



HAL
open science

Implication de la protéine de biogenèse des ribosomes Rsl24d1 dans l'homéostasie de cellules souches embryonnaires murines

Marion Bruelle

► **To cite this version:**

Marion Bruelle. Implication de la protéine de biogenèse des ribosomes Rsl24d1 dans l'homéostasie de cellules souches embryonnaires murines. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1015 . tel-01775053

HAL Id: tel-01775053

<https://theses.hal.science/tel-01775053>

Submitted on 24 Apr 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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1015

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED340

Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 19/02/2018, par :

Marion BRUELLE

Implication de la protéine de biogenèse des ribosomes Rsl24d1 dans l'homéostasie de cellules souches embryonnaires murines

Devant le jury composé de :

DAVID, Alexandre

O'DONOHUE, Marie-Françoise

BARDIN, Allison

BOURILLOT, Pierre-Yves

JAMEN, Françoise

PAYEN-GAY, Léa

DUCRAY, François

GABUT, Mathieu

CR CNRS, Université de Montpellier, IGF

DR CNRS, Université Toulouse 3, LBME

DR CNRS, Institut Curie Paris

CR Inserm, Université Lyon 1, SBRI

MC CNRS, Université Paris-Sud, Neuro-PSI

PU-PH, Université Lyon 1, CRCL

PU-PH, Université Lyon 1, CRCL

CR Inserm, Université Lyon 1, CRCL

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Examineur

Examinatrice

Présidente

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOSNE

« Il n'est point de bonheur sans liberté, ni de liberté sans courage. »

Périclès

Remerciements

Merci aux membres de mon jury

Je souhaite tout d'abord sincèrement remercier Madame Marie Françoise O'Donohue et Monsieur Alexandre David d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et de me faire l'honneur de bénéficier de vos expertises respectives en tant que rapporteurs de mon jury.

Je souhaite également sincèrement remercier Madame Allison Bardin, Madame Françoise Jamen et Monsieur Pierre-Yves Bourillot de me faire l'honneur d'être présents dans mon jury de thèse en tant qu'examineurs et de me permettre de bénéficier de vos expertises respectives. Vos critiques seront très enrichissantes pour la poursuite de mon projet de thèse.

Enfin, un grand merci à Madame Léa-Payen-Gay d'avoir accepté si rapidement de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse et d'évaluer mes travaux.

Merci à mes encadrants

Merci à Jean-Jacques Diaz, Olivier Namy et à Pierre Savatier d'avoir accepté de faire parti de mon comité de suivi de thèse et de m'avoir permis d'avoir la chance de bénéficier de leurs expertises respectives dans le domaine de la traduction, des cellules souches pluripotentes et des ribosomes tout au long de ma thèse. Chaque comité a constitué une étape importante dans l'orientation et la progression du projet Rsl24d1.

François, je te remercie d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci pour ton soutien, ta disponibilité et ta bienveillance tout au long de ma thèse et dans les moments difficiles. Avec l'espoir que l'étude des protéines de biogenèse des ribosomes puisse être transposée dans des recherches translationnelles en cancérologie. Merci pour tout.

Mathieu, je te remercie de m'avoir permis d'intégrer ton équipe et de m'avoir fait confiance. Je te remercie également de m'avoir permis de travailler en collaboration avec l'équipe de Jean-Jacques et de m'avoir permis de découvrir la biologie des cellules souches et d'appréhender la complexité des ribosomes pendant ces trois années.

Merci aux membres de l'équipe Gabut

Seb, je te remercie de m'avoir permis de bénéficier de ton expertise et de ta rigueur au cours de ma dernière année de thèse. Je te remercie également pour tes critiques et tes explications qui m'ont permis de progresser dans mon analyse et dans la compréhension de certaines problématiques complexes qui m'avaient échappées. Merci également pour ta contribution précieuse sur le projet Rsl24d1, notamment pour les supers outils que tu as mis en place.

Fleur, je te remercie tout d'abord pour ta pédagogie et ton exigence en culture cellulaire. Ton expertise sur la culture des cellules souches embryonnaires a été précieuse pour l'avancée de mon projet de thèse. Je suis chanceuse d'avoir pu te poser mes questions à tout moment et à tous les niveaux du projet. Merci pour ton aide dans le projet Rsl24d1 et pour ta persévérance et ton exigence dans le criblage des clones. Merci également pour toutes les discussions non scientifiques qu'on a pu avoir pendant ces trois années, j'en garde de supers souvenirs !

David et Marc, je vous remercie pour vos critiques et votre aide sur mon projet de thèse. Vos questions m'ont permis de progresser dans la communication de mes résultats et d'en évaluer les limites.

Anne-Cécile, merci pour tous tes conseils au début de ma thèse. Ils m'ont été très précieux. Merci pour tes critiques, ton soutien, ton exigence et ton énergie communicative.

Merci aux membres de l'équipe Diaz

Jean-Jacques, je souhaite tout d'abord te remercier pour ton humanité, ta pédagogie, ta franchise et ta patience. Je suis très heureuse d'avoir pu travailler en collaboration avec ton équipe et d'avoir découvert la complexité du processus de la traduction. J'ai eu la chance de bénéficier de ton expertise dans le domaine des ribosomes et de ton œil critique tout au long de mon projet de thèse. Chaque réunion et discussion étaient de vrais moteurs pour l'avancée du projet, pour l'orientation et pour la communication des résultats scientifiques.

Virginie, je te remercie d'avoir été disponible pour répondre à toutes mes questions pendant ces trois années, que ce soit sur les plans organisationnels, techniques ou scientifiques. J'espère tout de même ne pas trop t'avoir interrompue. Tes explications m'ont permis de comprendre et d'appréhender la complexité de certains concepts scientifiques. Merci beaucoup.

Fred, je te remercie pour ta disponibilité et tes critiques constructives sur le projet Rsl24d1. Pendant ces trois années, tu m'as permis de découvrir la complexité des techniques d'analyse et des limites d'interprétation. Merci beaucoup de m'avoir aidé à mettre en place l'expérience de Click-iT®.

Hichem, merci beaucoup pour ta disponibilité et pour humour en toutes situations, ça fait du bien ! Sans rire, merci de m'avoir aidé à mettre en place l'expérience de xCelligence® et merci pour le chocolat noir aussi.

Nicole et Anne, je vous remercie beaucoup pour votre soutien et votre aide tout au long de ma thèse, notamment pour les profils polysomiques et les précipitations TCA. Comme Fred et Virginie, vous n'avez pas été épargnées par mes questions pendant ces trois années, merci infiniment.

Merci à nos collaborateurs

Merci à Olivier Namy et à Isabelle Hatin de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire pour découvrir la technique du « ribosome profiling ». Isabelle, ta philosophie et ton énergie scientifique ont été tout aussi enrichissantes que la découverte de cette technique. Merci !

Merci à Emiliano Ricci, de l'équipe de Théophile Ohlmann de m'avoir permis de réaliser mes expériences de profils polysomiques au sein de l'ENS. J'ai eu la chance de pouvoir bénéficier de ton expertise sur cette expérience clef de mon projet de thèse, merci beaucoup.

Merci également à Philippe Mangeot et à Laurent Chavatte pour votre aide à l'ENS, votre humour et votre passion pour Starwars.

Merci à Duygu Ozmandenci, de l'équipe de Fabrice Lavial, et à Claire Santamaria de l'équipe de Pierre Savatier de m'avoir permis de bénéficier de leurs amorces de RTqPCR. Votre aide m'a été précieuse pour la mise en place de l'expérience de différenciation précoce.

Merci à Michel Cohen-Tannoudji de m'avoir permis de bénéficier de son regard expert sur mon projet de thèse et de nous avoir permis de bénéficier de ces outils pour l'étude des perturbations de la biogenèse des ribosomes.

Merci aux bureaux des doctorants

Nabila, je suis très très heureuse d'avoir passé ces trois années de thèse avec toi au sein de l'équipe. Je te remercie sincèrement pour ta pédagogie, ta patience, ton humanité, ta tolérance et ton humour. Tu m'as appris énormément que ce soit sur la qPCR, les RT ou les analyses de RNAseq. Merci de m'avoir fait découvrir les musiques de Bollywood, toutes les autres musiques et toutes les séries. Merci également pour ton aide et ton soutien dans les moments difficiles. Nos discussions vont me manquer. J'espère qu'on va se revoir souvent.

Flora, je te remercie d'avoir apporté un petit rayon de soleil et de folie dans le bureau des doctorants. Ton sourire, ton énergie, ta gentillesse et ta gourmandise ont égayé mes années de thèse. J'espère qu'on va se revoir souvent.

Samaneh, je te remercie pour ton écoute, ta maturité et ta psychologie. Nos discussions ont été très enrichissantes et ton point de vue m'a fait réfléchir. Tes progrès en français sont impressionnants. J'espère qu'on restera en contact.

Élise, Nath et Thomas, je vous remercie pour votre soutien et pour toutes les discussions et les repas qu'on a pu partagés. Vos points de vue m'ont permis d'avancer, merci. Merci également pour votre humour et votre dynamisme. Nath, merci pour tes super(bes !) gâteaux, j'ai hâte de te commander le prochain.

Maxime, je te remercie pour ton aide et ta patience. C'était un plaisir de travailler et de discuter avec toi au laboratoire.

Enfin, je remercie les anciens et nouveaux arrivés au sein des équipes Diaz et Gabut, Elsa, Lucie, Mounira, Florian, Elizabet, Maggy, Karine, Hélène, Fabien, Piero, Florian, Laura, Rachel, Léon, Verda, Tanguy, Paul, Caroline et Bighita. J'espère n'avoir oublié personne ^^Ce fut un plaisir de travailler avec vous et de vous rencontrer.

Merci à la Ligue Nationale contre le Cancer

Qui m'a permis de réaliser mes travaux de thèse au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon pendant ces trois années. Merci pour votre confiance.

Merci à ma famille

À ma mère,
Pour ton soutien et ton goût de l'effort.

À mon père,
Merci de m'avoir soutenue pendant ces trois années et de croire en moi malgré tous mes doutes et toutes les occasions d'arrêter. Au risque de me répéter, merci pour ton amour, ta générosité, ton écoute et ton optimisme. Tu nous as transmis le goût du travail, ta curiosité et le goût de la liberté, et ça, ça donne des ailes, merci Pa !

À mon frère et Yulia,

Merci Paulo pour ton soutien et ton amour. Chaque moment passé ensemble est une grande source de bonheur, et sur Facetime aussi. Merci à Yulia pour toutes ses attentions et de te rendre si heureux. Je vous embrasse fort 😊

Merci à mes grands-parents Françoise et Francis,

Mamie et Papy, merci pour votre amour, votre jeunesse, votre curiosité, votre courage et votre générosité. J'ai hâte de vous revoir bientôt et de vous montrer comme Maëlle a grandi :-)

Merci à Sylvie et Yves,

Merci pour votre soutien pendant ces trois ans, merci pour votre amour et votre disponibilité pour nous. Vos visites ou les nôtres sont remplies de bonheurs et de rires.

Merci à Hemant,

Merci pour ton soutien, tes visites et ton accueil. Tu es comme un deuxième frère pour moi. See u very very soon Monsieur B.sim.

Merci à mes amours Pierre-Louis et Maëlle

Pierre-Louis, merci pour ton soutien quotidien tout au long de ma thèse et surtout à la fin, ta confiance et ton amour. Tu es un super papa, je suis très chanceuse et heureuse de construire ma vie avec toi et de pouvoir t'embêter tous les jours. Je t'aime

Maëlle, ma crevette, merci d'être là et d'éclairer ma vie par ton sourire et ta joie. Tu es ma petite pile électrique et mon petit soleil. J'ai hâte de t'apprendre tout le répertoire de grimaces que je maîtrise et de te montrer comment embêter Papa. Je t'aime

Résumé

Le contrôle de l'expression des programmes géniques orchestrant le développement précoce et l'homéostasie des cellules souches fait l'objet de recherches intenses. En effet, les cellules souches embryonnaires (CSE) sont caractérisées par des propriétés comme leur clonogénicité (la capacité à proliférer dans le même état indifférencié) et leur pluripotence (la capacité à se différencier et à former les tissus embryonnaires et adultes). Au niveau moléculaire, l'identité des CSE est orchestrée par le contrôle de l'expression génique aux niveaux épigénétique, transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel en réponse à l'activation de voies de signalisation spécifiques. Dans ce contexte, des données récentes suggèrent un rôle de la machinerie traductionnelle, des ribosomes et de la régulation de leur biogenèse, dans le maintien de l'homéostasie de cellules souches de différentes espèces. À partir de l'analyse de données transcriptomiques à haut débit (RNAseq), mon équipe d'accueil a ainsi identifié un ensemble de protéines associées aux ribosomes (PaR) significativement enrichies dans les cellules souches embryonnaires murines (CSEm) en comparaison à des lignées cellulaires murines différenciées et à des tissus. Parmi ces candidats, mes travaux de thèse ont consisté à la caractérisation d'une PaR particulièrement enrichie : Rsl24d1. Rsl24d1 est une protéine de biogenèse des ribosomes décrites exclusivement chez la levure. Son profil d'expression dans différentes lignées de CSEm suggère une fonction spécifique: enrichissement au niveau transcriptionnel et protéique dans les CSE à l'état de pluripotence naïf et diminution importante au cours de la différenciation. En effet, des approches de perte d'expression de Rsl24d1 m'ont permis d'établir l'importance de cette PaR dans l'homéostasie des CSEm. Rsl24d1 contribue au maintien de la prolifération cellulaire des CSE, de leur clonogénicité et plus modérément à leur pluripotence. Rsl24d1 semble être une protéine majoritairement nucléaire mais également associée aux sous-unités 60S libres des ribosomes cytoplasmiques. D'autre part, la perte d'expression de Rsl24d1 affecte spécifiquement la biogenèse des particules ribosomiques 60S. Ainsi, comme chez la levure, dans les CSEm, Rsl24d1 est un facteur navette orchestrant la maturation des particules ribosomiques pré-60S. Par ailleurs, Rsl24d1 semble permettre le maintien d'un taux de synthèse protéique élevé permettant notamment le renouvellement des protéines ayant une demi-vie courte parmi lesquels on recense des facteurs de transcription de la pluripotence comme Oct4 (Oct3/4), Nanog et Esrrb. Mes travaux de thèse ont donc permis d'identifier et de caractériser un facteur de biogenèse de la sous-unité 60S, Rsl24d1, impliqué dans l'homéostasie des CSEm.

Mots-clés :

Cellules souches embryonnaires murines, Biogenèse des ribosomes, Rsl24d1, homéostasie

Préambule

Les cellules souches jouent un rôle central au cours du développement embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. L'amélioration de la compréhension de la biologie de ces cellules aux propriétés uniques pourrait contribuer aux progrès de la médecine régénérative, de la modélisation de pathologies humaines et en cancérologie. Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont en effet caractérisées par leur clonogénicité ou capacité à s'autorenouveler en conservant leur identité et également par leur pluripotence c'est à dire leur capacité à générer l'ensemble des tissus embryonnaires et adultes. Ces propriétés des CSE sont régulées par la coordination de nombreux mécanismes moléculaires activés en réponse à différents signaux du microenvironnement. Ainsi, l'homéostasie des CSE est assurée par des programmes de régulation de l'expression génique spécifiques et coordonnés qui contrôlent l'expression des ARNm à différents niveaux: modifications de la chromatine, régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles. L'étape suivante qui consiste en la traduction des ARNm en protéines est souvent considérée comme réalisée de façon constitutive par les ribosomes. Toutefois, des données récentes suggèrent que la régulation de la traduction par la machinerie traductionnelle, les ribosomes, et la biogenèse des ribosomes, joue un rôle important dans le contrôle de l'identité des cellules souches en contribuant au maintien d'un protéome adapté à leurs propriétés. Ainsi, la production des ribosomes et leur activité seraient spécialisées au sein des cellules souches. Des études récentes ont en effet démontré que l'hétérogénéité de composition en protéines ribosomiques (PR) conférait aux ribosomes une affinité préférentielle pour la traduction de certains sous groupes de transcripts dans les cellules souches embryonnaires murines¹. En ce sens, la mutation de certaines PR contribue au développement de pathologies hautement tissus spécifiques, les ribosomopathies. D'autre part, certaines protéines de biogenèse des ribosomes semblent être impliquées dans le contrôle de l'identité cellulaire au cours du développement embryonnaire et en situations pathologiques²⁻⁵. Des études récentes ont en effet démontré que l'hétérogénéité de la biogenèse des ribosomes participait activement au réseau moléculaire complexe régulant l'identité des cellules souches et leur transition vers la différenciation. L'introduction de ma thèse abordera donc dans un premier temps l'historique de la découverte des cellules souches, leur biologie particulière, leurs conditions de culture et leur potentiel en vues d'applications médicales. Puis, dans un second temps, les connaissances actuelles sur le rôle de l'hétérogénéité des ribosomes et de leur biogenèse au cours du développement embryonnaire, dans le maintien des cellules souches embryonnaires et en situations pathologiques seront détaillées. Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à rechercher un ou plusieurs facteurs de biogenèse des ribosomes enrichi(s) dans les cellules souches embryonnaires murines et potentiellement impliqué(s) dans le maintien de leur identité. J'ai ainsi sélectionné la protéine associée aux ribosomes la plus enrichie au sein d'un modèle de cellules souches embryonnaires murines : Rsl24d1. J'ai ensuite étudié son impact phénotypique sur les CSE: leur clonogénicité, leur prolifération et leur pluripotence. D'autre part, les connaissances mécanistiques sur cette protéine étant exclusivement issues du modèle de levure, j'ai également précisé l'impact de Rsl24d1 sur la biogenèse des ribosomes dans ce modèle cellulaire murin.

Sommaire

Remerciements	4
Résumé	8
Préambule	9
Sommaire	11
Liste des figures et tableaux	17
Liste des abréviations	20
INTRODUCTION	22
Partie 1. Contexte scientifique de la découverte des cellules souches embryonnaires	22
1.1 L'origine des cellules souches au cours du développement embryonnaire	22
1.2 Historique de l'identification des cellules souches pluripotentes : les cellules de carcinomes embryonnaires	23
1.3 Isolement des premières cellules souches embryonnaires	24
1.4 Évolution des conditions de culture	25
Partie 2: Les cellules souches embryonnaires murines	26
2. 1 Les voies de signalisation contrôlant l'identité des CSE murines	26
a. Voies de signalisation dépendantes du LIF.....	26
b. Voies de signalisation BMP/Smad/Id	27
c. Voie de signalisation du Fgf	28
d. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine	28
e. Régulation des voies de signalisation Mek/Erk et Gsk3 : la condition 2i.....	29
f. Inhibition combinée des voies de signalisation Fgf, Mek et Gsk3 : la condition 3i	29
2.2 Identité phénotypique des cellules souches embryonnaires murines	30
a. Cycle cellulaire.....	30
b. Clonogénicité	31
c. Pluripotence	31
(i) Pluripotence naïve ou « Naïve pluripotency »	32
(ii) Pluripotence fondamentale ou « Ground pluripotency »	32
(iii) Pluripotence amorcée ou « Primed pluripotency»	32
(iv) Pluripotence intermédiaire ou « Formative pluripotency »	33
(v) Reprogrammation des états de pluripotence	33
(vi) Comparaison des états de pluripotence des CSE murines et humaines.....	35
d. Méthodes d'évaluation de l'identité phénotypique des cellules souches pluripotentes	36
(i) Évaluation de la clonogénicité <i>in vitro</i> : test de formation de colonies	36
(ii) Évaluation de la pluripotence <i>in vivo</i>	37

e.	La différenciation : se différencier ou ne pas se différencier ?	39
(i)	Le contrôle de l'entrée en différenciation.....	39
(ii)	Les différents modèles de différenciation.....	40
2.3	Régulation de l'expression génique dans les cellules souches embryonnaires.....	42
a.	Contrôle épigénétique de l'homéostasie des CSE murines.....	42
b.	Contrôle transcriptionnel de l'homéostasie des CSE murines	43
(i)	Réseaux des facteurs de transcription clés de la pluripotence	44
(a)	Le facteur de transcription Oct3/4 ou Oct4/Pou5f1	44
(b)	Le facteur de transcription Sox2	44
(c)	Le facteur de transcription Nanog.....	45
(d)	Régulations croisées des facteurs de transcription de la pluripotence	45
(ii)	Facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence fondamentale des CSE murines.....	46
c.	Contrôle post-transcriptionnel de l'homéostasie des CSE murines	46
d.	Contrôle traductionnel de la pluripotence des cellules souches embryonnaires	47
2.4	Les cellules souches pluripotentes, un modèle d'étude prometteur en médecine	48
a.	Applications thérapeutiques	48
(i)	Applications <i>in vivo</i> : la thérapie cellulaire.....	48
(a)	Essais cliniques en cours	48
(b)	Traitements par thérapie cellulaire autorisés par les autorités de santé	50
(ii)	Applications <i>in vivo</i> : la thérapie génique.....	51
(iii)	Applications <i>in vitro</i> : Modélisation de pathologies & toxicologie	51
(a)	Les iPSC dérivées de patients.....	51
(b)	Les organoïdes	52
b.	Défis pour l'utilisation en clinique des cellules souches pluripotentes.....	52
(i)	Sécurité et innocuité	52
(ii)	Tolérance immunitaire	53
(iii)	Purification	53
(iv)	Identification du modèle approprié pour le développement pré-clinique.....	54
	Partie 3: Rôle des ribosomes et de leur biogenèse au cours du développement embryonnaire et dans l'homéostasie des cellules souches embryonnaires	55
3.1	Définitions des ribosomes et du processus de traduction.....	55
a.	Découverte, composition et fonctions des Ribosomes	55
(i)	Découverte	55
(ii)	Composition générale des ribosomes	56
(iii)	Fonction des ribosomes.....	56
(iv)	Principaux sites catalytiques du ribosome	57
(a)	L'initiation de la traduction : le site A et le « Decoding centre ».....	57

(b)	L'élongation : le site P et le site de transfert de la liaison peptidique « PTC ».....	59
(c)	La terminaison et le recyclage : le site de sortie ou site E	58
(d)	Interface entre la LSU et la SSU.....	59
b.	La régulation de la traduction	59
(i)	Contrôle de l'initiation de la traduction	60
(a)	Initiation de la traduction « coiffe-dépendante »	60
(b)	Initiation de la traduction « coiffe-indépendante »	60
(ii)	Autres niveaux de régulation de l'initiation de la traduction	61
(a)	La phosphorylation de eIF2 α	61
(b)	Les voies de signalisation de mTOR.....	62
(c)	La biogenèse des ribosomes et l'initiation de la traduction	62
(iii)	Disponibilité des ribosomes et régulation traductionnelle	63
(a)	Conséquences de variations du nombre de ribosomes « disponibles »	63
(b)	La densité de ribosomes influence l'élongation.....	63
(iv)	Fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques	63
(a)	Rôle de protéines ribosomiques dans la signalisation immunitaire innée	63
(b)	Rôle de différents paralogues: exemple de Rpl22/Rpl22l	64
(c)	Stabilisation des ARNm codant les protéines ribosomiques par la SU 40S liée à la protéine LARP1	64
3.2	La biogenèse des ribosomes eucaryotes	65
a.	Localisation, fonction et conservation de la biogenèse des ribosomes	65
(i)	Organisation du nucléole	65
(ii)	La biogenèse des ribosomes s'est complexifiée au cours de l'évolution	67
(iii)	Comparaison des voies de biogenèse chez les levures et les mammifères.....	67
(iv)	La biogenèse des ribosomes, un processus clé de l'homéostasie cellulaire	68
b.	Les différentes étapes et acteurs de la biogenèse des ribosomes eucaryotes	68
(i)	Transcription et clivages des ARNr	68
(ii)	Les modifications des ARNr	70
(a)	Rôle des snoRNP	70
(b)	Rôle des segments d'extension ES des ARNr dans la biogenèse des ribosomes.....	71
(iii)	Association des PR et modifications post-traductionnelles	71
c.	Dynamique et facteurs d'assemblage moléculaire de la SSU et de la LSU des ribosomes eucaryotes	72
(i)	Biogenèse de la particule pré-ribosomique la plus précoce : la particule 90S.....	72
(ii)	Assemblage de la sous-unité 40S	73
(a)	Maturation nucléaire des particules pré-40S précoces.....	73
(b)	Export et Maturation cytoplasmique des particules pré-40S	73
(iii)	Assemblage de la sous-unité 60S	74

(a)	Maturation nucléaire des particules pré-60S précoces.....	74
(b)	Export et maturation cytoplasmique des particules pré-60S.....	75
(iv)	Transition entre biogenèse et traduction.....	76
3.3	Hétérogénéité des ribosomes et de leur biogenèse : au service d'un rôle régulateur de la traduction ?.....	78
a.	Hétérogénéité des ribosomes vers une spécificité fonctionnelle ?.....	78
(i)	Hétérogénéité des modifications post-transcriptionnelles des ARNr	78
(ii)	Hétérogénéité des segments d'extension des ARNr	79
(iii)	Hétérogénéité des protéines ribosomiques	79
(a)	Protéines ribosomiques et leurs paralogues	79
(b)	Expression des protéines ribosomiques.....	80
(c)	Spécificité des modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques	81
(d)	Hétérogénéité des facteurs associés aux ribosomes ou PaR	82
(iv)	Hétérogénéité de la localisation des ribosomes.....	84
b.	Impact fonctionnel de l'hétérogénéité de la biogenèse des ribosomes en situation pathologique	84
(i)	l'anémie de Diamond-Blackfan ou DBA	85
(ii)	le syndrome 5q-.....	85
(iii)	Le syndrome de Treacher Collins ou TCS.....	85
(iv)	Le syndrome de Schwachmann Diamond ou SDS	85
(v)	La cirrhose amérindienne infantile ou NAIC.....	86
(vi)	La dyskératose congénitale liée à l'X ou DC-X	86
(vii)	Tumorigenèse et biogenèse des ribosomes	87
(a)	Implication des PR dans la tumorigenèse.....	87
(b)	Altérations des profils d'expression des ARNr et des snoRNP dans la tumorigenèse.....	88
(c)	La biogenèse des ribosomes, une cible thérapeutique redécouverte pour le développement de chimiothérapies	89
(h)	Altérations des mécanismes de surveillance des ribosomes et pathologies.....	91
c.	Hétérogénéité de la biogenèse des ribosomes au cours du développement	93
(i)	Régulation de la biogenèse des ribosomes au cours du développement embryonnaire et dans les cellules souches	93
(ii)	Différentes étapes de la biogenèse des ribosomes sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie des cellules souches	94
(a)	La transcription des ARNr est impliquée dans l'homéostasie des cellules souches.....	94
(b)	Contrôle épigénétique et transcriptionnel de la biogenèse des ribosomes impliqués dans le maintien de l'identité souche	96
(c)	Rôles de FBR dans le contrôle de l'homéostasie des cellules souches	97
d.	Rôle de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches embryonnaires murines	101
(i)	Rôle du taux de transcription des ARNr	101

