam, Netherlands). Spheres >50 μ m diameter were counted after 6 days.

tRNA methods and UPLC analysis

Cells (80 millions) were harvested at 1000 r.p.m. for 5 min and total tRNA was extracted.⁴⁸ To isolate tRNA^{Met}, a 5' biotinylated oligonucleotide (5'-TGGGCCAGCACGCTTCCGCTG-3') was used.⁴⁹ Purified tRNA^{Met} was digested to nucleosides and analyzed by UPLC using an Aquity UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm², Waters, Guyancourt, France) at a constant flow rate of 0.200 ml/min and with a column temperature of 40 °C. As chromatography solvent 0.1% formic acid adjusted to about pH 5 was used (buffer A). After 12 min, the column was washed with 100% acetonitrile for 3 min and then equilibrated with buffer A during 3 min before a new injection. The presence of the expected nucleosides in tRNA^{Met} and absence of m⁵U (tRNA^{Met} contaminant) demonstrated the purity of the tRNA analyzed.

Polysomal fractionation analysis

Cells (4 \times 10⁶) were treated with 0.1 mg/ml cycloheximide for 15 min at 37 °C, washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline/cycloheximide and scraped. Cells were lysed and polysomes were fractionated.⁴⁴ Fractions were collected with an ISCO density gradient fractionation system (ISCO, Lincoln, NE, USA). The settings were as follows: pump speed 0.75 ml/min, fraction time 1.2 min/fraction, chart speed 150 cm/h and sensitivity of OD254 recorder to 1. The absorbance at 254 nm was measured continuously as a function of gradient depth. Fractions of 0.9 ml were collected. RNAs from heavy polysomal fractions (17–22 fractions) were extracted by TRIzol LS Reagent (Life Technologies).

Microarray assay, processing and analysis

See Supplementary Materials and Methods for details.

Flow cytometry

See Supplementary Materials and Methods for details.

RiboPuromycylation method

See Supplementary Materials and Methods for details.

Pkc1p immunoprecipitation from yeast lysate

See Supplementary Materials and Methods for details.

Patients and tumor samples

All samples were processed in accordance with European bioethics laws regarding patient information: written consent was obtained from

participants, tumor collection was accepted by the Center for Biological Collections of the Montpellier University Hospital (#AC-2009-889) and the ethics committee CPP Sud-Méditerranée IV approved this study (#CPP030601). See Supplementary Materials and Methods for further details.

Statistics and general method

Each experiment has been performed in technical replicates (*n*), representative of three to five biological replicates (*N*). Specific statistic parameters for each figure are specified in figure legends, including the sample size (*n*), the statistical test (two-tailed, two-way analysis of variance or Spearman), test pairing, *P*-value and error bar (usually s.d.). Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was generously supported by the Institut National du Cancer (INCa) and the Fondation ARC. We thank Martial Seveno, Serge Urbach and Edith Demetree from the 'Plate-forme de Protéomique Fonctionnelle' (FPP) for their work on proteomic analysis of cell samples. We thank the Gustave Roussy Genomic Core Facility (Noemie Pata-Merci) and the Gustave Roussy Bioinformatic Core Facility (Guillaume Meurice). ASB is supported by grants from the Swedish Cancer Foundation (13 0301), Swedish Research Council (621-2012-3576) and Karin and Harald Silanders Foundation (223-2808-12).