(ii) Rôle de la protéine Mki67ip/NIFK	102
(iii) Rôle de la Fibrillarine	103
(iv) Rôle du processome de la petite-sous unité ribosomique	104
RÉSULTATS	105
1. Préambule: Rlp24 est un facteur de biogenèse de la particule pré-60S chez la levure	105
a. Structure de Rlp24 et de Rsl24d1 et homologie avec la protéine ribosomique Rpl24/eL24.....	105
(i) Structure de la protéine Rlp24 et homologie avec Rsl24d1	105
(ii) Homologie entre les séquences peptidiques de Rlp24/Rsl24d1 et Rpl24	105
b. Rlp24, un facteur navette de biogenèse de la particule pré-60S	106
(i) Rlp24 est un facteur navette associé aux particules pré-60S.....	106
(ii) Rlp24 est un facteur de la biogenèse des particules pré-60S chez la levure.....	106
c. Rôle de Rlp24 dans le recrutement de Nog1 au sein des particules ribosomiques pré-60S	107
d. Drg1 initie la libération de Rlp24 et les étapes de maturation cytoplasmique de la sous-unité pré-60S	108
(i) L'extrémité C-terminale de Rlp24 interagit avec l'AAA-ATPase Drg1	108
(ii) L'AAA-ATPase Drg1 : structure et fonction	108
e. Rlp24 est remplacé par la PR Rpl24/eL24 au sein des particules pré-60S cytoplasmiques.....	109
2. Objectifs de la thèse	110
3. Manuscrit en préparation.....	111
Abstract.....	111
Introduction	112
a. Rsl24d1 is enriched in mESCs and its expression is rapidly decreasing during differentiation	113
b. Rsl24d1 is associated to nuclear pre-ribosomes and to cytoplasmic 60S subunits.....	114
c. Rsl24d1 is a pre-60S biogenesis factor	115
d. Rsl24d1 is implicated in mESCs homeostasis	116
e. Rsl24d1 expression level is tightly controlled by mESCs	118
f. Discussion and conclusion.....	118
g. Experimental procedures	120
CONCLUSION ET DISCUSSION GÉNÉRALE	131
1. Rôle du facteur de biogenèse des ribosomes Rsl24d1 dans l'homéostasie des CSE murines	131
a. Rôle de Rsl24d1 dans l'homéostasie des cellules souches.....	131
b. Rsl24d1 et la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches : une régulation quantitative ? ...	132
c. Le niveau d'expression de Rsl24d1 est contrôlé dans les CSE murines	134
2.	135
Impact de Rsl24d1 sur la biogenèse de la sous-unité 60S	135
a. Étapes de maturation des pré-ARNr affectées par la déplétion de Rsl24d1	135
b. Interaction entre Rsl24d1 et Rpl24/eL24	135

c. Identification des partenaires protéiques interagissant avec Rsl24d1.....	136
d. Rsl24d1, un facteur anti-associatif comme eIF6 ?.....	137
3 Rôle de Rsl24d1 dans d'autres tissus adultes et en conditions pathologiques	137
4. Conclusion.....	139
BIBLIOGRAPHIE	141

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Les différents types de cellules souches au cours du développement embryonnaire chez l'homme : de la totipotence à l'unipotence	22
Figure 2 : Les différents états cellulaires au cours du développement embryonnaire chez la souris : de la totipotente à la pluripotence engagée	22
Figure 3 : Comparaison entre les cellules souches embryonnaires murines issues du blastocyste in vivo et les cellules souches de carcinomes embryonnaires cultivées in vitro	23
Figure 4 : Voies de signalisation extra-cellulaires renforçant ou antagonisant la pluripotence naïve et exerçant un impact sur la clonogénicité dans les CSE murines	26
Figure 5 : Impact des voies de signalisation du LIF sur le réseau des facteurs de transcription de la pluripotence, Oct3/4, Sox2 et Nanog	26
Figure 6 : Représentation schématique des voies de signalisation activées par le LIF dans les CSE murines	27
Figure 7 : Régulations croisées entre la voie de signalisation des protéines BMP et les voies de signalisation Wnt et Pi3k/Akt et Mapk impliquées dans l'homéostasie de cellules souches embryonnaires murines	28
Figure 8 : Voie de signalisation Wnt en conditions physiologiques et pathologiques lors de mutation APC	28
Figure 9 : Comparaison de l'expression du récepteur de pluripotence Esrrb dans les colonies de cellules souches embryonnaires cultivées en condition sérum/LIF (« naïve » state of pluripotency) et KSR+2i (« ground » state of pluripotency).	29
Figure 10 : Réseau de régulation impactant la phase G1 du cycle cellulaire et permettant la transition des cellules pluripotentes vers la différenciation	30
Figure 11 : Capture des différents états de pluripotence des CSE murines en culture cellulaire in vitro	31
Figure 12 : Progression de l'état de pluripotence naïf vers l'état engagé ou « primed » au cours du développement embryonnaire et engagement vers les différentes lignées embryonnaires	32
Figure 13 : Schéma représentant la génération des iPSC et leurs différentes utilisations en médecine	35
Figure 14 : Comparaison entre les voies de signalisation des CSE humaines et murines	36
Tableau 1 : Comparaison entre l'état naïf de pluripotence des CSE murines et l'état de pluripotence dit engagé des EpiSC murines	37
Figure 15 : Méthodes utilisées pour prouver la pluripotence des cellules souches embryonnaires (CSE) ou des cellules souches pluripotentes induites (iPSC)	38
Figure 16 : Trois protocoles de différenciation des CSE in vitro	40
Figure 17 : Profil épigénétique de la chromatine dans les cellules souches embryonnaires pluripotentes comparées aux cellules différenciées	42
Figure 18 : Oct4 interagit avec différents partenaires et cibles pour assurer sa fonction du maintien de la pluripotence,	44
Figure 19 : Le réseau de facteurs de transcription de la pluripotence: régulations croisées entre Oct4, Nanog et Sox2	44
Figure 20 : Schéma représentant un promoteur actif dans les CSE	45
Figure 21 : Organisation du réseau génétique de facteurs de transcription du maintien de l'identité de pluripotence naïve	45
Figure 22 : Résumé des facteurs impactant la pluripotence au niveau post-transcriptionnel	46
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des régulateurs post-transcriptionnels de la pluripotence identifiés	47
Figure 23 : Représentation schématique des différents organoïdes formés à partir de cellules souches pluripotentes (CSE ou iPSC) et les voies de signalisation développementales activées	48
Tableau 3 : Pathologies et développement de Thérapies géniques d'après Généthon Bioprod	51
Figure 24 : Structure globale du ribosome humain 80S	55
Figure 25 : Sites fonctionnels des ribosomes	56
Figure 26 : Changements conformationnels du ribosome humain	57
Figure 27 : Modèle canonique d'initiation de la traduction chez les eucaryotes	57
Figure 28 : Dynamique de formation de la liaison peptidique au cours de l'élongation de la traduction	58
Figure 29 : Ponts entre les deux sous-unités ribosomiques	59
Figure 30 : Représentation schématique d'une structure IRES ou « Internal ribosome entry site » et d'un mécanisme d'initiation de la traduction IRES-dépendant	60
Figure 31 : Représentation schématique des différentes régions régulatrices de l'initiation de la traduction coiffe-indépendante au sein d'un ARNm	61
Figure 32 : Parallèle entre les régulations traductionnelles et transcriptionnelles par les éléments agissant en cis	61
Figure 33 : Les différents régulateurs de la traduction Coiffe-dépendante chez les eucaryotes	62
Figure 34 : Stimulation de l'initiation de la traduction par activation de la voie mTOR	62
Figure 35 : Représentation schématique de la régulation de la voie de signalisation mTOR et son implication sur la machinerie traductionnelle	62
Figure 36 : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes et de l'assemblage des différents composants de la machinerie traductionnelle au niveau cellulaire	65
Figure 37 : Représentation schématique de l'assemblage dynamique des différents composants du ribosome au cours de la biogenèse	67
Figure 38 : Les différentes étapes de clivage des pré-ARNr 47S chez les eucaryotes supérieurs permettant la formation des ARN ribosomiques matures 18S, 5,8S et 28S	68
Figure 39 : Structure des snoARN à boîte H/ACA à gauche (A) à boîte C/D à droite	70

Figure 40 : Modèle de formation de la particule pré-ribosomique 90S	72
Figure 41 : Modèle de l'assemblage séquentiel et de la dissociation dynamique des facteurs de maturation de la particules pré-60S	74
Figure 42 : Maturation cytoplasmique et recyclage des facteurs de biogenèse des ribosomes et contrôle qualité de l'assemblage de la sous-unité 60S chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
Figure 43 : Différents intermédiaires de maturation cytoplasmique des particules pré-60S chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
Figure 44 : Représentation de la dynamique d'association et de libération des différents facteurs d'assemblage au cours de la maturation de la particule pré-60S chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
Figure 45 : Export nucléaire de la particule pré-60S et libération cytoplasmique des facteurs non ribosomiques chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
Tableau 4 : Facteurs non ribosomiques impliqués dans les étapes tardives de maturation cytoplasmique de la particule pré-60S, d'après Panse et al., 2010	76
Figure 46 : Les différents niveaux d'hétérogénéité de composition des ribosomes	78
Figure 47 : Interprétation des mécanismes à l'origine des phénotypes tissus-spécifiques des ribosomopathies développées suite à des mutations de protéines ribosomiques (PR) ou de facteurs de biogenèse des ribosomes (FBR)	84
Tableau 5 : Tableau de différentes protéines ribosomiques mutées dans les tumeurs humaines	88
Figure 48 : Représentation schématique des différentes chimiothérapies ciblant et/ou interférant avec la biogenèse des ribosomes et le fonctionnement nucléolaire	89
Figure 49 : Le complexe 5S RNP (RPL5, RPL11 et ARNr 5S) régule MDM2-p53 (TP53) en réponse au stress cellulaire (nucléolaire ou oncogénique),	91
Figure 50 : Représentation schématique du réseau moléculaire 5S RNP (RPL5, RPL11, ARNr 5S)-MDM2-p53 régulant l'activation de p53 (TP53) en réponse à un stress nucléolaire	91
Figure 51 : Représentation schématique du rôle de Nle dans les cellules hématopoïétiques	93
Figure 52 : Structure obtenue par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) de particules pré-60S nucléaires tardives	105
Figure 53 : Représentation des domaines de Rlp24 et Rpl24 définis d'après les homologues de séquence entre les deux protéines chez la levure <i>S.cerevisiae</i> .	105
Figure 54 : Alignements entre les séquences peptidiques de Rsl24d1 murin et RSL24D1 humain	105
Figure 55 : Alignements entre les séquences peptidiques de Rsl24d1 murin, RSL24D1 humain avec Rlp24	106
Figure 56 : Alignements entre les séquences peptidiques de RPL24 humain et murin (à gauche) et Rsl24d1 et Rpl24 murin	106
Figure 57 : Comparaison des structures de Rlp24/Rsl24d1 et de son homologue PR Rpl24 chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
Figure 58 : Schéma récapitulatif des étapes de maturation cytoplasmiques de la sous-unité 60S	107
Figure 59 : Fonction de Drg1 dans les étapes de maturation tardives des ribosomes	108
Figure 60 : Rôle de Rlp24 dans l'export de la sous-unité 60S chez la levure <i>S.cerevisiae</i>	109
Figure 1 : Rsl24d1 is preferentially expressed in naïve pluripotent mouse embryonic stem cells compared to their differentiated progeny and is quickly depleted during embryoid body differentiation.	113
Supplemental Figure S1 : Rsl24d1 expression profile is conserved in different mESC lines	113
Figure 2 : Rsl24d1 is a nucleolar protein mainly associated to cytoplasmic 60S ribosomes in mESCs.	114
Figure 3 : Rsl24d1 depletion impacts ribosome biogenesis by altering cytoplasmic 60S particles formation.	115
Figure 4 : Rsl24d1 depletion impacts mESCs homeostasis.	116
Supplemental Figure S4 :	117
Figure 5 : Rsl24d1 depletion seems to decrease global protein synthesis in mESCs.	118
Figure 61 : Carte du plasmide de surexpression de Rsl24d1 inducible par la doxycycline : <u>PB-TAG-Rsl24d1-Flag-Tag</u>	122

Liste des abréviations

A.

ADN : Acide désoxyribonucléique
APC : adenomatous polyposis coli
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ATM/ATR : « ataxia telangiectasia mutated »/
« ataxia telangiectasia and Rad3-related
protein » ou sérine/thréonine kinase ATR
ATP : Adénosine triphosphate

B.

BMP : « Bone morphogenetic proteins » ou
protéines morphogénétiques des os

C.

CSE : Cellules souches embryonnaires
CSEm : Cellules souches embryonnaires
murines

D.

DC : « Decoding centre » ou centre de
décodage de l'ARNm
DC-X : Dyskératose congénitale liée à l'X
DKC : Dyskérine
DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

E.

EB : « Embryoid bodies » ou corps embryoïdes
eEF1a1 : « eukaryotic elongation factor 1
alpha-1 » ou facteur d'élongation eucaryote 1-
alpha 1
eIF2alpha : « eukaryotic initiation factor 2
alpha » ou facteur d'initiation eucaryote 2
alpha
eIF6 : « eukaryotic initiation factor 6 » ou
facteur d'initiation eucaryote 6 (Tif6 chez la
levure)
ES : « expansion segment » ou segments
d'extension
ETS : « external transcribed spacer » ou
espaceur transcrit externe

F.

FBR : Facteur de biogenèse des ribosomes
FBL : Fibrillarine

G.

GAIT : - « Global Alliance for iPSC Therapy »
ou Alliance mondiale pour la thérapie par iPS
Ou « Gamma Interferon (IFN- Interferon
inhibitor of translation » ou inhibiteur de la
traduction activé par l'interféron γ
GSK3 β : « Glycogen synthase kinase 3 beta »
GTP : Guanosine triphosphate

H.

HLH : « Helix Loop Helix » ou Hélice boucle
hélice

I.

Id : Inhibitor of differentiation
iFgfr : inhibiteur du récepteur Fgf
iGsk3 β : inhibiteur de la Gsk3 β
iMek : inhibiteur de Mek
iPS/iPSC : « induced pluripotent stem cells » ou
cellules souches pluripotentes induites
IRES : « Internal ribosome entry site » ou site
de liaison interne du ribosome
ITAF : « IRES trans-acting factor » ou facteur
agissant en trans des IRES
ITS : « internal transcribed spacer » ou
espaceur transcrit interne

J.

Jak/Stat3: Janus kinase/ Signal Transducer and
activator of transcription

K.

Klf4 : « Kruppel-like factor 4 »

L.

LIF: "Leukemia Inhibitory Factor" ou Facteur
inhibiteur dans les leucémies
LSU : « Large subunit » ou grande sous-unité
ribosomique (60S)

M.

MCI : Masse cellulaire interne
MPNST : « Malignant Peripheral Nerve Sheath
Tumors » ou tumeurs malignes des gaines
nerveuses périphériques
mTOR : « mammalian target of rapamycin »
ou cible de la rapamycine chez les
mammifères

N.

NAIC : « North american indian childhood cyrrhosis » ou cirrhose amérindienne infantile
NCL : Nucléoline
NFKB : « nuclear factor-kappa B » ou facteur nucléaire kappa B
NPM : Nucléophosphine
NTD : Domaine N-terminal

O.

Oct4 : « octamer-binding transcription factor 4 » également connu sous le nom de *Pou5f1* ou *Oct3/4*

P.

PaR : Protéine associée au ribosome
Pi3k/Akt : Phosphoinositide 3 kinase/ Akt
Pias3 : « Protein Inhibitor Of Activated STAT3 » inhibiteur protéique de STAT3 activé
PR : protéine ribosomique
PTC : « Peptidyl transferase center » ou centre de transfert de la liaison peptidique
PTM : « Post-translational modifications » ou modifications post-traductionnelles

R.

RE : Réticulum endoplasmique
Rsl24d1/Rlp24 : « ribosomal L24 domain containing 1 » ou « ribosomal protein L24 like » également dénommée L30; RLP24; RPL24; TVAS3; RPL24L; C15orf15; HRP-L30-iso
RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

S.

SBDS : Syndrome de Schwachman –Bodian - Diamond ou Maladie de Schwachman

SCID : « Severe combined immunodeficiency » ou Immunodéficienc e combinée sévère
Shp2/Mapk : (Src homology 2) domain-containing tyrosine phosphatase 2/ Mitogen activated protein kinase
Smad: Sma mothers against decapentaplegic
Socs3: “ Suppressor of cytokine signaling 3” ou supresseur de la signalisation des cytokines 3
snoARN: “small nucleolar RNA” ou petit ARN nucléolaire
Sox2: “SRY-related HMG-box gene 2 »
SSU : « Small subunit » ou petite sous-unité ribosomique (40S)
STAT : « Signal transducer and activator of transcription » ou transducteur de signal et activateur de transcription
SU : sous-unité

T.

Tcf : « T cell factor »
TOP : « Track of pyrimidine » ou piste de pyrimidine
TP53 : « Tumor protein P53 » ou protéine tumorale P53

U.

UTR : « Untranslated region » ou région non traduite

Autres :

4EBP : « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 3-2 »

INTRODUCTION

Partie 1. Contexte scientifique de la découverte des cellules souches embryonnaires

1.1 L'origine des cellules souches au cours du développement embryonnaire

Chez les métazoaires, la reproduction sexuée consiste en la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde, tous les deux haploïdes pour former un zygote diploïde qui constitue le premier stade de l'embryon. Après cette étape de fécondation (Jour 1 et 2), la première division cellulaire donne naissance à deux cellules filles identiques indifférenciées, les blastomères. Au jour 3-4, l'embryon murin passe du stade 4 à 8 puis à 16 cellules. On parle du stade Morula. Les cellules qui composent la morula sont à l'origine à la fois des différents tissus embryonnaires et extra-embryonnaires, ces cellules sont dites totipotentes. Au jour 5, les divisions se poursuivent pour former une structure appelée blastocyste qui est contenue et contrainte dans l'enveloppe formée par la membrane protectrice de l'ovocyte. À l'intérieur du blastocyste se forme une cavité appelée blastocèle (Figure 1).

À partir du stade morula, les cellules adhèrent les unes aux autres et se polarisent : un pôle est en contact avec la membrane de l'ovocyte, l'autre pôle avec l'intérieur de l'embryon. Cette polarisation est essentielle pour établir la symétrie de l'embryon qui permet d'orienter le devenir et la spécification cellulaire et d'assurer une organogénèse correcte. À ce stade, les cellules périphériques forment le trophoctoderme et le tissu extra-embryonnaire, qui permettent l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine et la formation du placenta, essentiel pour les échanges de nutriments avec la mère. Les cellules situées au centre de l'embryon forment la masse cellulaire interne, à l'origine des différents tissus embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) puis de l'ensemble des tissus adultes (Figure 3A). Les cellules de la masse cellulaire interne forment l'épiblaste précoce et sont dans un état de pluripotence naïf i.e. elles perdent leur capacité à former les tissus extra-embryonnaires, mais restent capables de former les différents tissus embryonnaires. Au jour 6, l'embryon a perdu l'enveloppe de l'ovocyte et les cellules de la masse cellulaire interne se différencient en cellules de l'épiblaste tardif et en cellules de l'endoderme primitif (hypoblaste) à l'origine notamment du cordon ombilical.

Au jour 7, les cellules du trophoctoderme entrent en contact avec la muqueuse utérine ou endomètre, c'est le début de l'implantation. Au stade post-implantatoire, les cellules de l'épiblaste tardif sont dans un état de pluripotence dit « primed pluripotency », c'est-à-dire déjà pré-engagées vers un feuillet embryonnaire.

En résumé, au cours du développement embryonnaire le potentiel développemental du zygote évolue progressivement d'un état de totipotence vers un état de pluripotence naïf au stade pré-implantatoire puis vers un état de pluripotence engagé ou amorcé après l'implantation (Figure 1).

Une fois le développement achevé, des cellules souches adultes ayant des capacités de différenciation restreintes demeurent au sein de différents organes et de tissus adultes, et résident dans des micro-environnements particuliers appelés niches. Ces cellules souches des tissus adultes sont dites multipotentes ou unipotentes en fonction de leur capacité à générer respectivement plusieurs ou un seul type tissulaire au sein de leur organe hôte (Figure 1), Elles assurent l'homéostasie et la régénération tissulaire^{6,7}. Les CSE murines sont issues du stade blastocyste précoce pré-implantatoire de l'embryon (jour 3,5 à 4,5) (Figure 2) et récapitule *in vitro* l'identité de pluripotence naïve.

1.2 Historique de l'identification des cellules souches pluripotentes : les cellules de carcinomes embryonnaires

À la fin des années 1960, la biologie développementale a été révolutionnée par l'isolement et la caractérisation de cellules aux propriétés particulières au sein de tératocarcinomes : les cellules souches de carcinomes embryonnaires ou CEC⁸. Les tératocarcinomes sont des tumeurs très hétérogènes formées de différents types tissulaires et contenant des structures entièrement différenciées comme des cheveux et des dents.

En 1954, Stevens & Little avaient identifiés les cellules issues de tératomes testiculaires comme capables d'être maintenues indéfiniment par transplantations successives⁹. Dix années plus tard, en 1964, la malignité et la transplantabilité des tératocarcinomes ont été attribuées à un type cellulaire particulier dénommé les cellules embryonnaires de carcinomes (CEC) (Figure 3A,3B). Ces cellules indifférenciées et prolifératives, injectées dans le cerveau de souris adultes, sont capables de régénérer tous les constituants cellulaires d'un tératocarcinome¹⁰. Ce fut la première démonstration des propriétés de pluripotence des CEC.

Par la suite, Martin & Evans ont identifié des variabilités dans le potentiel de différenciation de différentes lignées de CEC et ont ainsi empiriquement défini les conditions de culture cellulaire optimales pour le maintien de la pluripotence des CEC^{11,12}. Ces derniers ont également démontré la capacité des CEC à récapituler les étapes précoces de différenciation de l'embryon par la formation de structures appelées « corps embryoïdes »¹². Les corps embryoïdes sont des amas cellulaires composés de cellules exprimant des marqueurs des trois feuilletts embryonnaires primitifs (Figure 3B). Toutefois, bien que les lignées de CEC expriment des marqueurs suggérant une identité

embryonnaire, leur pluripotence évaluée par leur capacité à coloniser un embryon hôte et à générer des embryons chimériques restait faible.

Le concept de « pluripotence », c'est à dire, la capacité des cellules souches à récapituler *in vitro* le potentiel développemental de la cellule dont elles sont issues et à réintégrer *in vivo* le développement embryonnaire, a donc émergé il y a plus de 50 ans par l'étude des cellules souches de carcinomes embryonnaires (CEC). Depuis, un ensemble d'études de physiopathologie humaine, de génétique, de développement précoce chez les rongeurs et les primates, d'immunologie, de culture cellulaire et de physiologie développementale ont contribué à capturer cet état développemental particulier dans différentes espèces et chez l'homme^{6,7,11,13}.

1.3 Isolement des premières cellules souches embryonnaires

Le challenge technique d'isoler des cellules souches pluripotentes directement à partir d'embryons a été réalisé en 1981 par Evans & Kaufman⁸. Ces derniers, en utilisant les conditions de culture définies pour l'expansion clonale des CEC ont réussi à isoler des cellules de l'embryon murin précoce ayant un comportement identique aux CEC⁸. Ces cellules pluripotentes capables de former des tératomes ont par la suite été dénommées Cellules Souches Embryonnaires (CSE).

En 1986, il a été démontré que des CSE modifiées génétiquement pour exprimer un gène rapporteur fluorescent, étaient capables de contribuer au développement embryonnaire en formant un organisme chimérique viable possédant des cellules somatiques et germinales fluorescentes^{14,15}. Ces individus chimériques sont formés par greffe de CSE au sein de blastocystes hôtes et sont ainsi formés de deux populations cellulaires génétiquement différentes. Ainsi, les CSE réinsérées dans leur environnement développemental d'origine sont capables de coloniser et de ré-initier le développement embryonnaire au stade où elles s'étaient figées lors de leur isolement. Ces CSE possèdent donc toutes les informations nécessaires pour reconstituer à elles seules un organisme entier viable et fertile au sein d'un blastocyste hôte. Cette expérience constitue donc la première démonstration historique de l'existence des cellules pluripotentes au sein de l'embryon murin précoce et de leur contribution lors de l'embryogénèse. Ces propriétés particulières des CSE ont constitué une révolution en biologie développementale et en biologie de la reproduction et ont permis le développement de modèles murins chimériques en vues d'études génétiques.

Ainsi, l'ingénierie du génome des CSE s'est rapidement démocratisée dans les années 1980 à 1990. Différents modèles murins chimériques ont ainsi contribué à fortement accélérer la compréhension de nombreux mécanismes génétiques et moléculaires fondamentaux de la biologie.

Ce n'est toutefois qu'à la fin des années 1990 que la biologie et l'homéostasie des CSE se sont trouvées au centre de nombreuses études scientifiques¹¹. En effet, en plus de leur intérêt pour la

biologie reproductive et fondamentale, les CSE issues d'embryons (sains ou pathologiques) constituent également un outil très puissant pour la recherche biomédicale et notamment pour la modélisation de maladies génétiques rares dont certains cancers, pour les études de toxicologie précliniques et pour la médecine régénérative. Enfin, l'orientation de la différenciation des CSE vers un type cellulaire particulier présente un potentiel important dans le développement de stratégies de régénération tissulaire. En France, la recherche biomédicale sur l'embryon est encadrée par l'agence de la biomédecine qui veille au respect des valeurs éthiques.

1.4 Évolution des conditions de culture

Les protocoles de culture et d'isolement des cellules souches embryonnaires à partir d'embryons au stade blastocyste précoce ont évolués depuis 1981. Différentes étapes clés, dont le développement de milieux conditionnés, ont permis d'augmenter le rendement d'isolement des CSE et de s'affranchir de la variabilité inhérente à la composition du sérum.

Ainsi, les progrès dans la compréhension des voies de signalisation participant au maintien de la pluripotence des CSE murines ont permis d'augmenter la proportion de cellules souches dérivées à l'état de pluripotence naïve après leur isolement. La pluripotence des CSE isolées est évaluée par deux tests fonctionnels principaux *in vivo*: le test de formation de chimères et le test de complémentation tétraploïde (détaillés par la suite partie 2.2 d. (ii)).

Les CSE peuvent être cultivées en présence d'une combinaison de molécules pharmacologiques ciblant les voies de signalisation permettant leur maintien (LIF, iGsk3, iMek, iFgfr). On parle de condition LIF/sérum, LIF/2i ou 3i^{11,13}. Ces différentes conditions de culture permettent de capturer les différents états de pluripotence *in vitro* et seront décrites en détail dans la partie 2 de l'introduction.

Partie 2: Les cellules souches embryonnaires murines

2. 1 Les voies de signalisation contrôlant l'identité des CSE murines

L'activation des voies de signalisation Wnt/ β -caténine, MEK/ERK, LIF/Stat3 et BMP/Smad/Id par différents signaux du microenvironnement contribue aux propriétés des CSE en orchestrant de nombreux mécanismes moléculaires (Figure 4). Ainsi, l'identité des CSE est assurée par le contrôle de l'expression génique aux niveaux épigénétique, transcriptionnel (par les facteurs de transcription Oct4, Nanog, Sox2, Myc et Klf4 entre autres), post-transcriptionnel et traductionnel. Ces différents niveaux de régulation de l'expression génique contribuent activement au maintien de l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire.

Les conditions nécessaires au maintien de la pluripotence et de la clonogénicité des CSE murines ont tout d'abord été décrites de façon empirique : nécessité de co-culture sur cellules nourricières, les fibroblastes embryonnaires murins, nécessité de les cultiver en milieu conditionné contenant les facteurs biologiques actifs libérés par des cellules ou un explant tissulaire ou cours d'une période de culture. Le maintien des CSE à l'état de pluripotence naïve *in vitro* nécessite en effet l'ajout de cytokines particulières et de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture.

Nous savons maintenant que l'identité des CSE murines est récapitulée artificiellement *in vitro* par différents signaux extrinsèques et intrinsèques qui permettent de les maintenir pendant des durées prolongées¹⁶.

Parmi les voies de signalisation importantes pour les CSE, deux sont absolument indispensables au maintien des CSE murines à l'état de pluripotence naïf en culture (Figure 5-6)¹¹ :

- La voie Jak/Stat3, stimulée par le LIF « *Leukemia inhibitory Factor* »
- La voie BMP/Smad/Id, activée par les facteurs BMP présents dans le sérum « *Bone morphogenetic protein* »/ « *Sma mothers against decapentaplegic* »/ « *Inhibitors of DNA binding and cell differentiation* »

Ces voies de signalisation impliquées dans le maintien des CSE murines à l'état de pluripotence naïf sont décrites ci-dessous.

a. Voies de signalisation dépendantes du LIF

Le LIF est une cytokine essentielle au maintien des CSE murines à l'état de pluripotence naïf. Le LIF appartient à la famille des cytokines IL-6¹⁷. Après liaison à son récepteur LIFR, le LIF active trois voies de signalisation principales (Figure 5 -6) :

- **la voie Jak/Stat3**
- La voie PI3k/Akt

- La voie Shp2/Mapk

Ces voies de signalisation convergent pour orchestrer le profil d'expression génique des CSE (Figure 5). Toutefois, la voie de signalisation la plus importante dans le maintien des CSE murines est la voie LIF/JAK/Stat3. En effet, l'activation de Stat3 est nécessaire et suffisante au maintien des CSE en culture associée au sérum. Cette démonstration a été réalisée grâce au développement de lignées de CSE murines exprimant un mutant dominant négatif de Stat3¹⁸. Après liaison à son récepteur, LIF-R associé à la glycoprotéine gp130, le LIF sous forme d'un complexe hétérodimérique active la kinase Jak par transphosphorylation qui phosphoryle ensuite Stat3. Les Stat (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont des protéines ayant un rôle double de médiateurs des signaux membranaires et de facteurs de transcription. Une fois phosphorylée, la protéine Stat3 s'homodimérise puis est importée dans le noyau où Stat3 agit comme un facteur de transcription et active la transcription de ses gènes cibles dont de nombreux gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence comme *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Esrrb*^{19,20} (Figure 6.a). La voie Jak-/Stat3 est contrôlée par un ensemble de régulateurs négatifs (*Socs3*, *Pias3*) formant une boucle de rétrocontrôle permettant le contrôle temporel de l'activation de cette voie de signalisation suite à la liaison du LIF²⁰. L'activation de la voie Jak/Stat3 est donc essentielle à l'homéostasie des CSE murines.

Les voies Pi3k/Akt et Shp2/Mapk sont activées par le LIF mais sont minoritaires (Figure 6.b.c). Ces voies ont un rôle antagoniste à celui de la voie Jak/Stat3 et contribuent notamment à réprimer la transcription de gènes codant pour des facteurs de transcription de la pluripotence comme *Nanog*. Les voies Pi3k/Akt et Shp2/Mapk favorisent la différenciation des CSE murines.

b. Voies de signalisation BMP/Smad/Id

En culture *in vitro*, les CSE murines sont maintenues en routine dans un état de pluripotence naïf en présence de LIF et de sérum ou de LIF associé aux protéines BMP2 ou BMP4²¹. Les protéines BMP activent la phosphorylation de Smad qui active la transcription des protéines inhibitrices de la différenciation (*Id1* et *Id3*) responsables de l'inhibition de la transcription de gènes de la différenciation (Figure 4 et 7). Les protéines Id ont une structure HLH qui antagonise l'activité de facteurs de transcription à structure bHLH impliqués dans la détermination des identités cellulaires (comme *MyoD* pour les cellules musculaires striées ou *Mash1* pour les neurones sensoriels olfactifs). Ainsi, ces protéines favorisent le maintien de la clonogénicité des CSE²¹⁻²⁴. De plus, indépendamment des BMP, le sérum induit l'expression des gènes Id par différentes voies de signalisation impliquant des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine.

D'autre part, différents modes de régulations croisées ont été décrits entre les protéines BMP et les voies de signalisations Mapk, Pi3k/Akt, Wnt, Hedgehog, Notch et les cytokines IL, IFN γ et TNF α .

Les voies de signalisation Pi3k/Akt et Mapk/Erk interagissent avec la voie de signalisation des protéines BMP en diminuant l'activité transcriptionnelle des protéines Smad. En effet, Mapk et Akt se lient et/ou phosphorylent les protéines Smad contrôlant ainsi leur distribution intracellulaire ainsi que leur impact sur la transcription. Les mécanismes moléculaires précis de ces régulations ne sont toutefois pas encore totalement établis (Figure 7.A)²⁵. Les voies PI3K/Akt et Mapk empiètent donc sur les voies de signalisation des protéines BMP²⁵.

D'autre part, les protéines BMP et la voie Wnt interagissent au sein du noyau où les protéines Smad et les partenaires Tcf/Lef/ β -caténine régulent synergiquement l'expression de gènes cibles impliqués dans le maintien de la pluripotence comme *Esrrb* (Figure 4 et 7.B). La voie Wnt interagit également dans le cytoplasme avec la voie de signalisation des protéines BMP, la liaison entre Smad7 et l'axine stimule les voies des protéines BMP. Enfin, les protéines BMP sont capables d'exercer un contrôle transcriptionnel sur la production des ligands de la voie Wnt et inversement²⁵.

c. Voie de signalisation du Fgf

Dans les CSE murines, le Fgf4 a initialement été impliqué dans les boucles de rétro-contrôle assurant le maintien de leur clonogénicité. Toutefois, la caractérisation de CSE murines délétées pour *Fgf4* a au contraire mis en avant son rôle dans l'initiation de la différenciation²⁶. Le Fgf4 est un inducteur puissant de la voie Mapk/Erk dans les CSE murines. Ainsi, l'inhibition pharmacologique (inhibiteurs sélectifs des enzymes Mek1/2) ou génétique (mutant *Erk2*) de Erk1/2 rend les CSE murines résistantes à la différenciation. Les CSE murines ayant subi cette inhibition peuvent alors être maintenues en culture en présence de LIF seul^{22,26,27}. Étant donné que la voie de signalisation Erk est une voie de signalisation essentielle dans de nombreux types cellulaires, l'indépendance à cette voie est donc une propriété caractéristique des CSE murines.

En revanche, la voie de signalisation du « *Fibroblast Growth Factor* » ou FGF est indispensable au maintien de la clonogénicité des CSE humaines^{26,28}. Les CSE humaines produisent des quantités importantes de FGF4 et expriment un récepteur associé, le FGFR2 (détaillé dans la partie 2.2 c. (vi)).

d. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La kinase Gsk3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) a été impliquée dans l'engagement des CSE murines et humaines vers la différenciation par des approches pharmacologiques et génétiques^{29,30}. Les inhibiteurs de Gsk3 (iGsk3) ont ainsi pour effet d'augmenter la viabilité des CSE et d'inhiber leur différenciation. Le rôle de l'inhibition de Gsk3 β dans l'homéostasie des CSE est multifactoriel³¹.

Toutefois, l'effet principal des iGsk3 est médié par l'activation de la voie canonique Wnt/ β -caténine par stabilisation de la β -caténine³². Les iGsk3 empêchent la phosphorylation de la β -caténine par Gsk3 et l'adressage consécutif de celle-ci au protéasome pour sa dégradation. La β -caténine s'accumule alors dans le noyau et forme un complexe avec le facteur de transcription Tcf3 dans les CSE³³⁻³⁵. Le facteur Tcf3, de la famille des facteurs Tcf/Lef, fonctionne principalement comme un répresseur de facteurs de transcription clés de la pluripotence^{11,36-38}. L'interaction de Tcf3 avec la β -caténine lève cette répression en dissociant Tcf3 de ses domaines de liaison à l'ADN³⁹. Les iGsk3 stimulent ainsi la voie Wnt en stabilisant la β -caténine et induisent une résistance à la différenciation des CSE par levée de l'inhibition de Tcf3 sur les facteurs de transcription clés de la pluripotence (Figure 8). L'interaction β -caténine/Tcf3 est donc l'axe principal par lequel les iGsk3 contribuent à l'homéostasie des CSE. Toutefois, les ligands de Wnt ne récapitulent pas entièrement l'effet des iGsk3, suggérant l'existence d'effets cellulaires indépendants de la β -caténine⁴⁰.

e. Régulation des voies de signalisation Mek/Erk et Gsk3 : la condition 2i

La propagation en culture des CSE murines est possible sans LIF et sans sérum en combinant les inhibiteurs sélectifs des voies Gsk3 et Mek/Erk (respectivement PD0325901 & CH99021)²². Ces conditions de culture sont résumées sous la dénomination « condition 2i ». La combinaison de ces deux inhibiteurs permet l'expansion clonale des CSE et leur isolement à partir de blastocystes murins.

D'autre part, la culture des CSE en condition 2i associée au LIF permet de réduire le mosaïcisme cellulaire inhérent à la condition LIF et sérum (Figure 9). Le milieu LIF/2i contribue à l'obtention d'une population clonale indifférenciée très homogène⁴¹. Ces propriétés ont conduit à la définition d'un état de pluripotence dit « Ground state » ou « état fondamental » dans lequel des populations homogènes de CSE sont isolées des signaux inducteurs de différenciation. Ces CSE murines s'auto-renouvelleraient de façon stable et pérenne tout en conservant leur potentiel à se différencier en toutes les lignées somatiques et germinales (Figure 4 et 9). Toutefois, une étude récente a mis en évidence que seule l'inhibition à court terme des voies Mek1/2 permettait de maintenir un état de pluripotence naïf homogène, une inhibition prolongée aboutirait au contraire à la déstabilisation de cet état de pluripotence⁴².

f. Inhibition combinée des voies de signalisation Fgf, Mek et Gsk3 : la condition 3i

La combinaison d'inhibiteur du récepteur Fgfr (voie de signalisation autocrine Fgf4) en complément de l'inhibition des voies Mek et Gsk3 (respectivement SU5402 associé aux 2i PD184352 et CHIR99021) a également récemment été décrite comme suffisante au maintien et à l'amplification

des CSE en culture en absence de LIF et de BMP²². Ces conditions de culture ont été définies comme la condition 3i²².

2.2 Identité phénotypique des cellules souches embryonnaires murines

Différents mécanismes moléculaires orchestrent l'homéostasie des CSE et leurs propriétés de clonogénicité et de pluripotence. Les CSE sont capables de s'autorenouveler en conservant leur potentiel développemental pour maintenir une population de cellules souches (clonogénicité) et sont également capables de se différencier pour former les différents tissus embryonnaires et adultes (pluripotence). Ces propriétés reposent sur une régulation particulière du cycle cellulaire dans les CSE.

Les particularités phénotypiques des CSE murines seront décrites ci-dessous ainsi que les différents tests fonctionnels permettant l'évaluation de leur phénotype « souche ». Enfin, les similarités et les différences phénotypiques entre les CSE murines et humaines seront abordées.

a. Cycle cellulaire

Les divisions cellulaires successives et le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire assurent la transmission et la conservation d'une information génétique fidèle après les différents cycles de divisions des cellules souches. Le cycle cellulaire d'une cellule différenciée est classiquement constitué de l'alternance d'une phase G1 de métabolisme normal et de croissance cellulaire, de la phase S de réplication de l'ADN, puis de la phase G2 de préparation à la phase M de mitose. Les cellules souches embryonnaires sont caractérisées par un cycle cellulaire particulier constitué d'une phase G1 courte (environ 15% du temps), suivie d'une phase S très importante (60-65% du temps), avec absence de checkpoint G1/S⁴³⁻⁴⁵. Les CSE se divisent rapidement. Leur cycle cellulaire est de 8-10h pour les CSE murines et de 8-16h pour les CSE humaines⁴⁴. Les cellules pluripotentes de l'épiblaste et les iPSC ont des cycles cellulaires très similaires.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer le profil particulier du cycle cellulaire des CSE et son rôle dans le maintien de la pluripotence. Toutefois, les outils expérimentaux permettant d'adresser pleinement la question n'ont été développés que récemment. Ainsi, des études ont démontré l'interconnexion entre les réseaux régulant le cycle cellulaire et ceux assurant le maintien de la pluripotence. La phase G1 des CSE est la période du cycle cellulaire durant laquelle le réseau de facteurs de transcription de la pluripotence (Oct4, Nanog, Sox2) interagit avec la machinerie du cycle cellulaire (complexes CDK-cycline, RB) et crée une fenêtre d'opportunité pour orienter les CSE vers le maintien ou la sortie de la pluripotence (Figure 10). Cette décision a lieu suite à l'intégration des signaux du microenvironnement par les CSE. Lorsque les CSE entrent en phase S, l'interconnexion

entre les machineries du cycle cellulaire et les facteurs de transcription de la pluripotence est perdue⁴⁴⁻⁴⁶.

b. Clonogénicité

La deuxième propriété phénotypique des cellules souches est leur clonogénicité i.e. leur capacité à s'auto-renouveler indéfiniment en générant des cellules filles avec la même capacité développementale. Cette propriété est indissociable de la pluripotence, i.e. la capacité des cellules souches à proliférer en conservant leur capacité à s'engager vers la différenciation.

En culture cellulaire *in vitro*, l'identité naïve et la clonogénicité des CSE est maintenues par un ensemble de facteurs.

Le LIF est le facteur principal de la clonogénicité des CSE murines. Comme décrit ci-dessus, le LIF transduit son signal via les voies Jak/Stat3, Pi3k/Akt et Shp2/Mapk/Erk. L'activation des protéines Mapk/Erk et Pi3k par liaison du LIF à son récepteur n'est pas nécessaire à la clonogénicité des CSE et exerce même un effet antagoniste. L'inhibition de Erk permettant en effet un autorenouvellement accru des CSE¹¹. L'effecteur de la clonogénicité des CSE est la protéine Stat3 dont le mécanisme moléculaire a été décrit ci-dessus.

L'autre voie de signalisation indispensable au maintien de la clonogénicité des CSE est la voie BMP. Les BMP sont de puissants inhibiteurs de la différenciation neurale. Associés au LIF, les protéines BMP assurent le maintien de l'autorenouvellement des CSE par le mécanisme moléculaire décrit précédemment²¹.

Les voies du Fgf, Mek/Erk et Gsk3 sont antagonistes de l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires murines^{29,30}. L'inhibition de ces voies renforce la clonogénicité des CSE.

c. Pluripotence

Différents états de pluripotence existent *in vivo* au cours du développement embryonnaire et peuvent se distinguer par leur temporalité relative au moment de l'implantation de l'embryon : on distingue ainsi différents degrés de pluripotence correspondants aux moments pré, peri et post-implantatoires (Figure 11-12, Figure 2). Ces différents états de pluripotence ont pu être capturés pharmacologiquement *in vitro* et également *ex vivo* dans les cellules pluripotentes induites ou iPSC. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies Fgf/Erk et Gsk3 (condition 2i) ont permis à la fois la dérivation de cellules souches embryonnaires et la reprogrammation de cellules somatiques murines et humaines^{6,47-49}.

(i) Pluripotence naïve ou « Naïve pluripotency »

L'état de pluripotence naïf est un état de pluripotence transitoire dans lequel les cellules souches embryonnaires sont capables de générer tous les lignages embryonnaires. Il est observé au sein d'un type cellulaire spécifique issu de la masse cellulaire interne au stade blastocyste : l'épiblaste pré-implantatoire. L'épiblaste correspond à un ensemble de 10-20 cellules non spécialisées possédant un potentiel développemental illimité et une flexibilité lui permettant de générer tous les lignages embryonnaires suite à micro-injection dans un autre blastocyste.

Cet état de pluripotence est récapitulé *in vitro* par la culture de CSE en milieu conditionné avec du LIF et du sérum (une source de BMP) ou du LIF et des protéines BMP. Dans ces conditions, les CSE forment une population hétérogène qui contient une proportion de cellules engagées vers la différenciation. Ces cellules sont identifiées par leur co-expression de marqueurs de pluripotence et de marqueurs d'engagement vers les différents feuilletts embryonnaires⁵⁰.

(ii) Pluripotence fondamentale ou « Ground pluripotency »

Le « Ground state pluripotency » est un état de pluripotence naïf très homogène, dépourvu de sous-population cellulaire engagée vers la différenciation. Cet état de pluripotence est récapitulé *in vitro* par la culture de CSE murines en condition LIF/2i (inhibiteurs des voies Mek/Erk (PD0325901) et Gsk3 (CHIR99021)). Dans l'état de pluripotence « Ground State », les CSE s'auto-renouvellent de façon robuste en l'absence de signaux extra-cellulaires comme les protéines BMP issues du sérum^{22,50,51}. Toutefois, comme décrit ci-dessus, seule l'inhibition à court terme des voies Mek1/2 permettait de maintenir un état de pluripotence naïf homogène, une inhibition prolongée aboutirait au contraire à la déstabilisation de cet état de pluripotence⁴².

(iii) Pluripotence amorcée ou « Primed pluripotency »

L'état de pluripotence dit « primed » pour amorcé, est atteint après implantation de l'embryon (Figure 11-12)⁶, au sein de l'épiblaste post-implantatoire tardif. L'épiblaste évolue en un épithélium qui présente la forme d'une coupe et qui est compétent pour répondre aux stimuli des tissus extra-embryonnaires afin de s'engager vers les différents lignages embryonnaires.

In vitro, l'état de pluripotence amorcé de l'épiblaste post-implantatoire tardif est récapitulé par les cellules souches épiblastiques murines ou EpiSC. Cet état amorcé est capturé par maintien sur plusieurs passages du traitement Fgf, Activin (FA). Le FA permet le maintien de l'auto-renouvellement des EpiSC murines sous la forme d'une population hétérogène, contenant des sous-populations engagées vers la différenciation. Un état de pluripotence amorcé et un auto-renouvellement des EpiSC plus homogène est atteint par inhibition de la voie Wnt¹¹.

Les EpiSC sont capables de former des tératocarcinomes mais ont une très faible capacité à générer des chimères suggérant le maintien de leur clonogénicité mais la perte d'une partie de leur potentiel de différenciation¹¹..

De façon intéressante, les CSE murines dans un état de pluripotence naïf et les EpiSC amorcées répondent différemment aux voies de signalisation : le traitement FA (Fgf, Activin) active la différenciation des CSE alors qu'il assure le maintien de la clonogénicité des EpiSC^{32,50}.

(iv) Pluripotence intermédiaire ou « Formative pluripotency »

In vitro, l'activation de la différenciation des CSE murines (traitement de 48h par du Fgf et de l'Activin) conduit à la formation (de cellules « Epiblast-Like Cells » ou EpiLCs. Cet état est transitoire et correspond au jour 5,75 du développement embryonnaire murin. Les EpiLC conservent leur clonogénicité. Actuellement, on se sait ni s'il est possible de recapturer les EpiLC par d'autres combinaisons de facteurs ni si cette population cellulaire est homogène.

La pluripotence spécialisée des EpiLC est le seul état développemental à partir duquel il est possible de générer des cellules germinales primordiales (PGCLC). Les CSE n'ont probablement pas encore cette capacité alors que les EpiSC l'ont perdue⁵⁰.

(v) Reprogrammation des états de pluripotence

Les cellules pluripotentes sont donc formées *in vivo* et récapitulées *in vitro* dans un spectre d'états développementaux variés.

En 2006, Yamanaka & Takahashi ont démontré la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques murines en cellules pluripotentes induites (iPSC) par expression d'un cocktail de quatre facteurs de transcription de la pluripotence (Oct4, Klf4, c-Myc et Sox2 ou OKMS)⁴⁸.

L'équipe du Dr Yamanaka a réédité ce processus de reprogrammation en 2007 à partir de fibroblastes humains, ouvrant ainsi la voie à un domaine entier de recherche sur les iPSC et la reprogrammation cellulaire^{48,52}. Bien qu'historiquement et plus fréquemment obtenus à partir de fibroblastes, des iPSC ont été reprogrammées à partir de plusieurs types cellulaires adultes tels que les kératinocytes, les progéniteurs hématopoïétiques, les granulocytes ou les précurseurs de cellules musculaires par exemple^{48,52}.

L'émergence et le développement des iPSC a été possible grâce à la conjonction de progrès scientifiques majeurs dans les domaines de la reprogrammation par transfert nucléaire (clonage de cellules somatiques et transfert nucléaire dans des oocytes énucléés)⁵³, l'étude des facteurs de transcription clés de la pluripotence⁵⁴ et la compréhension des mécanismes de maintien des CSE⁵⁵. Les différentes technologies utilisées pour surexprimer les facteurs de reprogrammation, permettent de générer des iPSC de manière assez reproductible mais avec une efficacité faible (jusqu'à 1%)⁵⁶. À l'heure actuelle, les mécanismes permettant d'expliquer ce faible pourcentage de reprogrammation

ne sont pas totalement élucidés. Toutefois, les conditions de culture de ces cellules semblent avoir un rôle important⁵⁶. La similarité entre les CSE et les iPSC est largement discutée au sein de la communauté scientifique et dépend en partie des méthodes de génération des iPSC, du nombre de clones étudiés et des conditions de culture cellulaire utilisées⁵⁶.

Bien que les iPSC soient phénotypiquement semblables aux cellules souches embryonnaires, en 2009, des différences d'expression génique et de profil épigénétique entre les iPSC et les CSE humaines ont été identifiées^{11,48,57}. L'étude de Chin *et al.* souligne en effet qu'environ 20% des gènes semblent significativement différentiellement exprimés (facteur de 1,5) entre les CSE et les lignées d'iPSC humaines à faible passage⁵⁸. Parmi ces gènes, environ 80% sont plus faiblement exprimés dans les iPSC comparées aux CSE humaines. Ces gènes semblent être impliqués dans des processus cellulaires basiques comme le métabolisme énergétique, la maturation des ARN, la réparation de l'ADN et la mitose. Les gènes impliqués dans le processus de différenciation semblent eux au contraire plus fortement exprimés dans les iPSC humaines. Ces données suggèrent que les iPSC humaines se trouvent dans un état de pluripotence plus restreint et possèdent ainsi des besoins énergétiques plus spécifiques et moins importants que les CSE humaines à l'état de pluripotence amorcé. Toutefois, ces différences entre iPSC et CSE semblent s'expliquer en partie par le faible nombre de lignées étudiées et par le manque de standardisation des techniques de reprogrammation des cellules somatiques entre les laboratoires.

D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence d'autres différences entre les iPSC et les CSE, en particulier au niveau de l'analyse de leur génome (différences de charges mutationnelles, polymorphisme du nombre de copies de gènes) et de leur potentiel immunogénique⁵⁶.

La reprogrammation est un processus clonal, donc toute variation pré-existante dans la population de départ est amplifiée et peut plus facilement être détectée lors de l'analyse des clones. Des analyses génétiques complémentaires ont en effet montré que la plupart des différences identifiées dans les iPSC existaient déjà dans les cellules somatiques de départ.

Des études ont démontré que les tératomes formés à partir d'iPSC murines induisent une réponse immunitaire (infiltrat de lymphocytes T et rejet immunitaire) plus forte chez les souris hôtes que ceux formés à partir de CSE murines⁵⁹. Pour être utilisées en thérapie cellulaire, les iPSC doivent être différenciées, ce qui augmente leur potentiel immunogénique. Ainsi, l'immunogénicité des iPSC doit être évaluée avant toute utilisation en clinique de cellules autologues chez les patients.

Bien que certaines questions persistent, la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC constitue un système alternatif pertinent pour étudier la contribution de divers signaux et facteurs sur le maintien des états de pluripotence décrits ci-dessus ainsi qu'un outil révolutionnaire prometteur pour la médecine régénérative et la modélisation de pathologies en compléments des modèles animaux de pathologies humaines (Figure 13)⁵⁶.

(vi) Comparaison des états de pluripotence des CSE murines et humaines

Les cellules souches embryonnaires humaines (CSE humaines) sont des cellules pluripotentes issues de blastocystes humains⁶⁰. Tout comme les CSE murines, les CSE humaines ont un potentiel d'autorenouvellement illimité et sont capables de se différencier *in vitro* pour former les trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme. Toutefois, leur potentiel développemental *in vivo* est plus restreint. Les CSE humaines sont dans l'état de pluripotence dit amorcé ou « primed », proche du stade de l'épiblaste post-implantatoire murins des EpiSC (Figure 13)^{61,62}. Par analogie aux EpiSC murines, les CSE humaines sont incapables de former des embryons chimériques fonctionnels par micro-injection au sein de blastocystes murins mais sont capables de former des tératomes *in vivo*.

Il a été suggéré que les CSE humaines dérivent plus rapidement que les CSE murines en culture et atteignent directement le stade de pluripotence amorcée. De nombreuses équipes cherchent à comprendre comment capturer l'état de pluripotence naïf chez l'homme et le primate et quelles sont les barrières ou restrictions à la stabilisation de cet état développemental. L'isolement de CSE murines pourrait être facilité chez les rongeurs au cours du développement embryonnaire en raison d'une organisation particulière du zygote (ré-organisation des cellules de l'épiblaste en épithélium en forme de coupe entouré d'hypoblaste). Ce processus nécessite l'activation de l'apoptose au sein de l'épiblaste créant ainsi une fenêtre de temps propice à la stabilisation de l'état de pluripotence naïf chez les rongeurs^{47,63}. D'autre part, il existe chez les rongeurs un stade de blocage du développement au cours duquel leur implantation utérine de l'embryon est inhibée temporairement, c'est le stade de diapause. Ce processus a lieu physiologiquement chez les femelles allaitantes et peut être induit expérimentalement en réalisant une ovariectomie (suppression de la stimulation estrogéniques)^{6,64}. Le maintien des cellules embryonnaires isolées à ce stade est hautement dépendant du LIF ce qui suggère une proximité phénotypique avec les CSE cultivées dans un état de pluripotence naïf. Le stade de diapause n'existe pas chez les humains. Cette différence entre les rongeurs et les hommes pourrait s'expliquer par des régulations moléculaires sous-jacentes différentes qui déstabiliseraient les CSE humaines à l'état de pluripotence naïf et compliqueraient leur isolement *in vitro*^{6,64}.

Au delà de leur isolement, les CSE humaines diffèrent des CSE murines à différents niveaux : morphologie, clonogénicité, potentiel de différenciation cellulaire, conditions de culture et voies de signalisation requises pour leur maintenance, métabolisme cellulaire et profils d'expression génétique et épigénétique. Du point de vue morphologique, les colonies de CSE humaines sont étendues et poussent en monocouches alors que les CSE murines forment de petites colonies compactes en forme de coupes. Le cycle cellulaire des CSE humaines est plus long que celui des CSE murines mais possèdent les mêmes caractéristiques (courte phase G1)^{45,65}. Enfin, leur métabolisme énergétique est différent : les cellules souches embryonnaires humaines utilisent principalement la

voie de la glycolyse anaérobie alors que les CSE à l'état de pluripotence naïf utilisent indifféremment la phosphorylation oxydative (respiration mitochondriale) et la glycolyse^{66,67}.