REFERENCES

- 1 Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 113–127.
- 2 Snenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009; **136**: 731–745.
- 3 Ron D, Harding HP. *eIF2α phosphorylation in cellular stress responses and disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2007.
- 4 Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 2004; **167**: 27–33.
- 5 Thakor N, Holcik M. IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2α-independent manner during stress. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 541–552.
- 6 Koromilas AE. Roles of the translation initiation factor eIF2α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1849**: 871–880.
- 7 Anderson J, Phan L, Cuesta R, Carlson BA, Pak M, Asano K et al. The essential Gcd10p-Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. *Genes Dev* 1998; **12**: 3650–3662.
- 8 Anderson J, Phan L, Hinnebusch AG. The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 5173–5178.
- 9 Roovers M, Wouters J, Bujnicki JM, Tricot C, Stalon V, Grosjean H et al. A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m1A) methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 465–476.
- 10 Towns WL, Begley TJ. Transfer RNA. methyltransferases and their corresponding modifications in budding yeast and humans: activities, predications, and potential roles in human health. *DNA Cell Biol* 2012; **31**: 434–454.
- 11 Pavon-Eternod M, Gomes S, Rosner MR, Pan T. Overexpression of initiator methionine tRNA leads to global reprogramming of tRNA expression and increased proliferation in human epithelial cells. *RNA* 2013; **19**: 461–466.
- 12 Quittau-Prevostel C, Delaunay N, Collazos A, Vallentin A, Joubert D. Targeting of PKCα and ε in the pituitary: a highly regulated mechanism involving a GD[E] motif of the V3 region. *J Cell Sci* 2004; **117**: 63–72.
- 13 Diouf B, Collazos A, Labesse G, Macari F, Choquet A, Clair P et al. A 20-amino acid module of protein kinase C (ε) involved in translocation and selective targeting at cell-cell contacts. *J Biol Chem* 2009; **284**: 18808–18815.
- 14 Collazos A, Diouf B, Guerinou NC, Quittau-Prevostel C, Peter M, Coudane F et al. A spatiotemporally coordinated cascade of protein kinase C activation controls isoform-selective translocation. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 2247–2261.

- 15 Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 103–112.
- 16 Gravitt KR, Ward NE, Fan D, Skibber JM, Levin B, O'Brian CA. Evidence that protein kinase C-α activation is a critical event in phorbol ester-induced multiple drug resistance in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 375–381.
- 17 Budworth J, Gant TW, Gescher A. Co-ordinate loss of protein kinase C and multidrug resistance gene expression in revertant MCF-7/Adr breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 1997; **75**: 1330–1335.
- 18 Lee SK, Shehzad A, Jung JC, Sonn JK, Lee JT, Park JW et al. Protein kinase Cα protects against multidrug resistance in human colon cancer cells. *Mol Cells* 2012; **34**: 61–69.
- 19 Benzil DL, Finkelstein SD, Epstein MH, Finch PW. Expression pattern of alpha-protein kinase C in human astrocytomas indicates a role in malignant progression. *Cancer Res* 1992; **52**: 2951–2956.
- 20 Misra-Press A, Fields AP, Samols D, Goldthwait DA. Protein kinase C isoforms in human glioblastoma cells. *Glia* 1992; **6**: 188–197.
- 21 Xiao H, Goldthwait DA, Mapstone T. The identification of four protein kinase C isoforms in human glioblastoma cell lines: PKC alpha, gamma, epsilon, and zeta. *J Neurosurg* 1994; **81**: 734–740.
- 22 Zellner A, Fetell MR, Bruce JN, De Vivo DC, O'Driscoll KR. Disparity in expression of protein kinase C alpha in human glioma versus glioma-derived primary cell lines: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 1797–1802.
- 23 Mandil R, Ashkenazi E, Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Rosenthal G et al. Protein kinase Cα and protein kinase Cδ play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 4612–4619.
- 24 Cameron AJ, Procyk KJ, Leitges M, Parker PJ. PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int J Cancer* 2008; **123**: 769–779.
- 25 Ahmad S, Mineta T, Martuza RL, Glazer RI. Antisense expression of protein kinase C alpha inhibits the growth and tumorigenicity of human glioblastoma cells. *Neurosurgery* 1994; **35**: 904–908 (discussion 908–909).
- 26 Torres AG, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol Med* 2014; **20**: 306–314.
- 27 Ozanick S, Krecic A, Andersland J, Anderson JT. The bipartite structure of the tRNA m1A58 methyltransferase from *S. cerevisiae* is conserved in humans. *RNA* 2005; **11**: 1281–1290.
- 28 Gruber JR, Desai S, Blusztajn JK, Niles RM. Retinoic acid specifically increases nuclear PKC alpha and stimulates AP-1 transcriptional activity in B16 mouse melanoma cells. *Exp Cell Res* 1995; **221**: 377–384.
- 29 Saikia M, Fu Y, Pavon-Eternod M, He C, Pan T. Genome-wide analysis of N1-methyl-adenosine modification in human tRNAs. *RNA* 2010; **16**: 1317–1327.
- 30 Kadaba S, Krueger A, Trice T, Krecic AM, Hinnebusch AG, Anderson J. Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 2004; **18**: 1227–1240.
- 31 Ozanick SG, Wang X, Costanzo M, Brost RL, Boone C, Anderson JT. Rex1p deficiency leads to accumulation of precursor initiator tRNA^{Met} and polyadenylation of substrate RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 298–308.
- 32 David A, Dolan BP, Hickman HD, Knowlton JJ, Clavarino G, Pierre P et al. Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J Cell Biol* 2012; **197**: 45–57.
- 33 David A, Netzer N, Strader MB, Das SR, Chen CY, Gibbs J et al. RNA binding targets aminoacyl-tRNA synthetases to translating ribosomes. *J Biol Chem* 2011; **286**: 20688–20700.
- 34 Pavon-Eternod M, Gomes S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T. tRNA overexpression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 7268–7280.
- 35 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97–109.
- 36 Reme T, Hugnot JP, Bieche I, Rigau V, Burel-Vandenbos F, Prevot V et al. A Molecular Predictor Reassesses Classification of Human Grade II/III Gliomas. *PLoS One* 2013; **8**: e66574.
- 37 Balmain A, Harris CC. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 371–377.
- 38 Whalen SG, Gingras AC, Amankwa L, Mader S, Branton PE, Aebersold R et al. Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11831–11837.
- 39 Guan L, Song K, Pysz MA, Curry KJ, Hizli AA, Danielpour D et al. Protein kinase C-mediated down-regulation of cyclin D1 involves activation of the translational repressor 4E-BP1 via a phosphoinositide 3-kinase/Akt-independent, protein