Les voies de signalisation et facteurs de croissance indispensables au maintien des CSE humaines ont été identifiés principalement à partir d'études comparatives entre les EpiSC et les CSE murines. L'activation des voies de signalisation MEK/ERK par le FGF (bFGF ou FGF2) et TGF- β /ACTIVIN/NODAL est indispensable au maintien en culture des CSE humaines et des EpiSC murines^{62,67-70} (Figure 14). De façon intéressante, il est possible de reprogrammer les CSE humaines dans leur état de pluripotence naïf en présence du milieu LIF/2i ou d'une association de cinq inhibiteurs pharmacologiques associés au LIF et à l'Activin A (5i/L/A)⁷¹.

Le réseau des facteurs de transcription de la pluripotence est également différent dans les CSE humaines. Les facteurs de transcription OCT4 et SOX2 sont communément exprimés dans les CSE humaines et murines. Toutefois, les facteurs de transcription comme KLF2 KLF4, TCFP2L1, ESRRB, TBX3 sont globalement sous-exprimés dans les CSE humaines (Figure 14, Tableau 1)¹¹. La surexpression de ces derniers dans les iPSC humaines permet une transition vers un état de pluripotence naïf proche de celui des CSE murines⁷².

d. Méthodes d'évaluation de l'identité phénotypique des cellules souches pluripotentes

La pluripotence se définit comme la capacité d'une cellule à contribuer à l'embryogenèse et à former des lignées germinales et somatiques fonctionnelles. Dans le cas des CSE et des iPSC, leur état de pluripotence est estimé fonctionnellement par leur capacité à réintégrer l'embryogenèse et à contribuer au développement normal d'un embryon. Ces cellules souches sont donc équivalentes aux cellules de l'embryon précoce, bien que cet état développemental soit capturé et maintenu artificiellement en culture cellulaire *in vitro*^{73,74}. Différentes approches expérimentales d'évaluation des capacités de pluripotence et de clonogénicité des cellules souches isolées à partir de l'embryon ou des iPSC ont été développées *in vivo* et *in vitro*. Ces approches sont complémentaires. Leurs avantages et inconvénients seront abordés ci-dessous.

(i) Évaluation de la clonogénicité *in vitro* : test de formation de colonies

L'évaluation de la clonogénicité des CSE ou capacité à s'auto-renouveler de façon clonale peut-être réalisée grâce à différents tests fonctionnels *in vitro* complémentaires des stratégies expérimentales *in vivo* décrites plus loin dans la partie (ii).

Le test de formation de colonies permet de mettre en évidence la capacité des CSE à proliférer en conservant leur état développemental. Les CSE sontensemencées à faible densité (environ 50 cellules par cm²) et prolifèrent en culture entre 5 à 10 jours. Les colonies ainsi formées sont toutes clonales. Elles sont ensuite analysées grâce notamment au suivi de l'activité enzymatique de

marqueurs de la clonogénicité ou à la quantification des signaux de gènes rapporteurs de la pluripotence.

Pour évaluer rigoureusement la clonogénicité et le maintien de leur potentiel de différenciation des colonies formées, ces dernières doivent être isolées et leur potentiel de différenciation doit être confirmés par l'analyse de marqueurs des 3 feuillets embryonnaires ou par la réalisation de tests de différenciation *in vitro*.

- **Évaluation de l'activité de la phosphatase alcaline**

L'utilisation de marqueurs métaboliques comme l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline permet le suivi de la clonogénicité des colonies formées. La phosphatase alcaline est une enzyme fortement exprimée dans les CSE dont l'activité corrèle linéairement avec la clonogénicité des CSE. La quantification relative des colonies indifférenciées, mixtes ou différenciées formées permet d'évaluer la clonogénicité des CSE dans un environnement donné ou suite à des manipulations génétiques^{11,75}.

- **Rapporteurs fluorescents de l'activité des facteurs de transcription de la pluripotence**

La clonogénicité et le phénotype indifférencié des colonies formées peuvent également être évalués en mesurant l'activité d'un transgène rapporteur de la pluripotence.

Certaines lignées de CSE exprimant des protéines fluorescentes sous le contrôle de promoteurs de facteurs de transcription clés de l'état de pluripotence naïf (*Oct4*, *Sox2* etc.) ont été développées au sein de différentes équipes^{51,76}. Ces lignées de CSE sont largement utilisées et permettent le suivi quantitatif de la clonogénicité et de la différenciation des CSE ainsi que le suivi de l'efficacité de reprogrammation des cellules somatiques. La quantification peut être réalisée par microscopie quantitative (High Screen Content ou HCS) ou par cytométrie en flux^{16,40,57}.

(ii) Évaluation de la pluripotence *in vivo*

Les capacités des CSE se différencier pour former les différents feuillets embryonnaires (pluripotence amorcée et naïve) et/ou à contribuer à la formation d'un individu viable et fertile (pluripotence naïve) sont évaluées par différents tests fonctionnels plus ou moins stringents.

- **Test de formation de tératome**

La pluripotence des CSE peut être évaluée par la réalisation d'un test de formation de tératome. Un tératome est une tumeur non maligne formée de cellules désorganisées qui s'organisent de façon aléatoire en structures présentant des cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires. Dans le test de formation de tératome, la pluripotence des cellules souches est évaluée, par ré-implantation d'un nombre défini de CSE, par injections sous-cutanées ou intra-musculaires principalement, dans des souris immunodéprimées (souris SCID). La prolifération des CSE sous l'influence du micro-environnement tissulaire (facteurs de croissance, cytokines, nutriments) aboutit à la formation d'un

tératome⁷⁷. Après un temps de 6 à 12 semaines ou lorsque la tumeur a atteint une taille critique, la souris est sacrifiée et le tératome est soumis à une analyse histopathologique, en immunohistochimie ou par étude du profil d'expression de gènes d'intérêt.

Ce test est moins stringent que les tests de complémentation tétraploïde ou de formation de chimères puisqu'il ne permet pas l'évaluation de la viabilité des individus formés et ne recrée pas pleinement le microenvironnement des cellules souches embryonnaires au cours du développement. Toutefois, complété d'analyses histologiques et immunohistochimiques évaluant la formation de structures tissulaires caractéristiques de la différenciation des trois feuilletts embryonnaires au sein de ces tumeurs, ce test de formation de tératome chez la souris immunodéficiente est un compromis acceptable pour affirmer la pluripotence (naïve ou amorcée) des CSE ou des iPSC humaines et murines.

- ***Test de formation de chimères***

La stratégie classique de formation de chimères consiste en la micro-injection de cellules souches dans un blastocyste hôte contenant sa propre masse cellulaire interne. Cette stratégie sert de référence à l'évaluation de la pluripotence de cellules souches.

Les cellules souches pluripotentes s'intègrent dans le blastocyste qui est ensuite implanté dans l'utérus d'une souris pseudo-gestante. Les souriceaux formés sont ainsi des chimères des cellules souches injectées et des cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste hôte (Figure 15, panel de droite). Les cellules sont dites pluripotentes si elles sont capables de contribuer avec les cellules de la masse cellulaire interne de l'hôte à la formation d'un individu entier viable et fertile. Le test de formation de chimères est donc un test fonctionnel très rigoureux de la pluripotence naïve des CSE.

Le critère de formation de chimères ne s'applique pas aux CSE humaines. Ces CSE sont en effet dans un état de pluripotence correspondant à celui de l'épiblaste tardif et possèdent un potentiel développemental plus restreint dit amorcé ou « primed ». Certains scientifiques refusent ainsi de qualifier les CSE humaines de pluripotentes⁷⁸.

- ***Test de complémentation tétraploïde***

La seconde méthode est dénommée stratégie de complémentation tétraploïde⁷⁸. Cette technique consiste en la création d'un embryon tétraploïde par électrofusion d'embryons au stade 2 cellules et fusion des blastomères. Cette tétraploïdie permet exclusivement le développement des tissus ou annexes extra-embryonnaires. Le développement des tissus intra-embryonnaires est compromis. Les cellules souches étudiées sont alors micro-injectées dans cet embryon tétraploïde. Celui-ci est ensuite réimplanté dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante. Les embryons forment des animaux viables exclusivement dérivés des cellules souches micro-injectées. Le placenta et les annexes sont eux entièrement dérivés des embryons hôtes tétraploïdes (Figure 15, panel de gauche)⁷⁸. Seules les cellules souches embryonnaires à l'état de pluripotence naïf (épiblaste précoce) sont capables de

donner naissance à des individus viables et fertiles témoignant de la formation de lignées somatiques et germinales fonctionnelles. Ce test démontre sans ambiguïté leur complète pluripotence.

Toutefois, les EpiSC, dérivées d'épiblastes tardifs, proches mais pas identiques aux CSE humaines sont incapables de compléter un embryon tétraploïde. Les EpiSC ou CSE humaines sont dans un état de pluripotence dit « primed » et ont déjà perdu une partie de leur potentiel développemental initial. Enfin, il a été démontré que les iPSC sont capables de former des embryons viables lors d'essais de complémentation tétraploïde. Toutefois les rendements sont faibles et très variables entre les études⁷⁸.

Le test de complémentation tétraploïde permet donc de démontrer sans ambiguïté la pluripotence naïve des CSE et avec un rendement faible, la pluripotence des iPSC.

Toutefois, l'état de pluripotence amorcée des CSE humaines et des EpiSC ne leur permet pas de compléter un embryon tétraploïde. La pluripotence amorcée est donc exclusivement évaluée par le test de formation de tératome.

e. La différenciation : se différencier ou ne pas se différencier ?

(i) Le contrôle de l'entrée en différenciation

Les signaux régulant le maintien des différents états de pluripotence sont aujourd'hui largement décrits. La culture des CSE murines en milieu LIF/2i permet en effet le maintien d'un état de pluripotence naïf homogène et robuste⁴⁷. Toutefois, les différents mécanismes à l'origine de l'entrée en différenciation et les programmes géniques et moléculaires initiant la transition vers la sortie de l'état de pluripotence naïf restent à élucider.

In vivo, cette transition a lieu en moins de 24h au stade péri-implantatoire de l'embryon. Le caractère déterministe ou stochastique de cette transition est débattu.

Au sein de l'embryon murin au stade péri-implantatoire, l'état de pluripotence naïf disparaît en moins de 24h. La rapidité et l'efficacité de cette transition suggèrent l'activation d'un programme moléculaire précis et supportent une vision déterministique de cette transition.

La vision stochastique du processus de différenciation des cellules souches embryonnaires est appuyée par l'hétérogénéité et le caractère dynamique de l'expression des facteurs de transcription clés de la pluripotence comme Oct4 et Nanog et des marqueurs spécifiques de l'engagement vers trois feuilletts embryonnaires au sein des CSE murines cultivées en milieu LIF/sérum⁷⁹⁻⁸¹. Cet équilibre dynamique au sein des CSE murines a permis l'émergence de la notion de métastabilité de la pluripotence. Cette propriété conférerait aux CSE une plasticité leur permettant de s'adapter et de répondre de façon binaire aux différents signaux extracellulaires soit en maintenant leur pluripotence soit en s'engageant vers la différenciation.

Toutefois, la culture des CSE murines en condition LIF/2i a démontré l'existence d'un état de pluripotence dans lequel l'expression des marqueurs de pluripotence est stable et celle des marqueurs de différenciation bien plus limitée et difficilement détectable. La mosaïcité des CSE cultivées en LIF/sérum seraient donc vraisemblablement liée à la variabilité de leur environnement (composition du sérum) et non à leur identité propre^{11,82}. Cultivées en milieu LIF/2i puis LIF seul, les CSE s'engagent de façon continue vers un feuillet embryonnaire. La phase initiale est réversible jusqu'à ce que les facteurs de l'état naïf soient entièrement disparus. Les cellules entrent ensuite dans un état de transition dans lequel les facteurs de transcription Oct4 et Sox2 sont toujours exprimés. Les autres facteurs de transcription de la pluripotence naïve ne sont plus exprimés et les facteurs de transcription de la différenciation ne le sont pas encore. Les cellules dans cet état de transition sont alors capables d'entrer et de se spécialiser vers un feuillet embryonnaire en réponse à des signaux extracellulaires (FGF, Nodal, Wnt), on parle de pluripotence engagée/amorcée ou « primed ». Les cellules dans l'état de pluripotence amorcé quittent ensuite l'état de pluripotence pour former les progéniteurs des différentes lignées embryonnaires (Figure 11-12).

(ii) Les différents modèles de différenciation

En l'absence des facteurs spécifiques permettant le maintien de l'état souche, les CSE se différencient pour former des cellules qui récapitulent les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme)^{83,84}. Cette différenciation peut être dirigée de manière à former des populations de cellules issues de feuillets embryonnaires particuliers. Trois approches principales sont utilisées pour différencier les CSE *in vitro* (Figure 16) :

- ***la formation de corps embryonnaires***

Dans cette méthode, les cellules souches embryonnaires sont placées dans un milieu de culture favorisant leur différenciation et forment des structures tridimensionnelles ou colonies dénommées corps embryonnaires qui récapitulent les étapes précoces du processus de différenciation *in vitro* et expriment des marqueurs de trois feuillets embryonnaires⁸⁵. Différentes conditions de culture permettent d'orienter la différenciation des CSE vers un feuillet embryonnaire et un type cellulaire. De même, différents protocoles ont été développés pour permettre aux CSE de former des agrégats et des structures tridimensionnelles. Le protocole le plus fréquent est celui de formation des corps embryoides au sein de gouttes suspendues ou « hanging drop method ». La gravité permet au CSE de s'assembler en agrégats récapitulant les structures embryonnaires primitives^{86,87}.

- **la co-culture sur cellules stromales**

Les CSE sont cultivées directement sur des cellules stromales et la différenciation se fait par l'établissement de contacts intercellulaires⁸⁸. Les cellules le plus fréquemment utilisées sont les cellules OP9 (ATCC® CRL-2749™). Ces cellules sont caractérisées par leur déficience en facteur M-CSF. Ce facteur inhibe la différenciation des CSE.

- **La culture sur des protéines de la matrice extracellulaire**

Dans cette méthode, les CSE sont cultivées en monocouche sur des protéines de matrice extracellulaire (boîtes de culture recouvertes de collagène de type IV) en présence de milieu de différenciation^{83,89,90}. Les interactions bidimensionnelles des CSE avec les protéines de la matrice extracellulaire et la présence de milieu approprié suffisent à récapituler les étapes précoces de la différenciation des CSE.

Ces trois approches *in vitro* permettent de récapituler efficacement les étapes précoces de la différenciation des CSE *in vivo* et leur différenciation en cellules des trois feuillets embryonnaires.

Ces approches présentent chacune des avantages et des inconvénients. La structure tridimensionnelle des corps embryonnaires récapitule les interactions cellulaires et permet d'activer des programmes développementaux particuliers. En revanche, la complexité et l'hétérogénéité de cette structure peuvent complexifier l'analyse et l'étude de la contribution de voies de signalisation ou de gènes spécifiques au processus de différenciation des CSE.

De même, la co-culture sur cellules stromales permet de bénéficier des facteurs de croissance sécrétés par ces dernières, mais peut biaiser la différenciation et l'orienter en faveur d'un sous-type cellulaire particulier. Une autre difficulté de ce modèle est d'isoler les CSE des cellules stromales pour les analyses ultérieures.

Enfin, la culture en monocouche sur protéines de la matrice extracellulaire présente l'inconvénient de ne pas pleinement récapituler pleinement le microenvironnement des CSE *in vivo* mais l'avantage d'être pratique et la structure bidimensionnelle facilite le suivi et l'analyse des marqueurs de différenciation.

De nombreux protocoles ont été optimisés pour orienter de façon plus homogène la différenciation des CSE vers un type cellulaire désiré en utilisant des cocktails de facteurs de croissance, cytokines et inhibiteurs spécifiques^{90,91}. Cependant, bien que ces protocoles permettent d'enrichir une population ciblée *in vitro*, les cellules générées ne récapitulent pas pleinement le phénotype et les fonctions des populations cellulaires présentes *in vivo*⁵⁰.

C'est pourquoi, de nombreuses équipes cherchent à développer des modèles de différenciation en culture cellulaire tridimensionnelle récapitulant mieux l'architecture et la complexité de l'environnement *in vivo*⁹²⁻⁹⁴. Ces structures sont appelées organoïdes et seront décrites ci-dessous

dans la partie intitulée «2.4 Les cellules souches pluripotentes, un modèle d'étude prometteur en médecine».

2.3 Régulation de l'expression génique dans les cellules souches embryonnaires

La compréhension des mécanismes de régulation de l'expression génique contrôlant le devenir des cellules souches est indispensable à la fois pour la compréhension des mécanismes fondamentaux du développement mais également pour la mise en place de nouvelles applications médicales telles que la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC. Les contextes médicaux comme la médecine régénérative, la cancérologie, les maladies génétiques rares ou les pathologies neurodégénératives bénéficient ainsi directement des progrès réalisés dans la compréhension de la biologie des cellules pluripotentes.

Les différents niveaux de régulation de l'expression génique dans les CSE seront décrits ci-dessous.

a. Contrôle épigénétique de l'homéostasie des CSE murines

Indépendamment du stade du développement embryonnaire dont elles sont issues, les CSE *in vitro* convergent vers un profil épigénétique et transcriptionnel similaire à celui des cellules de l'épiblaste (blastocyste aux jours 3,5 et 4,5)⁹⁵⁻⁹⁷. Les CSE possèdent ainsi une structure de la chromatine ouverte/décondensée et des modifications épigénétiques spécifiques : acétylations/méthylations des histones et hypométhylation de l'ADN catalysées par des « histone acetyltransferases » HAT et « histone déméthylases » HDM^{98,99}. Cet état permissif de la chromatine contribue au maintien de leur pluripotence par deux mécanismes principaux (Figure 17).

D'une part, l'accessibilité de la chromatine, maintenue par des facteurs spécifiques, permettrait aux CSE de conserver une activité transcriptionnelle importante et une flexibilité nécessaire à leur pluripotence. Cette activité transcriptionnelle serait restreinte au cours de la différenciation. Cet état actif de la chromatine est visualisé notamment par l'existence de larges régions d'hypométhylation de l'ADN et d'histones acétylés.

D'autre part, certains facteurs permettraient d'inhiber localement les promoteurs des gènes impliqués dans l'engagement vers la différenciation cellulaire via des modifications post-traductionnelles des histones induisant une répression de leur transcription. Ces régulations épigénétiques particulières permettraient aux CSE d'empêcher l'expression prématurée de ces gènes tout en étant capable au cours du développement embryonnaire de les dé-réprimer rapidement suite à l'activation des voies de signalisation de la différenciation^{50,99,100}. Ainsi, le complexe répresseur Polycomb PRC2, par exemple, régule ainsi la transcription de plus de 200 gènes impliqués

dans le développement embryonnaire et co-occupe de nombreux sites de liaison des facteurs de transcription OCT4, SOX2 et NANOG dans les CSE humaines. Les gènes cibles de PRC2 sont principalement activés au cours de la différenciation et doivent être réprimés pour maintenir la pluripotence des CSE¹⁰¹.

D'autre part, les histones des CSE possèdent des marquages épigénétiques bivalents capables à la fois de réprimer et d'activer la transcription au niveau des promoteurs de certains gènes cibles^{96,102,103}. La fonction de ces modifications bivalentes des histones reste débattue, mais elles sembleraient toutefois conférer aux CSE une grande flexibilité dans la régulation de l'expression génique.

Les mêmes profils et régulations épigénétiques sont observés au cours de la reprogrammation de cellules somatiques et également au cours de la tumorigenèse (reprogrammation oncogénique)^{95,100,104}. On parle ainsi de « barrière épigénétique » à surmonter pour permettre la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC^{103,104}.

La plasticité des modifications de la chromatine contribue donc activement au maintien de l'expression génique et de l'identité des CSE au cours du développement embryonnaire. Il existe toutefois des différences entre le profil épigénétique des CSE *in vitro* et celui de l'épiblaste au cours du développement embryonnaire. En effet, la pluripotence *in vivo* est un état transitoire alors que dans les CSE, cet état est capturé et stabilisé par des mécanismes moléculaires uniques et spécifiques. Ainsi, certains gènes indispensables dans les CSE ne le sont pas *in vivo* pour l'épiblaste¹⁰⁵. Le profil épigénétique des CSE diffère de l'épiblaste pré-implantatoire au niveau de marquages épigénétiques bivalents sur les promoteurs de certains gènes ainsi qu'au niveau des facteurs épigénétiques associés^{98,106}.

b. Contrôle transcriptionnel de l'homéostasie des CSE murines

L'identité des cellules souches embryonnaires est orchestrée par un ensemble de facteurs de transcription clés: le trio central est constitué de Oct4, Sox2 et Nanog⁷⁶. Ces facteurs de transcription ont des sites de liaison à l'ADN communs ou proches physiquement, suggérant l'existence de régulations croisées. Ces facteurs de transcription interviennent en effet dans des boucles de rétrocontrôle et régulent l'expression de nombreux gènes cibles communs.⁷⁶ Ces régulations croisées seront détaillées ci-dessous.

À l'état physiologique, Oct4, Nanog et Sox2 sont principalement exprimés dans l'embryon précoce et sont indispensables au maintien des programmes d'expression génique des CSE¹⁰⁷. La perte de fonction de l'un de ces trois facteurs conduit à un défaut de formation de la masse cellulaire interne¹⁰⁸. D'autre part, l'expression de ces facteurs de transcription dans une fenêtre bien

spécifique est indispensable au maintien de la pluripotence des CSE. En effet, la sur-expression (environ deux fois) ou la diminution d'environ 50% de ces derniers sont suffisantes pour provoquer l'entrée en différenciation des CSE murines¹⁰⁹.

Plus récemment, des études ont permis d'identifier des facteurs de transcription additionnels élargissant ainsi le réseau transcriptionnel de régulation de la pluripotence¹¹⁰. Le rôle des trois facteurs de transcription clés dans le maintien des CSE seront détaillés dans un premier temps puis celui des facteurs plus récemment identifiés.

(i) Réseaux des facteurs de transcription clés de la pluripotence

(a) Le facteur de transcription Oct3/4 ou Oct4/Pou5f1

Le facteur de transcription Oct4 codé par le gène *Pou5f1* a été le premier facteur de transcription identifié comme régulateur de la pluripotence au début des années 1990¹¹¹.

Oct4 est exprimé *in vivo* dans l'oocyte et l'embryon précoce. Son expression à l'âge adulte est limitée aux cellules germinales. La délétion de Oct4 *in vivo* conduit à la différenciation des cellules de la masse cellulaire interne et *in vitro* à la perte de la clonogénicité et de la pluripotence des cellules souches embryonnaires murines¹⁰⁹.

Oct4 interagit avec différents partenaires (facteurs de transcription, co-activateurs ou répresseurs épigénétiques) et cibles pour assurer sa fonction du maintien de la pluripotence (Figure 18)¹¹². En fonction de ses partenaires d'interaction, Oct4 active ou réprime ces gènes cibles. Associé à Sox2, Nanog et Sall4, Oct4 a majoritairement un effet stimulateur sur l'expression de ses gènes cibles. À l'inverse, lorsqu'il est associé à des répresseurs comme NuRD ou PRC1, Oct4 a préférentiellement une activité de répresseur transcriptionnel, en particulier pour des gènes développementaux.

Par ces effets variés, Oct4 contribue donc au maintien de la clonogénicité et de la pluripotence des CSE murines. Au sein de l'embryon murin, Oct4 semble contribuer à l'engagement dans la différenciation en feuillets embryonnaires car son expression persiste dans l'épiblaste post-implantatoire¹¹³.

(b) Le facteur de transcription Sox2

Le facteur de transcription Sox2 pour SRY-box est également essentiel pour la clonogénicité des CSE. L'inactivation de Sox2 conduit à la différenciation en trophoblaste alors que sa surexpression induit la différenciation vers les différents feuillets embryonnaires.

Sox2 interagit avec Oct4 sous la forme d'un hétérodimère et active la transcription de ses gènes cibles dont *Nanog* et *Fgf4* (Figure 19)^{110,114,115}. Le complexe Oct4/Sox2 exercent un rétro-contrôle positif sur l'expression de Oct4^{11,115,116}.

L'expression de Sox2 est toutefois moins restreinte que celle de Oct4 à la fois au cours du développement et au stade adulte (épiblaste pré et post-implantatoire, trophoctoderme, tissus épithéliaux et endodermiques, cellules souches neurales)¹¹.

(c) Le facteur de transcription Nanog

Nanog est un facteur de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN appelé homéodomaine capable de lier les séquences homéotiques et d'activer la transcription de gènes développementaux. *In vivo*, l'expression de celui-ci est spécifique à l'état de pluripotence naïf. Contrairement à Oct4 et Sox2, la surexpression ectopique de Nanog dans les CSE en absence de LIF suffit au maintien de leur clonogénicité¹¹⁷. En effet, la perte de Nanog déstabilise les CSE *in vitro* et *in vivo* : les embryons dépourvus de *Nanog* sont incapables de former un épiblaste fonctionnel^{76,117,118}. Toutefois, d'autres études ont démontré que les CSE murines dépourvues de *Nanog* conservaient leur potentiel d'autorenouvellement et leur pluripotence (formation de chimères viables et fertiles)¹¹⁹. D'autre part, si le milieu de culture est optimal (2i+LIF), la délétion de Nanog *in vitro* n'impacte pas fonctionnellement les CSE. Nanog ne semble donc pas indispensable au maintien de l'état de pluripotence fondamentale dit « ground state » *in vitro*.

(d) Régulations croisées des facteurs de transcription de la pluripotence

Oct4, Sox2 et Nanog interagissent dans des régulations croisées et exerce un rétrocontrôle positif nécessaire au maintien de la pluripotence des CSE^{120,121}.

Oct4 et Sox2 agissent sous forme d'un hétérodimère et exercent un rétrocontrôle positif sur l'expression de Oct4^{11,115}. Nanog est actif sous forme dimérique. Ces facteurs de transcription sont liés à une séquence dite « enhancer », le plus souvent en amont du site d'initiation de la transcription du gène cible. Le contact entre les facteurs de transcription liés à la séquence « enhancer » et l'ARN polymérase II fait intervenir un co-activateur transcriptionnel, p300 (Figure 20). Le contrôle transcriptionnel de l'expression de Oct4, Sox2 et Nanog est indispensable au maintien des programmes d'expression génique spécifiques des CSE (Figure 21)¹⁰⁷. Récemment, des groupes de séquences « enhancers » appelés « super-enhancers » ont été identifiés comme co-occupés par Oct4, Sox2 et Nanog ainsi que par des facteurs de transcription des voies Wnt, BMP, et LIF dans les cellules souches embryonnaires murines. Ces séquences constitueraient une plateforme permettant l'intégration de signaux de nombreuses voies de signalisation au niveau des promoteurs de facteurs de transcription clés de la pluripotence. Les « super-enhancers » permettent ainsi aux CSE d'augmenter leur réactivité en adaptant leur transcriptome pour maintenir leur identité cellulaire¹²².

Des études ont identifié les gènes cibles de ces facteurs de transcription dans des CSE humaines et murines en combinant des approches d'immunoprécipitation de la chromatine et des microarrays

(ChIP-chip) et du séquençage (ChIP-Seq). Il a ainsi été mis en évidence une superposition d'un nombre important de gènes cibles incluant Oct4, Sox2 et Nanog eux-même¹¹⁰. Plus récemment, des analyses de ChIP-Seq ont démontré que Oct4/Sox2 et Nanog co-occupaient principalement les régions activatrices de la transcription (« enhancer »). On parle d'« enhanceosome » spécifiques des CSE (Figure 20)^{19,123}.

Des facteurs de transcription additionnels ont plus récemment été impliqués dans le maintien de l'identité des CSE.

(ii) Facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence fondamentale des CSE murines

Parmi ces facteurs, on recense : Esrrb, Klf4, Klf2, Tbx3, Gbx2, Pim1, Tfcp2l1 et Sall4. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans le maintien de la pluripotence fondamentale des CSE murines spécifiques aux états naifs de l'épiblaste et contribuent aux transitions entre les différents états de pluripotence^{11,38,72,116}. L'expression de ces facteurs diminue lors de l'entrée en différenciation des CSE. Ainsi, Esrrb, Klf4, Klf2 et Tbx3 ont été impliqué dans le maintien de la clonogénicité des CSE par des expériences de sur-expression⁷⁴. Comme pour Nanog, la délétion de ces facteurs de transcription est globalement tolérée par les CSE murines¹¹⁰. Ces facteurs de transcription de l'état de pluripotence fondamentale sont également intégrés à un réseau transcriptionnel de rétrocontrôle avec Oct4/Sox2 et Nanog^{19,124}.

c. Contrôle post-transcriptionnel de l'homéostasie des CSE murines

Comme décrit ci-dessus, l'état de pluripotence des CSE est orchestré par des facteurs de transcription clés activés en réponse à l'intégration des signaux de différentes voies de signalisation et par le maintien d'un profil épigénétique spécifique.

Plus récemment, des études ont démontré l'importance des régulations post-transcriptionnelles de l'expression génique dans le maintien et le devenir des cellules pluripotentes et au cours de la différenciation des CSE¹²⁵.

En effet, les technologies récentes (séquençage à haut débit, identification et caractérisation systématique des interactions protéines-ARN, i.e. CLIP-seq) ont permis d'identifier différents mécanismes post-transcriptionnels capables de réguler les programmes géniques assurant le maintien et la transition des CSE vers la différenciation¹²⁶⁻¹²⁸.

Ces régulations permettraient aux CSE d'ajuster finement et d'augmenter la diversité d'expression de certains transcrits. La régulation des transcrits impliqués dans le maintien des CSE intervient tout au long du cycle de vie des transcrits et est orchestrée par différents facteurs dont des protéines de liaison aux ARN (ou RBP pour « RNA-binding protein ») recensées dans le tableau 2¹²⁹. Les

mécanismes post-transcriptionnels régulés comprennent la maturation des ARNm par épissage alternatif, le contrôle de l'export des ARNm, le contrôle de leur stabilité par polyadénylation alternative et par le mécanisme de dégradation de l'ARNm non-sens ou NMD et également la régulation de la traduction de certains ARNm par des protéines de liaison aux ARN multifonctionnelles dont notamment certains facteurs associés et/ou de biogenèse des ribosomes (Figure 22, Tableau 2). La seconde partie de ma thèse décrira en détail le rôle des facteurs de biogenèse des ribosomes identifiés dans les CSE murines.

d. Contrôle traductionnel de la pluripotence des cellules souches embryonnaires

La régulation de la synthèse protéique ou traduction a longtemps été mise de côté par les études de biologie moléculaire. Le flux d'information génétique au sein de la cellule a longtemps été considéré comme unidimensionnel et exclusivement régulé au niveau de l'ADN génomique nucléaire¹³⁰. Toutefois, de nombreuses régulations post-transcriptionnelles ont été mises en évidence. En augmentant la diversité des transcrits générés à partir d'un même gène, ces mécanismes permettent une intégration rapide des différents signaux extra- et intra-cellulaires et contribuent à la plasticité et l'adaptabilité cellulaires au cours du développement embryonnaire.

Plus récemment, des régulations de la traduction ont émergé comme impliquées dans le contrôle du devenir cellulaire et notamment dans celui des cellules pluripotentes¹³¹. Ces régulations semblent constituer un point de convergence des différents niveaux de régulation de l'expression génique plutôt qu'un niveau de régulation additionnel^{1,132-137}.

Ainsi, la synthèse protéique est régulée à différentes étapes du processus de traduction. La plupart des régulations impliquées dans l'homéostasie de CSE ont lieu lors de l'initiation de la traduction par différents mécanismes impliquant des modes d'initiation de la traduction différents (5'CAP, IRES, uORF), des régions cis-régulatrices non traduites ou « UTR » au extrémités des ARNm, des facteurs associés régulant l'initiation de la traduction (eIF, 4EBP).

D'autres mécanismes comme la régulation des voies de signalisation comme la voie mTOR^{131,135,136,138-142} et les régulations de la composition des ribosomes et de leur biogenèse semblent également impliqués dans le contrôle traductionnel et dans le devenir des CSE^{1-3,134,137,143,144}. Ces différents modes de régulation seront décrits en détail dans la partie 3 notamment le rôle de l'hétérogénéité des ribosomes et de leur biogenèse dans le maintien des CSE et au cours du développement embryonnaire.

2.4 Les cellules souches pluripotentes, un modèle d'étude prometteur en médecine

Les cellules souches pluripotentes, de par leur propriété d'autorenouvellement illimité et leur capacité à former les différents tissus adultes possèdent un potentiel thérapeutique très important, que ce soit par utilisation directe *in vivo* dans la mise en place de thérapie cellulaire en médecine régénérative (remplacement de tissus, parties d'organes, maladie neuro-dégénérative, insuffisance cardiaque...), de thérapie génique ou *in vitro*, dans la modélisation de pathologie et les études de toxicologie^{91,93,145}.

a. Applications thérapeutiques

Les progrès dans la compréhension de la biologie des CSE et la génération d'iPSC ont permis l'émergence et le développement de stratégies innovantes dans différents domaines thérapeutiques, à la fois en vue d'applications *in vivo* que pour des modélisations *in vitro*.

(i) Applications *in vivo* : la thérapie cellulaire

La médecine régénérative consiste à implanter/greffer directement *in vivo* les cellules différenciées générées *in vitro*. Les cellules greffées sont obtenues, en fonction de la pathologie, par différenciation des cellules pluripotentes (CSE ou iPSC) en certains sous-types cellulaires. La différenciation est contrôlée par activation séquentielle d'un ensemble de voies de signalisation (facteurs de croissance, cytokines) permettant l'induction et la formation du type cellulaire désiré (Figure 23).

La mise au point du milieu de culture permettant d'orienter préférentiellement la différenciation vers le type cellulaire désiré est complexe. D'autre part, la première difficulté de cette thérapie est d'assurer l'innocuité et la stabilité (génomique et phénotypique) des cellules greffées. Une cellule injectée capable de se dédifférencier pourrait en effet régénérer une tumeur dans l'organisme du patient suite à l'implantation. D'autre part, la mise en place de la thérapie cellulaire fait face à différentes problématiques notamment celle de la survie des cellules injectées, leur fonctionnalité i.e leur intégration au sein des tissus hôtes et l'évaluation de leur immunogénicité.

(a) Essais cliniques en cours

De nombreux essais cliniques utilisant des cellules pluripotentes induites sont actuellement recensés dans différentes pathologies : maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer), des lésions de la moëlle épinière, insuffisance cardiaque, drépanocytose, arythmies, hypertension, déficiences plaquettaires, dégénération maculaire liée à l'âge¹⁴⁶.

Les cellules souches embryonnaires sont également au cœur de nombreux essais cliniques (quarante-sept sont recensés¹⁴⁷) dans différentes indications dont la plupart sont communes aux

iPSC : ischémie myocardique, infertilité, dystrophie maculaire liée à l'âge, maladie de Parkinson, diabètes de type 2. L'ensemble de ces essais cliniques est disponible sur les liens suivants :

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=induced+pluripotent+stem+cells#tableTop>
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=embryonic+stem+cells+&cntry1=&state1=&Search=Search>

À l'heure actuelle, le traitement en thérapie cellulaire est envisagé comme une greffe unique ou « one-shot »¹⁴⁵. Le coût des thérapies cellulaires est pour l'instant élevé, entre 10 000 euros et 20 000 euros. Toutefois, ce coût est amené à diminuer avec l'automatisation et l'amélioration des processus de production.

- **Description d'essais cliniques en cours à partir de cellules souches embryonnaires**

DMLA atrophique & Dystrophie maculaire de Stargardt

Des cellules souches embryonnaires humaines différenciées en cellules de la rétine sont injectées à des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). De même des CSE différenciées en cellules épithéliales pigmentaires de la rétine sont utilisées pour traiter les patients atteints de dystrophie maculaire de Stargardt (Ocata Therapeutics). Des essais de phase I et II sont en cours pour évaluer l'innocuité et l'efficacité de ces stratégies thérapeutiques. Les premiers résultats sont modestes mais encourageants.

D'autre part, des chercheurs du laboratoire IStem associés aux chercheurs de l'Institut de la vision et à l'AFM Téléthon travaillent sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dans le développement de thérapie cellulaire dans d'autres pathologies dégénératives de la rétine.

Cardiologie

La sécurité d'utilisation des cellules souches soit validée dans différentes pathologies cardiaques, toutefois, l'efficacité de cette thérapie est débattue et les conclusions diffèrent en fonction des essais cliniques, notamment en raison d'un manque de standardisation des protocoles et des critères d'évaluation cliniques¹⁴⁸.

Des greffes de cellules cardiaques dérivées de cellules souches embryonnaires humaines ont été réalisées par une équipe de l'hôpital européen Georges Pompidou en 2014. L'insuffisance cardiaque de la patiente s'est améliorée sans complication apparente.

Diabète de type 1

Un essai clinique basé sur l'utilisation de cellules de pancréas productrices d'insuline obtenues à partir de cellules souches embryonnaires est en cours de développement (Société ViaCyte). Les cellules greffées sont encapsulées dans un dispositif médical permettant la diffusion de l'insuline et du glucose tout en empêchant la réaction immunitaire de l'hôte contre le greffon. Cette stratégie vise à rétablir une production d'insuline à long terme chez les patients.

- **Description d'essais cliniques en cours à partir de cellules souches pluripotentes induites**

Les cellules iPSC, en raison de l'étape de reprogrammation soulèvent de nombreuses questions dans le développement clinique de thérapies cellulaires. Toutefois, les iPSC autologues dérivées de patients présentent l'avantage d'une tolérance immunitaire complète comparées aux cellules souches embryonnaires.

DMLA humide

Un essai clinique utilisant des cellules iPSC est en cours dans le traitement de la DMLA humide. Les cellules thérapeutiques sont prélevées chez les patients (cellules autologues), reprogrammées puis différenciées en cellules de la rétine, et finalement réinjectées aux patients. Cet essai est réalisé sur 10 patients et vise à évaluer dans un premier temps la sécurité de cette approche puis sa faisabilité.

Autres exemples

Les promesses et les indications futures de la thérapie cellulaire à partir de cellules souches pluripotentes sont vastes, notamment dans les domaines des maladies neurodégénératives et des myopathies. D'autre part, la production de sang *ex vivo*, permettrait également de couvrir les besoins des hôpitaux en s'affranchissant des risques infectieux inhérents aux méthodes actuelles. Toutefois, le développement de ces thérapies innovantes doit être encadré par une législation rigoureuse et éthique (Agence de biomédecine).

Le potentiel des cellules souches pluripotentes comme outil *in vitro* pour modéliser les pathologies et décrypter leur physiopathologie et pour optimiser le ratio efficacité/toxicité des médicaments sera détaillé ci-dessous.

(b) Traitements par thérapie cellulaire autorisés par les autorités de santé

La reconstitution d'épiderme *ex vivo* grâce aux cellules souches cutanées, et la greffe chez les grands brûlés est réalisée depuis les années 70.

Les cellules souches hématopoïétiques sont administrées lors de greffe de moelle osseuse dans le traitement d'hémopathies malignes depuis les années 80. D'autre part, pour pallier à la réaction du greffon contre l'hôte ou « GvHD », liée à la greffe de tissus allogéniques (greffe de moelle osseuse, transfusion sanguine), la perfusion de cellules souches mésenchymateuses allogéniques est autorisée au Canada.

En Corée, l'injection de cellules souches mésenchymateuses allogéniques est autorisée dans le traitement de l'arthrose depuis 2013.

En Europe, Holoclar est le premier médicament de thérapie cellulaire à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché en février 2015. Holoclar est indiqué en cas de brûlure ou de lésion de la cornée. Il repose sur le prélèvement de cellules souches limbiques (en périphérie de la cornée) chez

le patient et leur différenciation et amplification *ex vivo* en cellules épithéliales cornéennes puis leur réimplantation¹⁴⁹.

(ii) Applications *in vivo* : la thérapie génique

Les cellules souches produites pour la thérapie cellulaire peuvent être modifiées génétiquement dans certaines indications (maladies monogénique ou polygénique). On parle alors de thérapie génique. Le but est d'insérer un gène fonctionnel dit gène-médicament, en complément ou en remplacement, d'un gène muté dans les cellules de patients au moyen de différents vecteurs, le plus souvent des vecteurs viraux inactivés. De nombreuses thérapies génétiques sont actuellement en phase I/II de développement clinique (Tableau 3) dans des indications comme la cancérologie, les pathologies cardiovasculaires, les pathologies neurodégénératives et ophtalmologiques et les maladies monogéniques et dans les maladies inflammatoires et infectieuses.

Historiquement, les premières administrations de cellules transgéniques ont été réalisées au début à la fin des années 1990 et au des années 2000. Des lymphocytes génétiquement modifiés ont été injectés chez des patients présentant des syndrômes de déficits immunitaires combinés sévères ou DICS.

En 2017, un jeune patient atteint d'épidermolyse bulleuse dystrophique a ainsi pu bénéficier d'une greffe autologue de peau transgénique sur une surface de 80% de son corps. Cette maladie héréditaire est provoquée par la mutation du gène *LAMB3* (pour Laminine beta 3) et est caractérisée par une fragilité cutanéomuqueuse et le développement d'ulcérations superficielles. L'épiderme a été généré *in vitro* à partir de cellules souches issues de l'épiderme du patient, modifiées génétiquement pour exprimer une version sauvage du gène muté¹⁵⁰.

(iii) Applications *in vitro* : Modélisation de pathologies & toxicologie

(a) Les iPSC dérivées de patients

Les premières modélisations de pathologies à partir d'iPSC de patients ont été réalisées par l'équipe de George Daley en 2008¹⁵¹. En effet, des iPSC issues de patients permettent de disposer de matériel cellulaire présentant les mêmes altérations génomiques et phénotypiques que le patient. Ces cellules constituent donc un excellent modèle pour étudier la physiopathologie des maladies et les mécanismes de résistance thérapeutiques¹⁵². De nombreuses études ont décrit l'utilisation d'iPSC pour recréer et modéliser les pathologies monogéniques mais également des pathologies polygéniques complexes à progression tardive et lente comme la maladie de Parkinson. On peut ainsi s'interroger sur la capacité de ces modèles cellulaires à récapituler *in vitro* des pathologies chroniques et à évolution lente¹⁴⁶.

D'autre part, les cellules somatiques issues d'iPSC de patients, notamment les cardiomyocytes et les hépatocytes peuvent être envisagés comme des outils alternatifs dans les études de toxicologie (toxicités cardiaques et hépatiques) et les criblages de « candidats médicaments »¹⁵³.

(b) Les organoïdes

Les organoïdes sont des structures tridimensionnelles générées à partir des propriétés des cellules souches pluripotentes à s'assembler entre elles sous forme de structures tridimensionnelles en présence de milieux particuliers (Figure 23)⁹³. Ces structures ont un potentiel thérapeutique très grand puisqu'elles permettent de modéliser de nombreuses pathologies comme par exemple des maladies développementales d'origines génétiques, des maladies neurodégénératives ou des cancers. Les anomalies génétiques peuvent être modélisées en utilisant directement des iPSC de patients ou en insérant les anomalies génétiques étudiées dans des CSE⁹³. Ces technologies permettent la formation d'organoïdes à partir d'iPSC de patients récapitulant l'histologie et l'architecture de nombreux organes comme notamment les intestins, les reins, le foie, le cœur et le cerveau.

D'autre part, ces organoïdes présentent un système très pertinent pour le criblage thérapeutique et les essais de toxicologie. Les organoïdes récapitulent en effet au plus près la physiologie de l'organe modélisé.

Enfin, la synthèse de tissus à partir de ces organoïdes pourrait présenter une alternative aux greffes d'organes. La formation de tissus autologues à partir organoïdes présente le grand avantage de diminuer le risque de réaction immunitaire contre le greffon^{93,94}.

b. Défis pour l'utilisation en clinique des cellules souches pluripotentes

(i) Sécurité et innocuité

Les cellules souches pluripotentes, CSE ou iPSC, présentent une capacité intrinsèque à former des tératomes après injection *in vivo*. Les tissus adultes ne sont en effet pas capables d'induire la différenciation des CSE transplantées car ils ne récapitulent pas les signaux du microenvironnement embryonnaire permettant l'entrée en différenciation (cytokines, facteurs de croissance)¹⁵⁴.

La stratégie utilisée aujourd'hui pour pallier à ce risque est de différencier les cellules pluripotentes et de les enrichir en types cellulaires désirés en vérifiant l'absence de cellules indifférenciées. Ces protocoles ont démontré leur efficacité dans la prévention de formation de tératomes. En revanche, des tumeurs plus différenciées peuvent se développer, probablement à partir de progéniteurs engagés¹⁵⁵.

Enfin, des risques en lien avec l'activité de certains types cellulaires spécifiques ont été décrits. Ainsi, après transplantation de cardiomyocytes obtenus à partir de cellules souches embryonnaires, certains peuvent avoir une activité aberrante et provoquer des arythmies.

(ii) Tolérance immunitaire

Lorsque des cellules thérapeutiques autologues sont greffées, la tolérance immunitaire de la greffe est complète. Les greffes autologues sont possibles à partir d'iPSC ou de cellules souches multipotentes.

Lorsque les cellules thérapeutiques sont issues d'un donneur, on parle de greffe allogénique. Les cellules du donneur peuvent être reconnues comme étrangères par le système immunitaire du patient et rejetées. Les patients receveurs doivent alors suivre un traitement immunosuppresseur à vie pour éviter ces rejets¹⁴⁵. À l'inverse, les cellules souches saines du donneur (greffon) peuvent considérer les cellules du patient (hôte) comme étrangères et les détruire. On parle alors de réactions du greffon contre l'hôte (ou GVH pour « Graft versus Host »).

Les iPSC allogènes sont actuellement classées au sein de banques et identifiées par leur profil antigénique immunitaire (système HLA) pour limiter ces réactions indésirables graves mettant en jeu le pronostic vital du patient, et augmenter la compatibilité des cellules greffées au patient receveur. Cet effort est coordonné à l'échelle internationale par l'Alliance GAIT (Global Alliance for iPSC Therapy) (<http://www.ingestem.fr/fr/banques-de-lignees/>).

À l'état pluripotent, les cellules souches embryonnaires présentent une immunogénicité faible (faible expression des antigènes HLA I et II)¹⁵⁴. Toutefois, après transplantation, les cellules différenciées dérivées des CSE présentent une expression accrue des antigènes HLA. Pour augmenter la tolérance immunitaire de l'hôte à ces cellules allogéniques, des approches d'immunosuppression similaires à celles réalisées dans les greffes d'organes sont envisagées. D'autre part, comme pour les iPSC, des banques de CSE sont réalisées pour optimiser la compatibilité du système HLA. Enfin, différentes approches d'ingénierie des CSE sont développées visant à permettre aux cellules différenciées issues des CSE de sécréter un environnement immunosuppresseur et d'assurer elles-mêmes leur meilleure tolérance.

(iii) Purification

Avant l'administration aux patients, les cellules thérapeutiques issues des cellules souches pluripotentes doivent être purifiées. La méthode de purification utilisée en routine consiste à trier les cellules exprimant les marqueurs de surface de la population cible par tri cellulaire en cytométrie en flux^{156,157}.

D'autre part, des stratégies de purification ont été développées à partir d'expression de marqueurs sélectionnés placés sous le contrôle de promoteur lignée-spécifique. Cette approche permet une

purification des populations cellulaires et une sélection par l'ajout d'un gène de résistance à un antibiotique^{158,159}. L'inconvénient principal de cette stratégie est la nécessité d'insertion d'une cassette de sélection dans le génome hôte. Cette insertion présente en effet un risque de transformation tumorale chez l'hôte en fonction du locus d'insertion dans le génome.

Enfin les problématiques de contrôle de la taille des greffes de cellules thérapeutiques et l'optimisation de l'intégration des cellules greffées dans le tissu ou l'organe cible sont actuellement au cœur de nombreuses études^{160,161}.

(iv) Identification du modèle approprié pour le développement pré-clinique

L'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dans les études précliniques nécessite la mise en place de xéno greffe. Se pose alors la question du choix des modèles animaux les plus pertinents. Les problématiques principales sont la tolérance aux xéno greffes humaines, la récapitulation de la physiopathologie de la maladie et de la réponse aux thérapies, la capacité à réaliser des criblages de molécules à haut débit¹⁶². Aucun modèle animal ne satisfait tous ces critères. Le modèle murin est le plus couramment utilisé en raison de son faible coût et du nombre important de modèles pathologiques disponibles. Toutefois, l'extrapolation des données murines à l'échelle humaine est discutable et le recours à des primates non-humains est souvent inévitable.

Partie 3: Rôle des ribosomes et de leur biogenèse au cours du développement embryonnaire et dans l'homéostasie des cellules souches embryonnaires

3.1 Définitions des ribosomes et du processus de traduction

a. Découverte, composition et fonctions des Ribosomes

(i) Découverte

La première observation des ribosomes a été réalisée dans des cellules de rats, il y a plus de 60 ans, par George E. Palade¹⁶³. Les ribosomes ont alors été décrits comme des particules granulaires. C'est au cours des années 1960 que la nature ribonucléo-protéique et le rôle des ribosomes dans la synthèse protéique ont été établis¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Ainsi, le transfert de l'information génétique de l'ADN à l'ARNm puis la traduction de l'ARNm par les ribosomes en protéines fonctionnelles effectrices sont acceptées depuis plusieurs décennies¹⁶⁷.

Les mécanismes moléculaires permettant aux ribosomes d'interpréter et de traduire l'information génétique portée par les ARNm et de contribuer à la diversité phénotypique à l'échelle de la cellule et de l'organisme ont été au centre de nombreuses études biochimiques et biophysiques¹⁶⁸. Ce n'est toutefois qu'entre la fin des années 1990 et le début des années 2000 que la résolution atomique de la structure des ribosomes procaryotes a été entièrement réalisée¹⁶⁹⁻¹⁷². Cette prouesse technique a été possible grâce au couplage de méthodes de cristallographie, de spectrométrie aux rayons X et de cryo-microscopie électronique (cryo-EM). La résolution de la structure des ribosomes eucaryotes, plus grands et complexes a été réalisée en 2010 à partir de ribosomes de levures. Ces ribosomes ont été cristallisés puis analysés par spectrométrie aux rayons X à une résolution atomique (5,5 angströms)^{173,174}.

Par la suite, les structures des ribosomes de plante, de protozoaire, de drosophile ont été élucidées. En 2013 et 2015, les structures du ribosome humain ont été obtenue avec une résolution comprise entre 5,4 à 6 angströms (Figure 24)^{175,176}. En combinant les densités électroniques de ces ribosomes, aux structures cristallines des ribosomes eucaryotes unicellulaires et aux prédictions des structures secondaires des ARNr, un modèle moléculaire de la structure des ribosomes humains a été établi. En 2015, après l'optimisation des méthodes de cristallisation et de purification, Klaholz *et al.* ont considérablement amélioré la résolution de la structure du ribosome humain 80S : résolution de 2,9 à 3,6 angströms en fonction de la stabilité des régions étudiées. Cette structure a permis la compréhension des interactions entre les ARNr, les chaînes peptidiques en formation, la liaison de l'ARN de transfert (ARNt) et les interactions moléculaires au site de sortie de l'ARNt. D'autre part, cette structure très résolutive a permis la mise en évidence d'interactions moléculaires à l'interface

entre les deux sous-unités ribosomiques. Ces interactions semblent être impliquées dans les changements conformationnels au cours de la régulation de la synthèse protéique^{176,177}

Le ribosome est une cible thérapeutique centrale dans différentes pathologies infectieuses et son potentiel thérapeutique émerge dans le domaine de l'oncologie. Ainsi, la résolution de la structure du ribosome humain présente de nombreuses perspectives médicales, notamment pour contrer l'émergence de résistance aux antibiothérapies et potentiellement diminuer la toxicité et les effets secondaires graves inhérents au manque de spécificité des chimiothérapies ciblant les ribosomes ou leur biogenèse^{176,178-180}.

(ii) Composition générale des ribosomes

Les ribosomes sont des machineries macromoléculaires ribonucléoprotéiques très complexes comprenant deux sous-unités asymétriques composées de 4 ARN ribosomiques et de 80 protéines ribosomiques (Figure 25)^{176,181-183}. Les ribosomes ont les propriétés d'un ribozyme : ce sont les ARN ribosomiques (ARNr) qui porte l'activité catalytique du complexe ribonucléoprotéique.

La grande sous-unité ribosomique (LSU pour « large subunit » ou sous-unité 60S) possède un coefficient de sédimentation de 60S chez les eucaryotes supérieurs (coefficient de sédimentation à vitesse constante). Elle est formée de 47 PR associées à trois ARNr différents : les ARN 28S, 5S et 5,8S. Elle contient le centre peptidyl- transférase (PTC) de la LSU qui catalyse la formation de la liaison peptidique entre l'amino-acyl-ARNt et le peptide naissant. La chaîne peptidique en formation sort ensuite du ribosome par le tunnel de sortie, où elle est prise en charge par des protéines chaperonnes pour permettre son repliement tridimensionnel correct¹⁸⁴.

La petite sous unité (SSU, pour « small subunit » ou sous-unité 40S) possède un coefficient de sédimentation 40S. Elle est formée de 33 PR associées à un ARNr unique : l'ARN 18S. La SSU porte l'activité de décodage de l'ARNm (« decoding centre ») permettant la reconnaissance codon/anti-codon (respectivement sur l'ARNm et l'ARNt) et assure une traduction correcte de l'information génétique. L'assemblage de ces deux sous-unités forme le ribosome mature de 80S chez les eucaryotes supérieurs (Figure 25).

(iii) Fonction des ribosomes

Les ribosomes sont les machineries macromoléculaires qui catalysent la traduction de l'information génétique portée par les ARNm en protéines fonctionnelles.

L'ARNr est l'acteur principal de l'activité catalytique des ribosomes. Cette démonstration a été établie en 2000 par validation dans trois études de l'absence de protéines ribosomiques (PR) au niveau du site catalytique de formation de la liaison peptidique^{169,185,186}. Ainsi, le ribosome est considéré comme un ribozyme dans lequel l'ARNr possèdent l'activité catalytique intrinsèque.

L'hypothèse de réalisation de la synthèse protéique par les ARNr avait toutefois été émise bien avant la résolution de la structure des ribosomes^{187,188}.

Les PR assureraient plus un rôle de support et de maintien de la structure tridimensionnelle des ARNr. Toutefois, des données structurales récentes ont identifié certaines protéines ribosomiques comme impliquées dans des changements conformationnels au niveau de l'interface entre la petite sous-unité ribosomique (sous-unité 40S ou SSU pour « Small subunit ») et la grande sous-unité ribosomique (sous-unité 60S ou LSU pour « Large subunit ») ayant des fonctions régulatrices sur l'activité des ribosomes (Figure 26). Les PR pourraient ainsi exercer un rôle indirect sur la régulation de l'activité traductionnelle des ribosomes¹⁷⁶. La composition des ribosomes eucaryotes supérieurs sera décrite en détail dans la partie 3.1 a. (iii).