- phosphatase 2A-dependent mechanism in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 14213–14225.
- 40 Hou J, Lam F, Proud C, Wang S. Targeting Mnks for cancer therapy. *Oncotarget* 2012; **3**: 118–131.
- 41 Welsh GI, Price NT, Bladergroen BA, Bloomberg G, Proud CG. Identification of novel phosphorylation sites in the beta-subunit of translation initiation factor eIF-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **201**: 1279–1288.
- 42 Andaya A, Jia W, Sokabe M, Fraser CS, Hershey JW, Leary JA. Phosphorylation of human eukaryotic initiation factor 2 gamma: novel site identification and targeted PKC involvement. *J Proteome Res* 2011; **10**: 4613–4623.
- 43 Alain T, Morita M, Fonseca BD, Yanagiya A, Siddiqui N, Bhat M *et al*. eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer Res* 2012; **72**: 6468–6476.
- 44 Boussemart L, Malka-Mahieu H, Girault I, Allard D, Hemmingsson O, Tomasic G *et al*. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* 2014; **513**: 105–109.
- 45 Zindy P, Berge Y, Allal B, Filleron T, Pierredon S, Cammas A *et al*. Formation of the eIF4F translation-initiation complex determines sensitivity to anticancer drugs targeting the EGFR and HER2 receptors. *Cancer Res* 2011; **71**: 4068–4073.
- 46 Marques JM, Rodrigues RJ, Valbuena S, Rozas JL, Selak S, Marin P *et al*. CRMP2 tethers kainate receptor activity to cytoskeleton dynamics during neuronal maturation. *J Neurosci* 2013; **33**: 18298–18310.
- 47 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; **68**: 850–858.
- 48 Chen C, Huang B, Eliasson M, Ryden P, Bystrom AS. Elongator complex influences telomeric gene silencing and DNA damage response by its role in wobble uridine tRNA modification. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1002258.
- 49 Bjork GR, Jacobsson K, Nilsson K, Johansson MJ, Bystrom AS, Persson OP. A primordial tRNA modification required for the evolution of life? *EMBO J* 2001; **20**: 231–239.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Résumé : Avec près d'un million de nouveaux cas par an à travers le monde, le cancer colorectal est un problème de santé publique majeur. Il est la 2^{ème} cause de mortalité par cancer en France, ce fort taux de mortalité étant relié à un pourcentage important de récidives et de métastases. L'hétérogénéité tumorale, la dissémination, la résistance aux traitements et la récurrence seraient notamment dues à une population particulière de cellules tumorales appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Ces cellules sont dotées d'une capacité d'adaptation extraordinaire et la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant cette plasticité cellulaire est un objectif majeur pour concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques les ciblant spécifiquement. La synthèse protéique joue un rôle clé dans la carcinogénèse : d'une part, une synthèse protéique élevée est nécessaire à la prolifération des cellules tumorales, d'autre part, la traduction sélective favorise l'expression de protéines pro-oncogéniques. Considéré pendant des années comme un acteur passif de la traduction, le ribosome semblerait jouer un rôle majeur dans la régulation de la synthèse protéique. En effet, des études récentes ont montré que la composition du ribosome était « flexible » et permettrait de favoriser la traduction de certains ARN messager (ARNm). De plus, l'expression de certaines protéines ribosomiques (PR) varie entre le tissu sain et le tissu cancéreux, parfois même entre la tumeur initiale et la métastase. Ce projet vise à déterminer de quelle manière le contrôle traductionnel intervient dans plusieurs étapes clés du cancer colorectal, en se focalisant tout particulièrement sur l'acquisition ou la perte de propriétés propres aux CSC. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires exploités par les CSC afin de résister aux traitements et s'adapter à leur environnement. De plus, ce projet pourrait mettre en évidence un rôle exercé par certaines protéines ribosomiques dans le contrôle traductionnel, à travers la filtration des ARNm par le ribosome. A plus long terme, il pourrait déboucher sur le développement de nouveaux traitements permettant de cibler spécifiquement la machinerie traductionnelle des CSC.