Bien que les ribosomes orchestrent la synthèse protéique au sein de tous les domaines du vivant, leur structure physico-chimique s'est grandement complexifiée au cours de l'évolution. Ainsi, la masse moléculaire des ribosomes procaryotes est de 2,4 MDa contre 4,3 MDa pour celle des eucaryotes supérieurs. Les modifications additionnelles observées sont principalement des additions de PR, des prolongations polypeptidiques sur des PR conservées et des prolongations nucléotidiques des ARNr appelées « extension segments : ES ». La plupart des ES et PR spécifiques aux eucaryotes supérieurs sont retrouvées en périphérie du ribosome et forment des couches externes, par opposition au cœur du ribosome qui est extrêmement conservé¹⁷⁵. De nombreuses équipes cherchent à établir le rôle et la fonction de ces modifications sur l'activité des ribosomes eucaryotes. Ces composants formeraient une plateforme permettant l'intégration de signaux de régulation de la traduction et l'initiation des modifications co-traductionnelles des protéines^{189,190}.

(iv) Principaux sites catalytiques du ribosome

La synthèse protéique orchestrée par le ribosome est divisée en quatre étapes principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage¹⁹¹. Ces différentes étapes sont catalysées par l'intervention séquentielle de nombreux facteurs associés.

Les processus fondamentaux de la traduction ont lieu au sein de sites catalytiques particuliers au sein du ribosome, les sites A, P et E : la reconnaissance de l'ARNm par l'anticodon de l'ARNt (site A), le transfert de la liaison peptidique (site P), la sortie de la chaîne peptidique en formation par le tunnel de sortie (site E) (Figure 25).

(a) L'initiation de la traduction : le site A et le « Decoding centre »

L'initiation a lieu au sein du site de décodage de l'ARNm ou « Decoding Center » (DC) au niveau du site A de la SSU et permet la reconnaissance et l'appariement entre les codons des ARNm et les anticodons des ARN de transfert initiateur (Figure 27).

Au niveau du site A, l' aminoacyl-ARNt associé au facteur eEF1A se loge de façon à ce que la boucle de l' anticodon soit au contact du codon complémentaire de l' ARNm. L' interaction codon-anticodon est contrôlée de façon stricte pour les deux premiers nucléotides par certaines bases de l' ARNr 18S. En l' absence d' une conformation définie des deux premiers nucléotides du codon avec l' anticodon, l' ARNt est expulsé du DC. Pour la troisième base nucléotidique, l' appariement est contrôlé de façon plus souple. Ce modèle explique la dégénérescence du code génétique et la possibilité qu' un ARNt puisse reconnaître plusieurs codons différents. En 2012, cette hypothèse a été validée et précisée à la lumière de la résolution atomique des structures des ribosomes eucaryotes¹⁹². La tolérance au niveau de l' appariement de la troisième paire de bases serait une conséquence de contraintes stériques exercées par deux hélices de l' ARNr 18S, la PR eS16 et par une hélice de l' ARNr 28S au sein du site de décodage de l' ARNm.

(b) L' élancement : le site P et le site de transfert de la liaison peptidique « PTC »

L' élancement consiste en la formation de la liaison peptidique entre les acides aminés liés de façon covalentes aux ARNt et le peptide en formation. Cette étape se déroule au sein d' une zone appelée centre de transfert de la liaison peptidique ou PTC pour « peptidyl transferase centre » au sein du site P du ribosome (Figure 28)^{193,194}. Le site P se trouve à proximité du site A. Le site P comprend un site de liaison de l' aminoacyl-ARNt en formation au sein de la petite sous-unité et le PTC au sein de la grande sous-unité du ribosome.

Après appariement entre le codon et l' anticodon, le facteur eEF1A est libéré par hydrolyse de GTP et des changements conformationnels permettent le rapprochement de l' aminoacyl-ARNt et du peptidyl-ARNt en formation. Ce rapprochement a lieu au sein du site de transfert de la liaison peptidique ou « Peptidyltransferase centre » (PTC) de la grande sous-unité ribosomique. Le PTC est composé exclusivement d' ARNr créant un environnement stérique facilitant le transfert peptidique^{185,188,195}. Certaines PR en interagissant avec l' ARNt sont toutefois indispensables à la formation de la liaison peptidique¹⁹⁶. La structure du PTC est en grande partie conservée entre les ribosomes procaryotes et eucaryotes. Toutefois, certaines modifications structurales périphériques seraient spécifiques aux ribosomes eucaryotes et expliqueraient la différence d' accessibilité de certains antibiotiques au sein du PTC et la plus faible sensibilité¹⁹⁷.

(c) La terminaison et le recyclage : le site de sortie ou site E

Après formation de la liaison peptidique, la conformation des ARNt est modifiée et permet la création d' un état hybride : l' ARNt déacétylé se place à cheval entre le site E de la LSU et le site de liaison de l' aminoacyl-ARNt du site P de la SSU ; le peptidyl ARNt se trouve lui entre le site PTC du site P au sein de la LSU et le site A de la SSU. Par la suite, la liaison du facteur eEF2 provoque par hydrolyse de GTP un déplacement de la SSU par rapport à la LSU appelé translocation (Figure 28). Le

ribosome est alors prêt à accueillir un nouvel aminoacyl-ARNt car le site A est libéré. Le site P est occupé par le peptidyl-ARNt nouvellement formé et le site E par l'ARNt déacétylé¹⁹⁴.

Ensuite, le peptide en formation emprunte le tunnel de sortie au sein de la LSU et traverse le PTC jusqu'à la surface du ribosome^{198,199} : c'est le processus de terminaison. La chaîne peptidique formée est en contact avec de nombreux composants du ribosome : hélices de l'ARNr 28S, PR L4/uL4, L17/uL22 et L39/eL39²⁰⁰. Ces différentes interactions favorisent le repliement co-traductionnel des protéines en formation^{201,202}.

Les différents composants du ribosomes sont ensuite recyclés puis ré-utilisés au cours d'un autre cycle de traduction.

(d) Interface entre la LSU et la SSU

Il existe de nombreux points de contact moléculaire entre les deux sous-unités du ribosome au niveau des ARNr et de certaines extensions des PR. Chez les eucaryotes, deux protéines de la LSU eL24 et eL19 présentent des extensions qui leur permettent de rentrer en contact avec la SSU respectivement au niveau de eS6 et de l'ARNr 18S. On parle de ponts spécifiques des eucaryotes (Figure 29)¹⁷⁶. Ces interactions sont impliquées dans les changements conformationnels permettant la progression et le mouvement de la SSU par rapport à la LSU au cours de la traduction¹⁷⁶.

Le ribosome est donc une structure macromoléculaire évoluant de manière dynamique pour permettre les différentes phases de la traduction. Les ARNr et les PR forment de nombreuses interactions conférant de la flexibilité à certaines régions et de la rigidité à des régions conservées comme le PTC. Les structures spécifiques des ribosomes eucaryotes supérieurs (interface entre les deux sous-unités, site de liaison de l'ARNt et conformation du site E) suggèrent un rôle fonctionnel de celles-ci dans le contrôle de la fidélité et la spécificité de la traduction.

b. La régulation de la traduction

La synthèse protéique est le mécanisme cellulaire le plus énergivore chez les eucaryotes²⁰³. Des mécanismes de contrôle de la traduction sont donc essentiels à la régulation de l'expression génique²⁰⁴.

Ainsi, le processus traductionnel est au carrefour de différentes voies de signalisation permettant aux cellules d'ajuster leur protéome en fonction des conditions environnementales i.e ; taux d'O₂, nutriments disponibles, statut hormonal, stress²⁰⁵. Les quatre étapes de la traduction sont soumises à des régulations²⁰⁶. Toutefois, il est généralement accepté que l'initiation est l'étape la plus déterminante du processus de traduction et par conséquent c'est l'étape décrite comme la plus hautement régulée^{203,207}.

(i) Contrôle de l'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction comprend le recrutement des deux sous-unités ribosomiques sur l'ARNm et la reconnaissance du codon initiateur par l'aminoacyl-ARNt. Plus de douze facteurs d'initiation de la traduction sont impliqués chez les eucaryotes supérieurs²⁰⁸.

La communauté scientifique distingue deux modes d'initiation de la traduction principaux : les mécanismes d'initiation « coiffe-dépendants » et les mécanismes « coiffe-indépendants »²⁰⁶. Les principes fondamentaux de ces deux mécanismes seront décrits ci-dessous.

(a) *Initiation de la traduction « coiffe-dépendante »*

Le mécanisme d'initiation dépendant de la coiffe (ou 5'-cap) commence par la formation d'un complexe de pré-initiation entre la SSU et différents facteurs d'initiation eucaryotes ou eIF (pour « eukaryotic Initiation Factors »). Ensuite, ce complexe se lie à une structure m⁷GpppN (guanosine méthylée en position N7 et reliée au premier nucléotide par une liaison triphosphate) en 5'-UTR (UTR pour « untranslated region ») de l'ARNm, appelée coiffe. Le complexe se déplace sur l'ARNm jusqu'à avoir atteint un codon initiateur AUG²⁰⁸. On parle alors de complexe d'initiation de la traduction. La LSU se lie ensuite à ce complexe et se déplace sur l'ARNm. L'hydrolyse de différentes molécules de GTP associées aux facteurs d'initiation permettent la libération de ces derniers puis la formation du complexe d'initiation 80S mature. Ce complexe d'initiation possède un ARNt au site P et est capable d'initier l'étape d'élongation. Les différentes étapes sont schématisées sur la figure 27.

(b) *Initiation de la traduction « coiffe-indépendante »*

Dans certaines conditions de stress, des mécanismes d'initiation alternatifs à l'initiation « coiffe-dépendante » ont été observés. Ces mécanismes sont conservés au cours de l'évolution. L'expression de nombreux oncogènes, facteurs de croissance, protéines de réponse au stress ou d'apoptose sont soumis à ces modes d'initiation alternatifs. Cette « reprogrammation » de l'initiation de la traduction implique différents éléments de structure des ARNm permettant la liaison en *cis* ou en *trans* de facteurs associés à l'ARNm (Figures 30-32)²⁰⁹⁻²¹¹.

- **Les IRES**

Les IRES pour « Internal Ribosomal Entry Site » sont des structures présentes dans l'extrémité 5'UTR de certains ARNm (Figure 30). Les IRES permettent le recrutement des ribosomes et l'initiation de la traduction dans des conditions de stress inhibant la traduction coiffe-dépendante 5'. Les IRES sont des structures qui miment l'interaction codon-anticodon au niveau du site P du ribosome et permettent ainsi le recrutement direct du ribosome 80S²⁰⁸. Un classement de quatre groupes principaux d'IRES a été établi en fonction de leur structure secondaire et des facteurs d'initiation associés^{208,210}.

- **Autres structures**

De nombreuses séquences ou structures spécifiques régulatrices de la traduction existent (Figure 31). On recense ainsi au niveaux des extrémités 5' et 3' non traduites des ARNm, les uORF pour « upstream Open Reading Frame », les séquences « 5'-terminal oligopyrimidine tract » ou « 5'-TOP », les éléments TISU pour « Translation Initiator of Short 5' UTR », les sites de fixation de protéines de liaison aux ARN ou de microARN, des structures activatrices de la traduction coiffe indépendant appelés CITE pour « Cap-Independent-Translation Enhancers » ou encore des modifications post-transcriptionnelles des ARNm m⁶A agissant comme des IRES (MIRES)^{168,206,211-213}. Les uORF sont des cadres de lecture de la traduction situés en amont du cadre de lecture normal ou ORF (pour « open reading frame ») inhibant l'initiation de la traduction au niveau de l'ORF principal.

Ces modes de régulation sont schématisés sur la figure 31²⁰⁶. Ces structures situées aux extrémités 5' et 3'-UTR permettent la régulation de l'initiation de la traduction de sous-populations spécifiques d'ARNm en réponse à différents stimuli. Les mécanismes moléculaires de ces modes de contrôle de l'initiation de la traduction coiffe-indépendante ne sont pas complètement élucidés^{203,208}.

Des parallèles entre la régulation de la transcription par les ARN polymérase et de la traduction par les ribosomes, bien que simplificateurs, permettent d'appréhender la complexité et la diversité des fonctions des acteurs de la régulation de l'initiation de la traduction (Figure 32).

(ii) Autres niveaux de régulation de l'initiation de la traduction

(a) La phosphorylation de eIF2 α

Le facteur eIF2 (facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 α) est impliqué dans la liaison de l'ARNt-méthionine initiateur sur le site A de l'ARNm lors de l'initiation de la traduction (Figure 33). eIF2 est un hétérodimère composé des sous-unités α , β et γ . La phosphorylation de eIF2 α est celle qui assure le rôle le plus important de régulation de l'initiation de la traduction. Quatre kinases sont capables de phosphoryler eIF2 α en réponse à différents stimuli²¹⁴. Tout d'abord eIF2ak1 (Heam-regulated kinase) est une kinase présente spécifiquement au sein des lignées érythroïdes. La protéine kinase R ou Pkr (eIF2ak2), la kinase du reticulum endoplasmique Pkr-like kinase ou Perk (eIF2ak3) sont respectivement activées en réponse aux infections virales et par le stress du réticulum endoplasmique. Enfin, la kinase Gcn2 (pour « general control non derepressible 2) est activée en réponse à la privation en certains acides-aminés. De façon générale, la phosphorylation de eIF2 α inhibe le remplacement du GDP par un GTP par eIF2 β , réduisant ainsi la quantité de complexe disponible (ARNt-Méthionine) pour initier la traduction et diminuant ainsi globalement l'initiation de

la traduction des ARNm. Le contrôle de la phosphorylation de eIF2 α participe donc au contrôle de l'initiation de la traduction.

(b) Les voies de signalisation de mTOR

Différents signaux extracellulaires provenant notamment de l'insuline, de nutriments, de certains facteurs de croissance, activent les voies PI3K/Akt et Ras/Mapk qui conduisent à l'activation de mTOR (Figure 34-35). En réponse à ces stimuli, la protéine mTOR est activée et recrutée au niveau de facteurs d'initiation de la traduction (dont eIF3) où elle active une série de phosphorylations (notamment de 4EBP1, S6K1 et de eIF4B) permettant la formation du complexe d'initiation de la traduction²⁰⁵. mTOR régule donc la synthèse protéique globale en contrôlant l'initiation de la traduction « coiffe-dépendante ». Toutefois, la voie mTOR semble également impliquée dans des mécanismes de régulation de la traduction de sous-populations d'ARNm par des mécanismes d'initiation « coiffe-indépendants»²¹⁵.

(c) La biogenèse des ribosomes et l'initiation de la traduction

Le contrôle de la biogenèse des ribosomes est le déterminant principal de la capacité de synthèse protéique au niveau cellulaire. La biogenèse des ribosomes est contrôlée notamment par l'activation des voies de signalisation mTOR-dépendantes décrites ci-dessus²¹⁶. D'autre part, des données récentes décrivent l'existence chez les procaryotes de boucles de rétrocontrôle entre les mécanismes d'initiation de la traduction (concentration en nucléotides ou NTP et phosphorylation des guanosines de la coiffe ou ppGpp) et le contrôle de la synthèse des protéines ribosomiques²¹⁷. D'autre part, différents facteurs d'initiation de la traduction exercent une fonction double à la fois sur la biogenèse des ribosomes et sur le contrôle traductionnel^{214,218}. eIF6 (Tif6 chez la levure) est un facteur dit anti-associatif capable de lier la sous-unité pré-60S nucléolaire et de participer à l'export cytoplasmique de celle-ci. La protéine eIF6 est également impliquée dans le contrôle de la traduction en empêchant l'association des sous-unités 40S et 60S. La libération de eIF6 constitue donc probablement une étape de contrôle qualité de l'assemblage des ribosomes 80S. Toutefois la fonction moléculaire précise de eIF6 sur l'initiation de la traduction n'est pas encore élucidée^{142,219}. Ainsi, la biogenèse des ribosomes participe activement à la régulation de l'initiation de la traduction. En effet, des défauts de la biogenèse des ribosomes conduisent au développement de pathologies ayant une symptomatologie clinique tissu-spécifique, les ribosomopathies²²⁰. Des altérations de la biogenèse des ribosomes affectent donc spécifiquement l'homéostasie de certains types cellulaires.

(iii) Disponibilité des ribosomes et régulation traductionnelle

(a) Conséquences de variations du nombre de ribosomes « disponibles »

En 2014, Marshall *et al.* ont mis en évidence un modèle d'initiation de la traduction en « boucle fermée » par recyclage des ribosomes des extrémités 3' aux extrémités 5' au sein des mêmes ARNm. Ce recyclage des ribosomes serait un mécanisme actif permettant de maintenir la traduction de certains ARNm et leur synthèse protéique en présence de taux d'initiation de la traduction limité par une faible disponibilité des ribosomes. La concentration des ribosomes est donc un paramètre important dans la régulation de la synthèse protéique²²¹.

En ce sens, le dysfonctionnement et la diminution de la concentration des ribosomes provoqueraient une altération globale du contrôle traductionnel des ARNm à l'origine des ribosomopathies. Les phénotypes tissus spécifiques des ribosomopathies s'expliqueraient par la sensibilité particulière de transcrits au sein de certains tissus à la concentration des ribosomes²²².

Toutefois, des études contradictoires suggèrent que la diminution de la disponibilité des ribosomes, suite notamment à des altérations de leur biogenèse, aurait un impact plus important sur l'initiation de la traduction spécifique des transcrits possédant des structures IRES²²³.

(b) La densité de ribosomes influence l'élongation

Zarai *et al.* ont récemment démontré qu'en plus de la concentration ribosomique, la densité des ribosomes par ARNm est un paramètre critique dans le contrôle de l'efficacité de la traduction, spécifiquement au niveau de l'élongation. En effet, un nombre trop important de ribosomes peut créer un encombrement sur les ARNm aboutissant à une synthèse protéique sub-optimale²²⁴.

(iv) Fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques

Les protéines ribosomiques sont des protéines de liaison aux ARN abondantes. La plupart sont ubiquitaires et communes aux trois règnes du vivant. Certaines PR possèdent une fonction indépendamment de leur association au ribosome. On parle de fonction extra-ribosomique^{225,226}. Les PR peuvent ainsi prendre part à des boucles de rétrocontrôle régulant la traduction de leurs propres ARNm ou celle d'autres ARNm^{226,227}. Certaines fonctions extra-ribosomiques de PR seront décrites notamment des PR impliquées dans des fonctions immunitaires, au cours du développement embryonnaire ainsi que dans le contexte de la tumorigenèse.

(a) Rôle de protéines ribosomiques dans la signalisation immunitaire innée

RPL13a/uL13 a été impliquée dans l'activation de la réponse inflammatoire de l'interféron γ (IFN γ). En effet, chez l'homme, l'IFN γ phosphoryle RPL13a. RPL13a quitte alors le ribosome pour s'associer au complexe GAIT pour « gamma interferon (IFN- γ)-activated inhibitor of translation ». Le complexe

GAIT exerce une activité d'inhibition de la traduction de l'ARNm de la céruloplasmine en liant leur extrémité 3'UTR^{226,228}. La céruloplasmine plasmatique est sécrétée par les hépatocytes et également en phase aigue de l'inflammation par les macrophages activés par des cytokines.

En réponse à des stimuli sécrétés par les lymphocyte, RPS3/uS3 est une PR capable d'être transloquée dans le noyau avec la sous-unité p65 de NF-κB et de potentialiser la liaison de NF-κB à ces gènes cibles²²⁹. RPS3 participe ainsi à la transduction des signaux inflammatoires du cytoplasme au noyau de la voie de signalisation NF-κB.

(b) Rôle de différents paralogues: exemple de Rpl22/Rpl22l

Plusieurs protéines ribosomiques possèdent des paralogues dont l'expression a été conservée au cours de l'évolution²³⁰. Chez la levure, 59 des 80 PR ont des paralogues, chez les mammifères, la plupart des protéines ribosomiques sont codés par un gène unique²³¹.

Il a été démontré que la protéine Rpl22, tout comme sa protéine paralogue Rpl22l1 (Rpl22-like 1), étaient capables de lier l'ARNm de *Smad1* mais exerçaient des effets opposés sur son expression dans l'embryon de poisson zèbre. En effet, la liaison de Rpl22 à l'extrémité 5'-UTR de *Smad1* inhibe son expression alors que Rpl22l est indispensable à la stabilisation de *Smad1* par des mécanismes post-transcriptionnels²³². En contrôlant l'activation de *Smad1*, l'équilibre entre l'expression de Rpl22/Rpl22l régule de manière antagoniste la production de cellules souches hématopoïétiques chez le poisson zèbre. D'autre part, il a été démontré que Rpl22 régulait l'expression de son paralogue *Rpl22l* en liant son ARNm²³¹. Plus récemment, au sein de la fraction nucléaire, Rpl22/Rpl22l ont été identifiés comme régulant l'épissage de *Smad2* lors de la gastrulation²³³.

(c) Stabilisation des ARNm codant les protéines ribosomiques par la SU 40S liée à la protéine LARP1

Les protéines ribosomiques sont indispensables à la formation des ribosomes et à l'initiation de la traduction. Récemment, Gentilella *et al.* ont démontré l'existence d'un complexe entre la petite sous-unité 40S, la protéine de liaison aux ARN LARP1 et les séquences 5'TOP des ARNm codant pour les protéines ribosomiques (PR) permettant préférentiellement leur stabilisation. Ce mécanisme de contrôle de la stabilité des ARNm des protéines ribosomiques permet aux cellules d'avoir un « réservoir anabolique » assurant une production plus rapide des PR et une initiation de la traduction adaptée aux besoins²³⁴.

3.2 La biogenèse des ribosomes eucaryotes

a. Localisation, fonction et conservation de la biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes eucaryotes est un processus complexe au cours duquel la transcription, la maturation, le repliement et les modifications post-transcriptionnelles des ARNr ont lieu en parallèle à l'assemblage séquentiel avec les 80 PR (Figure 36). La biogenèse des ribosomes débute et se déroule majoritairement au sein des nucléoles, un type de sous-compartiments nucléaires. Au cours de leur maturation, les particules pré-ribosomiques sont exportées du nucléole vers le nucléoplasme puis au travers des ports nucléaires, vers le cytoplasme (Figure 37)²³⁵⁻²³⁸.

La biogenèse comprend la transcription dans le nucléole des gènes codant pour les ARNr en un grand précurseur pré-ARN (47S chez l'homme 35S chez la levure). Ce précurseur subit ensuite différentes étapes de clivage et est associé simultanément avec des protéines ribosomiques (PR)^{235,239}. Les protéines ribosomiques sont traduites dans le cytoplasme à partir d'ARNm transcrits par l'ARN polymérase II et sont importées dans le nucléole pour s'assembler avec les ARNr naissants. Contrairement aux autres ARNr, l'ARNr 5S est transcrit au sein du nucléoplasme puis importé dans le nucléole.

Chez l'homme, ce processus fait intervenir plus de 300 facteurs associés non ribosomiques (protéines et snoARN) qui orchestrent les différentes étapes successives de maturation et de clivage des pré-ARNr, de modifications post-traductionnelles des PR puis l'export des complexes vers le cytoplasme²³⁸⁻²⁴¹. Les facteurs ou protéines associées aux ribosomes (PaR) agissent en *trans* et fournissent l'énergie permettant son remodelage au cours des différentes étapes de maturation et comprennent de nombreuses ARN hélicases, ATPases et GTPases. Certains facteurs assurent en parallèle un contrôle qualité des particules pré-ribosomiques, s'assurant que seuls les ribosomes correctement assemblés et fonctionnels initient la traduction^{237,235,238,242}. Les progrès de la cryo-microscopie électronique ont permis l'obtention de données structurales des différentes étapes de l'assemblage du ribosome eucaryotes. Toutefois, la fonction moléculaire précise de la plupart des protéines identifiées comme associées aux ribosomes par co-immunoprécipitation et par spectrométrie de masse reste aujourd'hui inconnue (Figure 37)²³⁵.

(i) Organisation du nucléole

Le nucléole est le site principal de la biogenèse des ribosomes. Le nucléole s'est complexifié parallèlement à la complexification de la structure et de la biogenèse des ribosomes : chez la levure, le nucléole est formé de deux compartiments alors qu'il en présente trois chez l'homme²⁴³. D'autre part, le protéome nucléolaire est d'environ 200 protéines chez la levure contre 4500 chez l'homme²⁴⁴.

Le nucléole est un domaine nucléaire de densité et de taille importante. Il a été observé par microscopie dans des cellules d'Eucaryotes supérieurs par Felice Fontana en 1781²⁴⁵. À cette époque, la fonction du nucléole était inconnue. Toutefois, le nombre de nucléoles visibles était mis en corrélation avec la croissance cellulaire. Leur fonction a été identifiée dans les années 1930 par Barbara McClintock par la démonstration de l'organisation des nucléoles autour de loci chromosomiques appelés NOR (« *Nucleolus Organizer Region* ») qui correspondent aux régions des gènes de l'ADNr²⁴⁶. Chez l'homme, ces gènes sont répétés en tandem (environ 400 copies) sur les chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22.

L'ultra-structure des nucléoles visible en microscopie électronique révèle trois compartiments témoins de l'activité de biogenèse des ribosomes :

- le centre fibrillaire (FC) est une zone arrondie peu dense aux électrons. Le FC contient les régions promotrices des gènes de l'ADNr. Le nombre de FC est généralement corrélé à l'activité cellulaire.
- Le composant fibrillaire dense (DFC) est très dense aux électrons. Il forme généralement un anneau sombre et fin autour du FC. La transcription des ADNr a lieu à l'interface entre le FC et le DFC. Les étapes précoces de la maturation des ARNr se passent dans le DFC.
- Le composant granulaire (GC) est une zone plus grande que les FC et DFC, située en périphérie des nucléoles. L'aspect granulaire du GC est dû au grand nombre de particules pré-ribosomiques en cours d'assemblage ou stockées dans cette zone.

Ces trois composants s'assemblent autour des NOR lorsque la transcription des ADNr est initiée, à l'interface du centre fibrillaire et du composant fibrillaire dense. Le nucléole se désagrège lorsque la transcription des ADNr est arrêtée physiologiquement lors de la mitose ou par inhibition pharmacologique de l'activité de l'ARN polymérase I (ARN pol I).

Les différents composants du nucléole sont présents dans la zone qui correspond à leur fonction au sein de la biogenèse des ribosomes. Ainsi, l'ARN pol I est principalement présente dans le FC, alors que la Dyskérine et la Fibrillarine, deux enzymes de maturation précoce des ARNr, sont enrichies dans le DFC. La Nucléoline et la Nucléophosmine interviennent à toutes les étapes de la biogenèse des ribosomes (la transcription des ARNr, leur maturation, l'assemblage et l'export) et sont retrouvées dans les trois régions des nucléoles^{243,247,248}.

Parmi les 4500 protéines nucléolaires identifiées chez l'homme, seules 30% semble être impliquées dans la biogenèse des ribosomes et environ 300 ont une fonction de maturation des ARNr^{242,243}. Les nucléoles pourraient donc exercer des fonctions supplémentaires à celles déjà décrites dans la régulation de la croissance cellulaire et la synthèse des ribosomes²⁴⁹. En effet, des rôles dans la réplication et la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire ou l'activation de l'apoptose émergent au sein de la communauté scientifique²⁵⁰.

(ii) La biogenèse des ribosomes s'est complexifiée au cours de l'évolution

La biogenèse des ribosomes s'est complexifiée au cours de l'évolution suite à la compartimentation nucléaire présente chez les eucaryotes. La formation de noyau a en effet nécessité le développement de mécanismes d'import nucléaire des précurseurs des composants ribosomiques puis d'export cytoplasmique des particules ribosomiques matures. La plupart des connaissances actuelles ont été établies à partir du modèle de la levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae*. Cet organisme eucaryote inférieur présente de nombreux avantages tant au niveau génétique (génération de mutants, criblages génétiques etc.) que biochimique (purification de complexes protéiques et notamment de pré-ribosomes, etc.)²⁵¹.

La composition en protéines ribosomiques et les intermédiaires pré-ribosomiques ont ainsi été identifiés chez la levure à partir des années 1970. Par la suite, les différents facteurs de biogenèse associés au ribosome ont été identifiés^{252,253}. Les progrès techniques (microscopie électronique, méthodes de purification) ont permis d'identifier le rôle de ces intermédiaires dans la maturation des ribosomes et d'identifier d'autres particules pré-ribosomiques. La cryo-microscopie électronique permet aujourd'hui d'observer ces différents intermédiaires à une résolution atomique^{176,254}. Les intermédiaires de synthèse majeurs seront décrits ci-dessous.

(iii) Comparaison des voies de biogenèse chez les levures et les mammifères

La biogenèse des ribosomes comme leur structure est globalement conservée entre les différentes espèces eucaryotes^{175,176,181,255}. Le modèle de la biogenèse du ribosome décrit chez la levure est fréquemment extrapolé aux mammifères et à l'homme. Il faut toutefois garder à l'esprit l'existence de différences majeures au niveau, de la structure, des facteurs de biogenèse requis et des différentes étapes de maturation des pré-ARNr entre les levures et les mammifères^{242,255,256}. L'ARNr 28S humain est en effet 1,5 fois plus grand que l'ARNr de 25S levure. Les autres ARNr matures humains sont de taille similaire à ceux de la levure.

Les séquences au sein du pré-ARNr séparant les séquences correspondant aux ARNr 18S, 5.8S et 25S/28S sont très différentes entre la levure et l'homme. Elles sont en effet environ cinq fois plus grandes chez l'homme. Ces séquences sont appelées espaceurs externes et internes (5'-ETS et 3'-ETS pour « external transcribed sequences », ITS1 et ITS2 pour « internal transcribed sequences »)²⁵¹. Cette différence suggère l'existence de sites ou de séquences de clivage des ARNr différentes entre la levure et l'homme. En effet, chez la levure 70 à 80% des pré-ARNr formés sont clivés co-transcriptionnellement au site ITS1 alors que c'est très rarement le cas chez les mammifères²⁵⁷.

Le nucléole présente également une structure plus complexe chez l'homme que chez la levure, appuyant également l'hypothèse d'une complexification de la biogenèse des ribosomes chez

l'homme²⁴³. Le protéome nucléolaire est en effet bien plus complexe chez les mammifères. On recense plus de 20 fois plus de protéines nucléolaires chez l'homme que chez la levure^{244,258}.

Le modèle biologique (levures ou mammifères) à partir duquel les facteurs de biogenèse et/ou étapes de biogenèse ont été identifiés seront précisés et quand elles existent les données chez les mammifères seront décrites.

(iv) La biogenèse des ribosomes, un processus clé de l'homéostasie cellulaire

La biogenèse des ribosomes est l'un des processus cellulaires les plus énergivores. Chez la levure, la transcription par l'ARN pol-I représente 60% de la transcription totale, et les ARNr représentent 80% de l'ensemble des ARN cellulaires²⁵⁹.

La production des ribosomes, l'assemblage adéquat des quatre ARNr et des 80 protéines ribosomiques, est régulée pour s'adapter aux besoins cellulaires. Ainsi, la transcription des ARNr et des gènes codant pour les PR est contrôlée par différentes voies de signalisation cellulaires et leur activation par des facteurs de croissance, notamment la voie mTOR²⁶⁰. La biogenèse des ribosomes fait intervenir les trois ARN polymérase (Pol I, Pol II et Pol III). Des boucles de rétrocontrôle négatif liant la transcription des pré-ARNr (ARN Pol I) et la transcription des gènes codant les PR ont récemment été identifiées (ARN Pol II)²⁶¹.

Historiquement, la régulation quantitative de la biogenèse des ribosomes par le contrôle de l'activité de l'ARN Polymérase I a été la plus étudiée, notamment dans différents cancers où le taux de division cellulaire et l'activité de l'ARN Polymérase I sont plus importantes.

Une régulation plus qualitative de la biogenèse des ribosomes est également assurée par différents facteurs assurant le contrôle de la stabilité des ARNm codant les PR, leur repliement tridimensionnel, leur import dans le nucléole et leur dégradation en cas de non incorporation dans les ribosomes.

b. Les différentes étapes et acteurs de la biogenèse des ribosomes eucaryotes

(i) Transcription et clivages des ARNr

Comme précédemment indiqué, la biogenèse des ribosomes eucaryotes supérieurs implique les trois ARN polymérases. Chez les mammifères, la première étape consiste en la transcription des gènes codant pour les ARNr (28S, 18S et 5,8S) par l'ARN Pol I qui synthétise le précurseur de pré-ARNr 47S contenant les séquences des ARNr 28S, 18S et 5,8S encadrées par les espaceurs externes (5'-ETS et 3'-ETS) et internes (ITS) (Figure 38). L'ARNr 5S est transcrit indépendamment par l'ARN Pol III au sein du nucléoplasme et subit d'autres étapes de maturation avant d'être importé au sein du nucléole.

Le précurseur pré-ARNr 47S va subir différents clivages endonucléolytiques et exonucléolytiques successifs et des modifications chimiques post transcriptionnelles pour former les ARNr 28S, 18S et 5,8S matures.

Chez la souris, le pré-ARNr 47S peut-être clivé à deux sites distincts (2b en 5' d'ITS1 et 2c en 3') et former des intermédiaires différents. La maturation respective des pré-ARNr 18S en 5' et 28S et 5,8S en 3' décide du clivage préférentiel au site 2b ou 2c²⁵⁷. Les clivages dans les régions 3' de l'ITS1 sont prévalents dans les tissus murins adultes.

Chez l'homme, 12 sites de clivage sont recensés sur le pré-ARNr 47S²⁵⁵. Le premier clivage du pré-ARNr 47S a lieu aux sites 01 et 02 et génère le précurseur pré-ARNr 45S (Figure 38). Le pré-ARNr 45S peut ensuite suivre deux voies de maturation différentes.

La voie majoritaire débute par le clivage du pré-ARNr 45S au site 2. Ce clivage sépare les précurseurs d'ARNr destinés à la formation des sous-unités pré-40S et pré-60S, respectivement les pré-ARNr 30S et 32S. Le pré-ARNr 30S est ensuite simultanément clivé aux sites A0 et 1 et forme le pré-ARNr 21S. Le précurseur 21S subit une maturation assurée par l'exosome et forme un intermédiaire 21S-C. Lors de mutations de certains facteurs de biogenèse, on peut détecter une accumulation de l'intermédiaire 21S-C^{242,251,262,263}. Le clivage de la particule 21S-C au site E forme le 18S-E, qui est ensuite clivé au site 3 pour générer l'ARNr mature 18S de la petite sous-unité. Le clivage au site 3 a lieu dans le cytoplasme. Un clivage 3'-5' a lieu avant le clivage au site 3 et forme la particule intermédiaire pré-ARNr 18S-E.

Par ailleurs, le pré-ARNr 32S est clivé au site 3' dans l'ITS2 et forme l'ARNr mature 28S et la particule pré-ARNr 12S. Le pré-ARNr 12S subit différentes digestions exonucléolytiques assurées par l'exosome. Les intermédiaires détectables sont le pré-ARNr 7S puis le pré-ARNr 5.8S + 40. Ces clivages permettent la formation de l'ARNr mature 5.8S^{242,251}.

La voie minoritaire débute par les clivages aux sites A0 et A1 dans le 5'-ETS qui génèrent le pré-ARNr 41S à partir du pré-ARNr 45S. Le pré-ARNr 41S est ensuite clivé au site 2 pour former les pré-ARNr 21S et 32S (Figure 38). Ces pré-ARNr subissent alors les mêmes étapes de clivage que dans la voie majoritaire. Le clivage au niveau de l'ITS1 peut avoir lieu alternativement au site E plutôt qu'au site 2, lorsque l'espaceur 5'-ETS a préalablement été clivé au niveau du précurseur 41S²⁶². Les intermédiaires pré-ARNr 18S-E et 36S sont alors formés. Le 36S subit différents clivages et forme successivement les intermédiaires 36S-C et le 32S. Ce dernier suit les mêmes séquences de clivage que dans la voie majoritaire.

Il existe dans les cellules d'eucaryotes supérieurs, comme chez la levure deux formes d'ARNr matures 5.8S : la forme courte et la forme longue (5.8SS et 5.8SL)²⁵¹. La forme 5,8SL est d'un clivage alternatif et minoritaire du précurseur 32S (pré-ARNr 27SB chez la levure) (non-représentée).

(ii) Les modifications des ARNr

De nombreuses modifications post-transcriptionnelles affectent les ARNr des deux sous-unités du ribosome au cours de leur maturation. On recense 95 isomérisations d'uridines ou pseudouridylation, 105 méthylations de riboses et 10 méthylations de bases nucléotidiques sur l'ARNr humain²⁶⁴. Ces modifications sont le plus souvent localisées au niveau de sites fonctionnels du ribosome.

Récemment, Khatter *et al.* ont en effet démontré et partiellement cartographié l'existence d'interactions entre les ARNr et des résidus aminoacyl de protéines ribosomiques liés par des liaisons hydrogènes au sein de tout le ribosome humain. Ces liaisons sont impliquées dans des sites fonctionnels comme le tunnel de sortie, le site de liaison de l'ARNt sur le site E du ribosome et l'interface entre les deux sous-unités ribosomiques¹⁷⁶. D'autre part, ces interactions entre les ARNr et certaines PR appelées « pont » sont impliquées dans des changements conformationnels dynamiques impliqués dans les rotations des deux sous-unités ribosomiques au cours de la traduction¹⁷⁶.

Les pseudouridylation et les méthylations des riboses sont catalysées par des enzymes spécifiques (Fibrillarine et Dyskérine notamment) dont l'appariement au sein des pré-ARNr est guidé par des petits complexes ribonucléoprotéiques (snoRNP) contenant des snoARN (pour « *small nucleolar RNA* »). On distingue selon leurs structures et leurs motifs conservés les snoARN à boîte H/ACA et les snoARN à boîte C/D (Figure 39). La position à modifier sur l'ARNr cible est définie par la complémentarité d'appariement entre les petites séquences anti-sens des snoARN et les ARNr²⁶⁵. Les enzymes catalysant ces modifications ne sont pas toutes caractérisées. Les connaissances sont pour la plupart issues de la transposition des mécanismes décrits chez la levure *S. cerevisiae*.

(a) Rôle des snoRNP

Différents petits ARN nucléolaires (snoARN ou « small nucleolar ARN ») sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) guident les enzymes catalysant les modifications des ARNr au cours de la biogenèse des ribosomes.

Le snoARN U3 de type boîte C/D est au coeur du complexe appelé « SSU processome ». Le « SSU processome » sert de guide pour les clivages contribuant à la formation des précurseurs de pré-ARNr précoces de la petite sous-unité. Le snoRNP U3 se trouve au centre de la particule 90S (la première particule pré-ribosomique isolée de l'association des pré-ARNr avec les premières PR) autour de l'espaceur 5'ETS, une position stratégique pour catalyser les différents clivages²⁶⁶. Le snoRNP U3 comprend le snoARN à boîte C/D U3, les protéines associées au motif à boîte C/D et la protéine spécifique Rrp9²³⁹. Chez la levure, le SSU processome est requis pour les clivages A0, A1 et A2. Chez

les eucaryotes supérieurs, il se lie au précurseur pré-47S et est requis pour les clivages des sites 01, A0 et 1, situés dans l'espaceur 5'-ETS^{265,267}.

Les snoARN U8, U13 et U22 sont également des snoARN à boîte C/D et sont spécifiques des métazoaires. Le snoARN U8 guide les clivages permettant la production de l'ARNr mature 5.8S et l'assemblage des ARNr 5.8S et 28S ainsi que le clivage en position 3' du pré-ARNr 47S. Le snoARN U13 semble plutôt impliqué dans la formation de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S alors que le snoARN U22 est nécessaire aux clivages permettant la formation de l'ARNr 18S²⁶⁵.

Enfin, le snoARN U17 est un snoARN à boîte H/ACA requis pour le clivage de l'ARNr 18S chez les mammifères et la levure²⁶⁸.

(b) Rôle des segments d'extension ES des ARNr dans la biogenèse des ribosomes

Les segments d'extension (ES) sont des prolongations additionnelles d'ARNr acquises au cours de l'évolution. Il a récemment été démontré par des expériences de délétion par mutagenèse dans les levures *S. cerevisiae*, que ces segments d'extension sont indispensables pour la formation de l'ARNr 25S (28S chez l'homme)²⁶⁹. Ces ES ont été classés en trois groupes en fonction de l'étape de maturation des pré-ARNr impactée par leur délétion. On distingue ainsi les ES nucléolaires précoces, intermédiaires et tardifs. Ces ES pourraient avoir co-évolué pour permettre l'assemblage de certains éléments spécifiques des ribosomes protéines eucaryotes ou de certains co-facteurs.

(iii) Association des PR et modifications post-traductionnelles

Comme toutes les protéines d'une cellule, les protéines ribosomiques PR sont traduites dans le cytoplasme à partir d'ARNm transcrits par l'ARN Pol, II. Elles sont ensuite importées dans le nucléole pour s'assembler aux ARNr.

Afin d'assurer la solubilité des PR et d'empêcher leur agrégation, les PR sont associées à des protéines chaperones de manière co-traductionnelle. Ces protéines guident les PR vers leur site d'assemblage. L'association des PR avec les protéines chaperones a lieu de manière co-traductionnelle^{270,271}. Une fois arrivées au niveau de leur site d'assemblage sur les particules pré-ribosomiques, le fort pourcentage de résidus aminoacyl basiques des PR leur permet d'établir des extensions et des boucles capables de lier l'ARNr.

D'autre part, le système ubiquitine-protéasome permet la dégradation des PR non incorporées au sein de particules pré-ribosomiques et prévient également l'agrégation de ces dernières. Ce mécanisme de contrôle qualité de l'incorporation des PR au sein des ribosomes est appelé ERISQ pour « Excess R-protein Quality Control ». Le niveau de PR libres est très précisément régulé par différents mécanismes comme la régulation transcriptionnelle, la liaison aux protéines chaperones ou la dégradation par le système ubiquitine-ligase, favorisant ainsi une étroite coordination entre la biogenèse des ribosomes aux différents signaux de croissance cellulaire²⁶¹.

Les PR peuvent également subir différentes modifications post-traductionnelles ou PTM au cours de la biogenèse. Ces modifications covalentes sont susceptibles de modifier la stabilité, le compartiment sub-cellulaire ou les partenaires d'interaction des PR. Des méthylations, des phosphorylations, des ubiquitylations et plus récemment des ufmylations ont été identifiées au sein des PR²⁷². La compréhension des mécanismes de formation et des fonctions des PTM sur la régulation de la traduction émerge seulement.

c. Dynamique et facteurs d'assemblage moléculaire de la SSU et de la LSU des ribosomes eucaryotes

Ces facteurs de remodelage des pré-particules comprennent de nombreuses ARN hélicases, isomérases, ATPases et GTPases qui fournissent l'énergie nécessaire à ces remodelages moléculaires^{238,239,251,273-277}. Les facteurs de biogenèse des ribosomes s'associent aux différents pré-ARNr sous la forme de trois pré-particules principales : les particules 90S qui forment ensuite les particules pré-40S et pré-60S. Les particules pré-40S et pré-60S sont exportées vers le cytoplasme pour subir les dernières étapes de leur maturation et former les particules ribosomiques 40S et 60S à l'origine des ribosomes fonctionnels 80S^{235,236,240,278,279}. Les différents facteurs de remodelage identifiés sont décrits presque exclusivement chez la levure.

Il faut garder à l'esprit que la biogenèse des ribosomes est plus complexe chez l'homme et les mammifères que chez la levure. Le rôle de nombreux facteurs protéiques nucléolaires n'est pas encore élucidé²⁴².

(i) Biogenèse de la particule pré-ribosomique la plus précoce : la particule 90S

L'assemblage co-transcriptionnel des pré-ARNr avec les premières PR et les premiers facteurs de biogenèse des ribosomes FBR (UTP-A et B, snoRNP U3) forment la particule pré-ribosomique 90S ou «Small subunit processome » ou SSUP^{265,266,280,281}.

La pré-particule 90S est la première particule pré-ribosomique stable isolée *in vivo*. Elle est constituée des complexes UTP-A ou B liés aux structures en hélice des pré-ARNr 18S (au sein du pré-ARNr 35S chez la levure 45S chez les mammifères), à environ 20 PR de la petite sous-unité et à 65 facteurs de biogenèse des ribosomes et les snoRNP U3(Figure 40)^{266,281}. Des données structurales récentes obtenues par cryo-microscopie électronique ont démontré que les différentes protéines de biogenèse des ribosomes s'assemblaient pour former une structure protégeant le pré-ARNr 18S de la dégradation et assurant le contrôle de sa maturation chez la levure²³⁹. Différents changements conformationnels et repliements se déroulent au sein du complexe 90S et sont orchestrés notamment par le snoRNP U3^{239,281}.

Le clivage au site 2 (A₂ chez la levure) au sein de la séquence ITS1 (« *Internal Transcribed Spacer* ») sépare les voies de biogenèse nucléolaire de la SSU et de la LSU entraînant ainsi la scission de la pré-particule 90S en particules pré-ribosomiques pré-40S et pré-60S (composées respectivement des pré-ARNr 30S/26S ou 21S et du pré-ARNr 32S chez les mammifères, et pré-ARNr 20S et 27SA₂/27SB chez la levure)^{251,263}. Cette transition nécessite la libération des facteurs UTP-A et B, du snoRNP U3 et des éléments d'ARNr 5'-ETS²⁵⁴. Elle est suivie d'un remaniement majeur des facteurs de biogenèse des ribosomes présents (Figure 40)²⁸². L'amélioration de la résolution des analyses de structures obtenues par cryo-microscopie électronique permettra de préciser les étapes et les acteurs moléculaires permettant le couplage entre ces clivages précoces et la libération des pré-particules 40S²³⁹.

(ii) Assemblage de la sous-unité 40S

(a) Maturation nucléaire des particules pré-40S précoces

Au cours de la maturation de la particule pré-40S chez les mammifères, les pré-ARNr 21S subissent différents clivages dépendants de snoRNP U3 (aux sites A0, A1 et 2 au sein des séquences 5' et 3'-ETS et ITS1 et ITS2) qui aboutissent à la formation du pré-ARNr 18S-E. Le pré-ARNr 18S-E est ensuite exporté dans le cytoplasme au sein de la particule pré-40S.

Chez la levure, les clivages aux sites A₁ et A₂ sont couplés et indépendants des clivages en A₀^{256,283}. Les clivages précoces aux sites A₁ et A₂ semblent être orchestrés par les endonucléases Utp24 (CIRHIN chez l'homme) et Rcl1, et le recrutement de l'hélicase Dhr1. Toutefois, leur contribution n'est pas complètement élucidée^{254,281,284,285}.

(b) Export et Maturation cytoplasmique des particules pré-40S

Rapidement après leur formation, les particules pré-40S sont exportées au travers du port nucléaire vers le cytoplasme grâce à différents facteurs²³⁹. Chez la levure, l'interaction de la particule pré-40S avec Crm1 facilite son export au travers des pores nucléaires par hydrolyse d'un GTP par la GTPase Gsp1/Ran. La GTPase Gsp1/Ran et l'exportine Crm1/Xpo1 possèdent un signal d'export nucléaire^{235,286,287}. Les facteurs d'assemblage Riok2 (RIO kinase 2) et Tsr1 sont requis pour lier Crm1^{263,288,289}. D'autres karyophérines sont impliquées dans l'export des particules pré-ribosomiques, notamment le complexe TAP/p15 (Mex67/Mtr2 chez la levure), l'exportine principale des ARNm^{275,290}.

Le mécanisme d'export est hautement régulé et constitue un véritable système de contrôle qualité pour s'assurer que seuls les précurseurs matures et fonctionnels soient transportés dans le cytoplasme. Ce contrôle qualité est assuré par les facteurs décrits ci-dessus et par l'assemblage séquentiel de protéines ribosomiques. Ainsi, la petite sous-unité n'est exportée du noyau que

lorsque les protéines RPS15/ uS19, RPS18/uS13 et RPS5/eS25 RPS28/eS28 sont assemblées sur la particule 40S^{291,292}.

Les étapes de maturation cytoplasmique sont également hautement coordonnées. Ces étapes assurent la libération séquentielle des facteurs de biogenèse des ribosomes occupant les zones occupées par les PR périphériques et par des facteurs d'initiation de la traduction les plus tardifs associées et la production de l'ARNr 18S mature²⁹³.

Différentes ATPases sont requises pour former les SU 40S matures chez la levure: l'ATPase Rio2 a un rôle clé au niveau du centre de décodage de l'ARNm (DC) et l'ATPase Rio1 et la GTPase eIF5B activent le clivage du pré-ARNr 20S en ARNr 18S mature^{239,289,294}. De nombreuses fonctions enzymatiques restent à préciser.

L'ensemble de ces étapes constitue un véritable contrôle qualité assurant que seuls les SU 40S fonctionnelles seront capables d'intégrer les ribosomes 80S capable d'initier la reconnaissance de l'ARNm (« scanning ») et le processus de traduction.

(iii) Assemblage de la sous-unité 60S

Certains facteurs de biogenèse sont associés aux ribosomes du nucléole au cytoplasme. Toutefois, l'assemblage de certains FBR peut être transitoire : une fois liés aux particules pré-ribosomiques, ces facteurs exercent leur fonction puis sont libérés²⁹⁵. Ainsi, au cours de la voie de biogenèse de la grande sous-unité, certains groupes de facteurs interviennent précocement au sein du nucléole ou tardivement dans le cytoplasme (Figure 41-42).

(a) Maturation nucléaire des particules pré-60S précoces

L'assemblage de la LSU se fait de façon séquentielle et contribue à la formation de différentes particules pré-60S intermédiaires (Figures 42,43).

La maturation nucléaire de la SU pré-60S est initiée par le clivage au site 2(A₂ chez la levure) au sein de la séquence ITS1 libérant les pré-ARNr nécessaires à l'assemblage de la SSU²³⁹. S'ensuivent différents clivages endo et exonucléolytiques au sein de la séquence ITS2 du pré-ARNr 32S produisant l'ARNr 28S et le pré-ARNr 12S²⁹⁶. Par transposition des études réalisées chez la levure, la maturation du pré-ARNr 12S en ARNr 5,8S se ferait ensuite grâce à une exonucléase 3'-5'. Ces modifications des pré-ARNr sont associées à de nombreux repliements et changements de conformation tridimensionnelle^{176,182}.

Chaque intermédiaire des particules pré-60S en cours de maturation est associé à différents facteurs de biogenèse^{297,298}. Chez la levure, des particules pré-60S ont été purifiées séquentiellement associées aux protéines Npa1p et Ssf1. Ces particules pré-60S comportent différents facteurs de biogenèse des ribosomes dont des snoRNP à boîtes C/D- et H/ACA, de nombreuses hélicases et à la moitié des protéines ribosomiques de la LSU^{299,239,300}. Ensuite, la particule pré-60S est associée à la protéine

Nsa1 et a à ce stade déjà perdu les facteurs de biogenèse les plus précoces et incorporé le complexe 5S-RNP formé de l'ARNr 5S et des protéines RPL11/uL5 et RPL5/uL18. La cinétique d'assemblage et les détails mécanistiques de cette incorporation ne sont pas encore établis^{238,276,300,301}.

Les facteurs de biogenèse associés aux séquences ITS2 joueraient un rôle de protection des pré-ARNr et de coordination des différents clivages²⁷⁶. Les particules pré-60S présentent des spécificités structurales comparées à la LSU mature : l'orientation du complexe 5S RNP est opposée, le centre de transfert du peptide PTC est masqué par des facteurs de biogenèse incluant les GTPases Nog1 et Nog2^{275,276}. Nog1 semble constituer un contrôle qualité de l'intégrité du tunnel de sortie de la chaîne peptidique au sein du noyau²⁷⁶.

Au cours de leur cheminement vers le nucléoplasme, les extrémités 3' des pré-ARNr 12S sont clivées par un clivage endonucléolytique d'après les travaux effectués chez la levure.

Le complexe Rix1 et l'AAA-ATPase Rea1 s'associent ensuite à la particule pré-ribosomique chez la levure (Figure 44). Le recrutement de ce complexe macromoléculaire permet à la 5S-RNP d'acquies sa conformation mature (Figure 44)^{277,302}. L'activité ATPase de Rea1 active la libération de facteurs dont Nog2 et permet de modifier les ARNr formant le PTC et de recruter l'adaptateur d'export Nmd3^{303,304}. Rea1 et Nog2 sont donc des facteurs de contrôle qualité de l'assemblage des particules pré-60S. Le remodelage induit par Nog2 et Rea1 provoque l'export irréversible des ribosomes pré-60S vers le cytoplasme.

(b) Export et maturation cytoplasmique des particules pré-60S

Différents facteurs interagissant à la surface des pré-ribosomes 60S et assurent l'export des pré-particules 60S.

La libération de Nog2 permet la liaison de l'adaptateur d'export Nmd3 aux sites A, P et E et le recrutement de l'Exportin Xpo1 (anciennement appelée Crm1 pour « Chromosome Region Maintenance 1 »)^{238,286,297,303,304}. Nmd3 assure ainsi deux fonctions : elle empêche la liaison prématurée d'AA-ARNt et assure un changement conformationnel facilitant l'export des particules pré-60S³⁰³. D'autres facteurs interviennent pour faciliter l'export des particules pré-60S, notamment en masquant les charges de surface des pré-ribosomes pour créer un environnement hydrophobe facilitant ainsi l'export via les ports nucléaires (Figure 45).

Une fois dans le cytoplasme, les facteurs de biogenèse tardifs sont libérés parallèlement à l'incorporation des protéines ribosomiques manquantes^{235,238,297,303}. Tout d'abord, l'AAA-ATPase Drg1 est activée par sa liaison à la protéine navette Rsl24d1/Rlp24. S'ensuit la libération de Nog1 et de Rsl24d1/Rlp24. La libération de Rsl24d1/Rlp24 est ATP dépendante et dépend de l'interaction entre Drg1 et la nucléoporine Nup116^{273,274,302,305}. La protéine ribosomique Rpl24/eL24 remplace simultanément Rlp24/Rsl24d1 et incorporée au sein de la sous-unité pré-60S en cours de maturation.

Ce remplacement de Rsl24d1/Rlp24 par Rpl24/eL24 permet le recrutement du facteur Rei1 qui coopère avec les facteurs Jjj1 et Ssa pour extraire le facteur d'export Arx1 situé au niveau du tunnel de sortie de la chaîne peptidique³⁰⁶. Arx1 est lié à Alb1 sous la forme d'un dimère. Leur recyclage nucléaire dépend d'une β -karyophérine spécifique, Kap121.