Mots clé : Traduction, protéines ribosomiques, cancer, cellules souches cancéreuses.

Abstract: Despite significant advances in diagnostics and treatment, colorectal cancer (CRC) remains a major cause of mortality worldwide and occurrence of metastasis represents the primary cause of death. Metastasis process, chemoresistance and tumor recurrence are powered by a minor subpopulation of tumor cells endowed with self-renewal and multi-lineage differentiation ability: the cancer stem cells (CSC). Translation of mRNA into protein is the final step in gene-expression process, which mediates the formation of the translome from genomic information. Several mechanisms, such as signaling pathways, translation factors availability, alternative open reading frame and alternative initiation pathways account for real time translome remodeling. Moreover, an emerging concept suggests that ribosome is heterogeneous and can be "reprogrammed". These "specialized ribosomes" would preferentially engage certain mRNA at the expense of others and therefore drive cell phenotype and favor cell adaptation. Many studies have correlated deregulation of both translation machinery composition and activity with cancer initiation and evolution. From that perspective, CSC might well represent a perfect model to test whether the translation apparatus takes an active part in tumor initiation, progression, and metastasis. Our goal is to demonstrate that protein synthesis is differentially regulated depending on cancer cell subpopulation and determine whether ribosomal heterogeneity could impact tumoral evolution and plasticity. In a long run, we envision the development of novel therapies based on specific targeting of translational control in CSC.

Key words: Translation, ribosomal proteins, cancer, cancer stem cell.