Au cours de l'assemblage de la tige du site P, la PR RPLP0/uL10 est incorporée suite à la libération du facteur Yvh1 et RPL10/uL16 est incorporée suite à la libération du facteur Nmd3 par la GTPase Lsg1^{306,307}.

La dernière étape de maturation avant la génération d'une SU 60S mature consiste en la libération de Tif6 (eIF6 chez les mammifères) par la GTPase Efl1. Efl1 associée à son co-facteur masque largement le site PTC et permet probablement d'assurer un contrôle qualité avant de libérer les SU 60S matures (Tableau 4).

Il a été démontré que la perte de Rei1 provoque l'accumulation du dimère Arx1-Alb1 dans la fraction cytoplasmique et inhibe le décrochage de Tif6 des particules pré-60S et son recyclage vers le noyau. Tif6 est un facteur qui inhibe l'association entre la SSU et la LSU. Le réseau Rei1-Jjj1-Ssa/Arx1-Alb1/Tif6 coordonne donc la libération et le recyclage des derniers facteurs navettes de la pré-60S et constituent le dernier contrôle qualité de la biogenèse des ribosomes avant l'initiation de la traduction^{273,274,295,305,308,309}.

Ces mécanismes moléculaires sont issus d'études sur des modèles de levure et parfois à partir de particules reconstituées *in vitro*. Il est donc important de garder à l'esprit que certains liens entre ces différentes étapes de maturation restent à préciser²³⁹. En ce sens, la publication de la première structure du ribosome humain à une résolution atomique ouvre la voie vers l'isolement et la caractérisation des structures des différents complexes et la validation de leur conservation de ces mécanismes moléculaires chez l'homme et les mammifères^{176,306}.

Ainsi, les différentes étapes de maturation de la sous-unité ribosomique 60S sont orchestrées par de nombreux facteurs d'assemblage assurant tout d'abord l'export des particules pré-ribosomiques (les exportines), puis l'incorporation des PR et enfin les facteurs anti-associatifs qui empêchent les interactions précoces entre les deux sous-unités ribosomiques d'une part et entre les sous-unités et les zones fonctionnelles du ribosome (PTC au sein du site P, site de liaison entre l'ARNm ou DC et ARNt)²³⁷. L'ensemble de ces étapes constitue un mécanisme de surveillance de la biogenèse de la sous-unité 60S.

(iv) Transition entre biogenèse et traduction

Les étapes finales de maturation de la grande sous-unité ribosomique vers l'initiation de la traduction sont encore assez mal définies. À la fin de la biogenèse des ribosomes, une fois les étapes

de maturation cytoplasmique achevée, les particules pré-40S et pré-60S se sont libérées de l'ensemble des facteurs d'assemblage ou « navette » et de PaR tardives^{238,273,277,302,305,310}.

Ces PaR sont alors recyclées pour ré-intégrer d'autres cycles de biogenèse et participer à la fabrication de nouvelles sous-unités. Le recyclage des facteurs exclusivement nucléolaires/nucléaires ne requiert pas de mécanisme particulier. Quelques protéines impliquées dans ce processus sont exclusivement cytoplasmiques.

En revanche, les facteurs navettes présents au sein du cytoplasme à la fin de la biogenèse doivent être réimportés vers le noyau pour participer à un nouveau cycle. Cet import est réalisé par différentes karyophérines. Les mécanismes d'import sont actifs (ATP ou GTP dépendants) et proches de ceux permettant l'import des protéines ribosomiques après leur traduction.

La libération des facteurs pré-ribosomiques de la particule ne suffit pas à leur import et nécessite donc probablement un signal supplémentaire qui leur est fourni à la fin de la biogenèse. La nature de ce signal d'import n'est pas encore connue. Les hypothèses de l'association ou de la dissociation d'une autre protéine, ou de modifications post-traductionnelles (MPT) réversibles sont suggérées.

3.3 Hétérogénéité des ribosomes et de leur biogenèse : au service d'un rôle régulateur de la traduction ?

Depuis leur identification, les ribosomes sont considérés comme les acteurs catalysant la synthèse protéique de façon constitutive. Historiquement, l'ensemble des travaux ayant permis la caractérisation biochimique et l'élaboration de la structure de ces machineries macromoléculaires, ainsi que les technologies utilisées pour établir ces conclusions ont abouti à la formulation d'un dogme suggérant que les ribosomes possèdent une stoechiométrie définie en protéines ribosomiques et en ARNr. De même, il est considéré que la quantité de ribosomes disponibles est régulée en fonction des besoins physiologiques des cellules^{176,311,312}.

En ce sens, une quantité accrue de ribosomes est indispensable au maintien d'un fort taux de prolifération et de croissance cellulaire comme par exemple dans le cas des cellules cancéreuses³¹³.

D'autre part, différentes études ont récemment mis en évidence l'existence d'une hétérogénéité de composition des ribosomes (PR et ARNr) et évalué l'impact fonctionnel de cette hétérogénéité sur la spécificité de l'activité traductionnelle des ribosomes, notamment au sein d'embryon murin et dans des cellules souches embryonnaires murines^{132,134,314}. Les différents niveaux d'hétérogénéité de composition des ribosomes et les connaissances actuelles sur leur impact sur la sélectivité de la traduction seront décrits ci-dessous (Figure 46)^{1,230,314}.

a. Hétérogénéité des ribosomes vers une spécificité fonctionnelle ?

(i) Hétérogénéité des modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Les ARNr sont les molécules portant l'activité traductionnelle des ribosomes. L'hétérogénéité des ARNr commence à émerger et son impact fonctionnel sur l'activité traductionnelle des ribosomes à être étudiée.

Différentes modifications post-transcriptionnelles affectent les ARNr (méthylations de bases, pseudouridilations)^{130,132}. Ces modifications se situent souvent à proximité des zones fonctionnelles du ribosome et sont catalysées par des enzymes dont l'activité est guidée par de petits ARN (snoARN à boîtes C/D et H/ACA respectivement)²⁶⁴.

Une hétérogénéité des modifications post-transcriptionnelles des ARNr et de l'expression des snoARN a été mise en évidence au sein de différents tissus³¹⁵, suggérant un impact fonctionnel sur la biogenèse et l'activité des ribosomes^{132,316 317}.

La modification la plus importante des ARNr est la 2'-O- méthylation catalysée par la Fibrillarine (FBL), une méthyl-transférase guidée par des snoARN à boîte C/D^{2,3}. Des données structurales ont démontré le rôle de cette 2'-O-méthylation dans la stabilité et la structure des ARNr. Des études

génétiques chez la levure ont par ailleurs démontré l'implication de trois 2'-O-méthylations spécifiques dans la régulation de la fidélité de la traduction des ribosomes³¹⁸. De même, la modification du profil de 2'-O-méthylation des ARNr a récemment été associée à l'altération de l'activité des ribosomes contribuant à la dérégulation traductionnelle associée au processus de tumorigenèse dans des cellules humains^{5,319}.

60% des méthylations des ARNr étant situées dans des sites fonctionnels du ribosome, il est probable que de nombreuses modifications des ARNr émergent comme impliquées dans le maintien d'une activité traductionnelle spécifique dans différents modèles physiologiques et pathologiques.

Le développement de technologies de séquençage des 2'-O-méthylations et des pseudouridylations à l'échelle du transcriptome (respectivement les technologies de Ribometh seq et de PSI-seq) permettront de cartographier ces différentes modifications au niveau des ARNr et d'étudier l'implication fonctionnelle de cette hétérogénéité au niveau cellulaire³²⁰⁻³²².

(ii) Hétérogénéité des segments d'extension des ARNr

Les régions les plus variables des ARNr, chez les eucaryotes sont les segments d'extension (SE). Ces régions flexibles sont situées à la périphérie des ribosomes. Les SE exerceraient un rôle de régulation traductionnelle en assurant des interactions moléculaires avec des protéines ribosomiques. Le rôle fonctionnel de quatorze des seize SE présents chez les eucaryotes a été récemment identifié grâce à l'utilisation de mutants pour chacun des SE chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*^{278,323}. La mutation de la plupart des SE induit des phénotypes spécifiques caractérisés par un défaut de croissance cellulaire et une biogenèse des ribosomes altérée à différentes étapes. Les SE sont donc impliqués dans le contrôle de certaines étapes de la biogenèse des ribosomes.

(iii) Hétérogénéité des protéines ribosomiques

(a) Protéines ribosomiques et leurs paralogues

Les paralogues de PR sont issus de copies puis d'intégrations de gènes codant pour certaines PR dans le génome eucaryote. Leur conservation au cours de l'évolution dans différentes espèces suggèrent que les protéines paralogues des PR aient acquis des fonctions différentes et non redondantes au sein du ribosome malgré leur forte homologie de séquence^{232,233,238,239}. Cette hypothèse a récemment été validée chez les eucaryotes (*S.cerevisiae*) par des approches de pertes d'expression démontrant que la déplétion d'une PR ou d'un groupe de PR (Rpl7a/eL8, Rpl12b, Rpl22a et Rps18b) affectait la traduction de certains ARNm (comme *ASH1*) et induisait des phénotypes spécifiques alors que la déplétion de leurs paralogues ne récapitulaient pas ces phénotypes^{132,230}.

Les fonctions de différents couples de PR et de leurs paralogues ont été étudiées. Comme décrit en détail ci-dessus, la PR Rpl22 et son paralogue Rpl22l1 exercent des fonctions antagonistes sur l'émergence des cellules souches hématopoïétiques chez le poisson zèbre^{231,232}. D'autre part, les paralogues des PR Rpl10 (Rpl10l), Rps4 (Rps4x/Rps4y) Rpl39 (Rpl39l) sont exprimés spécifiquement dans les ribosomes des testicules de mammifères, suggérant une importance particulière des fonctions de ces paralogues dans le maintien de la lignée germinale. Le lien fonctionnel de ces protéines avec le ribosome n'est pas clairement établi à l'heure actuelle. Toutefois, Rpl39l a été retrouvée associée aux ribosomes 80S ainsi qu'aux polysomes suggérant une fonction ribosomique plus qu'une fonction extra-ribosomique^{132,324,325}.

(b) Expression des protéines ribosomiques

L'expression tissu-spécifique ou préférentielle des transcrits de certaines PR dans les tissus humains adultes et également dans les tissus embryonnaires murins suggère une spécificité fonctionnelle de ces protéines ribosomiques^{134,326,327}. D'autre part, douze mutants de PR ont été caractérisés dans des modèles murins. Ils récapitulent une grande variété de pathologies tissu-spécifiques telles que l'ataxie cérébelleuse (Rpl27a/eS31), l'infertilité masculine (Rplp1/p1) ou des anomalies de formation du squelette (Rpl38)^{134,328,329}. Ces études suggèrent que certaines protéines ribosomiques exercent une fonction spécifique au cours du développement embryonnaire¹³⁰.

Toutefois, la démonstration mécanistique du rôle de l'hétérogénéité des protéines ribosomiques sur l'activité traductionnelle n'a été établie que récemment. La PR Rpl38/eL38 a été démontrée comme fonctionnellement impliquée dans le développement des vertébrés, notamment dans un modèle murin. Rpl38 est en effet indispensable à l'assemblage de la SU 80S et à la traduction d'un sous-type particulier d'ARNm, les gènes Hox impliqués dans la formation du squelette chez les mammifères^{134,330}. La présence d'une structure IRES en 5'UTR sur les transcrits des gènes Hox, permet la liaison spécifique puis la traduction préférentielle de ces transcrits par les ribosomes possédant Rpl38/eL38^{134,211}

D'autre part, une démonstration de l'impact fonctionnel de l'hétérogénéité de la composition en protéine ribosomique sur la spécificité et la sélectivité de la traduction a été établie très récemment par Shi & Barna¹. Ces derniers ont mis en évidence l'hétérogénéité de la composition en PR des ribosomes au sein d'une lignée de cellules souches embryonnaires murines (CSEm). Des ribosomes composés respectivement des PR Rpl10a/uL1 ou Rps25/eS25 ont ainsi été isolés. Ces ribosomes possèdent une affinité préférentielle pour la traduction de certains sous-groupes de transcrits. Il semble que la régulation traductionnelle médiée par les ribosomes contenant Rpl10a/uL1 ou Rps25/eS25 dépende de structures de type IRES au sein des extrémités 5'UTR de transcrits spécifiques.

La protéine Rpl38/eL38, enrichie dans certaines régions de l'embryon murin, a également été impliquée dans la régulation de transcrits spécifiques (gènes Hox) par initiation de leur traduction via des structures IRES^{1,330}.

De même, Slavov *et al.* ont récemment mis en évidence une différence de stoechiométrie des PR au sein des ribosomes de cellules souches embryonnaires murines et chez la levure *S.cerevisiae*. Cette stoechiométrie est corrélée aux conditions de croissance cellulaire. Slavov *et al.* ont également mis en évidence l'enrichissement de certaines PR dans les polysomes (Rps29 et Rps14) et d'autres dans les monosomes (Rpl11) au sein des CSE murines, suggérant une fonction particulière de ces PR à différents stades du processus de traduction³³¹.

Ces exemples démontrent ainsi l'existence d'un lien fonctionnel entre la composition des ribosomes en PR et leur activité traductionnelle chez les mammifères.

(c) Spécificité des modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques

Certaines PR subissent des modifications post-traductionnelles ou PTM (pour « Post-translational modifications »): acétylation, méthylation, ubiquitylation, phosphorylation, O-GlcNAc glycosylation, Ufmylation^{272,317,332-334}. Ces modifications sont régulées au cours du cycle cellulaire, au cours du développement embryonnaire en réponse au microenvironnement. La caractérisation fonctionnelle de l'impact de ces modifications sur la régulation de la traduction est récente et incomplète pour la plupart des PTM. Seul l'impact fonctionnel de certaines phosphorylations et ubiquitylations sur l'activité des ribosomes a été étudié.

Les phosphorylations de Rps6/eS6 sont étudiées depuis les années 1970. Rps6/eS6 est en effet indispensable à l'initiation de la traduction coiffe-dépendante des ARNm³³⁵. Ces PTM sont catalysées principalement par les kinases S6K1/ S6K2 et en moindre partie par les kinases RSK, PKA, et CK1 sur cinq sites de phosphorylation. Les phosphorylations de Rps6/eS6 sont activées par différentes voies de signalisation dont les voies mTOR et PI3K/Akt. Les fonctions biologiques de ces phosphorylations ne sont pas pleinement élucidées. Toutefois, le développement d'un modèle murin « knock-in » dans lesquels les cinq résidus phosphorylés de Rps6/eS6 ont été mutés (Rps6P^{-/-}) a permis de progresser dans la caractérisation de l'impact phénotypique de ces PTM³³⁶. Ainsi, les souris Rps6P^{-/-} présentent des phénotypes tissus-spécifiques : diminution globale de la masse musculaire et de la taille des myoblastes, métabolisme glucidique altéré, diminution de la taille des cellules β des îlots de Langerhans. Les phosphorylations de Rps6 semblent donc être requises dans le contrôle traductionnel au sein de types cellulaires spécifiques. En ce sens, la régulation des phosphorylations de Rps6/eS6 émergent comme impliquées dans l'initiation du processus de tumorigenèse pancréatique³³⁶⁻³³⁸.

L'impact d'autres événements de phosphorylation de PR a également été décrit fonctionnellement. D'une part, la phosphorylation de Rpl13a est impliquée dans la régulation de la traduction en réponse à l'IFN- γ ³³⁹. D'autre part, la phosphorylation des PR Rps11/uS17, Rps15/uS19, et Rps27/eS27 est corrélée à l'émergence du phénotype neurodégénératif observé dans de la maladie Parkinson³⁴⁰. La seconde PTM affectant le plus fréquemment les PR est l'ubiquitynilation. Cette PTM consiste en l'ajout par liaison covalente d'un résidu de 76 acides aminés sur un résidu Lysine d'une protéine cible. Des études décrivant le rôle fonctionnel de l'ubiquitynilation des protéines ribosomiques dans la réponse à différents stress protéotoxiques s'accumulent³⁴¹. Ces modifications permettraient aux cellules de traduire sélectivement certaines populations d'ARNm et d'adapter leur protéome pour maintenir l'homéostasie du réticulum endoplasmique et plus globalement assurer l'homéostasie cellulaire³⁴².

D'autre part, plus récemment, une PTM spécifique aux eucaryotes proche de l'ubiquitynilation, appelée ufmylation a été identifiée²⁷². Cette PTM semble indispensable au développement embryonnaire et à la différenciation des lignées érythroïdes^{343,344}. Les protéines ribosomiques Rps3/uS3, iS10 et Rpl10/uL16 ainsi que le facteur d'initiation de la traduction eIF6 semblent être les seules PR et PaR ufmylées au sein des ribosomes dans le modèle étudié²⁷². Les auteurs suggèrent que cette PTM puisse participer activement à l'assemblage des deux sous-unités lors de l'initiation de la traduction ainsi qu'aux interactions avec l'ARNm. Toutefois, des études fonctionnelles sont nécessaires pour préciser les conséquences de l'ufmylation sur la biogenèse et l'activité traductionnelle des ribosomes.

La compréhension des fonctions biologiques et des mécanismes moléculaires des PTM affectant les PR n'est aujourd'hui que partielle. Toutefois ces modifications semblent contribuer activement à la régulation de l'activité traductionnelle des ribosomes et à leur spécificité. L'ensemble de ces niveaux d'hétérogénéité des PR est résumé dans la Figure 46.

(d) Hétérogénéité des facteurs associés aux ribosomes ou PaR

En plus des PR, de nombreux facteurs protéiques associés aux ribosomes ou PaR ont été identifiés comme impliqués dans la régulation de la fidélité et de l'efficacité de la synthèse protéique^{130,272,317}.

- ***RACK1 ou Récepteur à la C-kinase 1 activée***

RACK1 a été identifié comme associé aux ribosomes en 1999 par des études de spectrométrie de masse³⁴⁵. L'association de RACK1 aux ribosomes est indispensable à l'initiation de la traduction IRES-dépendante³⁴⁶. RACK1 contrôle ainsi la traduction de sous-populations d'ARNm. RACK1 est activé par la protéine kinase C PKC β II et sa liaison au ribosome stimule la transphosphorylation de eIF6. eIF6 libère alors la sous-unité 60S et permet l'association des deux SU pour constituer des ribosomes 80S. RACK1 permet également le recrutement du complexe « micro-RNA-induced silencing complex » ou

miRISC au niveau des ribosomes et permet ainsi l'inhibition de la traduction médiée par les microARN^{347,348}.

- **Autres protéines associées aux ribosomes ou PaR**

D'autres protéines associées aux ribosomes ont été identifiées plus récemment. Chacune a été décrite comme exerçant une fonction spécifique sur la régulation de la traduction.

Tout d'abord, Lin28 a été identifiée au sein des cellules souches embryonnaires. LIN28 est associée aux ribosomes au niveau du réticulum endoplasmique et inhibe la traduction d'une sous-population spécifique d'ARNm adressés au réticulum endoplasmique^{349,350}.

D'autre part, la protéine FMRP pour « Fragile-X retardation protein », a été identifiée comme associée directement au ribosome au niveau de l'interface entre les deux sous-unités. FMRP possède un motif de liaison aux ARN lui permettant d'inhiber l'élongation de la traduction, probablement en inhibant la liaison de l'ARNt³⁵¹⁻³⁵³.

De façon intéressante, certaines protéines ne possédant pas de motif de liaison spécifique aux ARN ont été décrites comme impliquées dans la régulation de la spécificité de l'activité des ribosomes. Par exemple, le récepteur transmembranaire DCC (pour « deleted in colorectal cancer ») est associé aux ribosomes dans les axones et les dendrites des neurones. L'hypothèse la plus probable est qu'il régulerait ainsi la synthèse protéique globale suite à la liaison du ligand extra-cellulaire Nétrine impliqué dans la plasticité synaptique³⁵⁴.

D'autre part, Simsek *et al.* ont récemment développé une technologie de purification des ribosomes par affinité leur permettant d'identifier des centaines de protéines associées aux ribosomes (PaR). Ces PaR sont impliquées dans des processus biologiques variés allant du métabolisme à la régulation du cycle cellulaire ou encore des enzymes de modification des ARN ou des protéines³¹⁷. Parmi ces enzymes, la PKM (pyruvate kinase du muscle) exerce une fonction de liaison aux ARN et interagit avec la traduction de sous-population spécifique d'ARNm destinées au réticulum endoplasmique.

L'ensemble de ces exemples démontre qu'au delà des facteurs cœur identifiés par des approches biochimiques en conditions salines stringentes, de nombreux autres facteurs sont associés aux ribosomes. Ces facteurs contribuent aux régulations traductionnelles à différents niveaux, en contrôlant la phosphorylation des facteurs d'initiation de la traduction, en modifiant post-transcriptionnellement les PR et/ou en favorisant l'initiation de la traduction coiffe-indépendant de certains transcrits. L'hétérogénéité de ces facteurs associés aux ribosomes participeraient ainsi à la complexité des régulations traductionnelles¹³⁰.

Parallèlement à l'expression des PR, la distribution des facteurs de biogenèse et le taux de synthèse des ARNr des ribosomes a récemment été identifié comme hétérogène au cours du développement embryonnaire, au sein de différents tissus et comme impliqués dans le développement de

pathologies dont certaines ribosomopathies et certains cancers³⁵⁵. Ces aspects vont maintenant être abordés en détails.

(iv) Hétérogénéité de la localisation des ribosomes

Dans les cellules eucaryotes, les ribosomes orchestrent la synthèse protéique au sein de deux sous-compartiments cellulaires majeurs : le cytosol et le réticulum endoplasmique. Les ribosomes du réticulum endoplasmique ont un taux de synthèse protéique plus élevé de 2,5 à 4 fois que celui des ribosomes cytosoliques. Les protéines synthétisées par les ribosomes du réticulum s'accumulent dans les deux compartiments cellulaires. Une partie du protéome cytosolique est donc synthétisée par les ribosomes du réticulum endoplasmique^{356,357}.

D'autre part, des études ont récemment démontré que la localisation des ribosomes est impliquée fonctionnellement dans le maintien de l'identité de cellules spécialisées comme notamment les neurones³⁵⁸.

b. Impact fonctionnel de l'hétérogénéité de la biogenèse des ribosomes en situation pathologique

Des altérations de la biogenèse et/ou de la fonction des ribosomes sont associées à différentes pathologies humaines.

Tout d'abord, les ribosomopathies rassemblent diverses pathologies congénitales rares associées aux ribosomes dans lesquelles des altérations génétiques provoquent des défauts de biogenèse ou d'activité des ribosomes. Parmi ces ribosomopathies, on recense l'anémie de Diamond-Blackfan (DBA), le syndrome 5q-, le syndrome de Treacher Collins (TCS), le syndrome de Shwachman Diamond (SDS), la cirrhose amérindienne infantile ou encore la dyskératose congénitale liée au chromosome X (DC-X). Ces pathologies présentent une symptomatologie clinique hautement tissu-spécifique suggérant une sensibilité particulière de certains types cellulaires à un niveau de biogenèse des ribosomes et/ou une composition et une régulation différentes des ribosomes et de leur biogenèse au sein des différents tissus et organes (Figure 47)³⁵⁹.

D'autre part, les patients atteints de ribosomopathies présentent une susceptibilité augmentée au développement de cancers. En ce sens, des anomalies de la biogenèse des ribosomes et de leur fonction sont impliquées dans la tumorigenèse chez l'homme. La voie p53, très fréquemment altérée dans de nombreux cancers, est en effet l'un des mécanismes de surveillance de la traduction activé suite à des défauts de biogenèse des ribosomes.

L'implication directe d'altérations impactant l'hétérogénéité de la composition des ribosomes dans des pathologies humaines sera détaillée dans ce chapitre.

(i) l'anémie de Diamond-Blackfan ou DBA

L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) est une pathologie dans laquelle la mutation de certaines PR provoque une anémie sévère par défaut de différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules de la lignée érythroïde. Elle se caractérise également par d'autres symptômes comme des malformations congénitales au niveau cardiaque, urogénital et des membres³⁶⁰. Des mutations dans les gènes des PR S17, S10, S17, S19, S24, S26, L5, L11, L15 et L35A ont été mises en cause dans la DBA. L'insuffisance médullaire est la cause principale de décès chez les patients atteints de DBA.

D'autre part, les patients atteints de DBA ont 5 fois plus de chances de développer des cancers que la population générale et en particulier un risque multiplié par 28 et par 36 de développer des leucémies myéloïdes aiguës, des ostéosarcomes et des cancers colorectaux, respectivement³⁶¹.

(ii) le syndrome 5q-

Le syndrome 5q- est une myélodysplasie dans laquelle une délétion dans le chromosome 5 est à l'origine de l'haplo-insuffisance de la PR S14/uS11 conduisant à une activation constitutive de TP53 au sein des progéniteurs hématopoïétiques. Il en résulte un défaut de formation des progéniteurs des plaquettes, les mégacaryocytes et des progéniteurs érythrocytaires. Les patients présentant le syndrome 5q- présentent une anémie macrocytaire et sont dépendants de transfusions sanguines³⁶².

(iii) Le syndrome de Treacher Collins ou TCS

La mutation du gène *TCOF1* codant pour la protéine « Treacle », impliquée dans la transcription des ADNr et la méthylation des ARNr, est responsable du syndrome de Treacher Collins. Les patients atteints du TCS présentent des malformations craniofaciales^{359,363}. L'haploinsuffisance de *Tcof1* dans des modèles murins provoque une diminution globale de la production de ribosomes et une baisse de la prolifération des cellules de l'ectoderme et de la crête neurale provoquant principalement une malformation des os du visage.

(iv) Le syndrome de Schwachmann Diamond ou SDS

Le syndrome de Schwachmann-Diamond est caractérisé par un dysfonctionnement du pancréas exocrine associé à une mauvaise absorption des nutriments ou malnutrition, un défaut de croissance, des anomalies osseuses, une insuffisance médullaire caractérisée par une hématopoïèse inefficace avec des cytopénies affectant une ou plusieurs lignées, et une susceptibilité accrue au développement de syndromes myélodysplasiques et de leucémies aiguës myéloïdes^{364,365,367}.

Chez la plupart des patients, le SDS est associé à la mutation du gène *SBDS* impliqué dans la maturation cytoplasmique tardive des particules pré-60S^{366,367}.

SBDS coopère avec le facteur d'assemblage Efl1 pour permettre la libération du facteur d'initiation de la traduction eIF6. La mutation du gène codant pour la protéine *SBDS* provoque un défaut de

maturation de la sous-unité 60S par absence d'enlèvement du facteur eIF6 (Tif6 chez la levure) dans l'étape finale de maturation du ribosome avant l'assemblage avec la sous-unité 40S^{355,368}, comme décrit précédemment. SBDS perturbe la biogenèse des ribosomes par liaison aux ARNr³⁶⁹.

En 2015, Zambetti *et al.* ont développé un modèle cellulaire murin permettant d'élucider l'impact phénotypique de la perte de *Sbds*. En effet, ces derniers ont généré des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices murines présentant une expression diminuée de *Sbds*³⁶⁹. Ainsi, la perte de la protéine *Sbds* affecte spécifiquement le maintien des lignées myéloïdes et leur différenciation en myélocytes, par activation de TP53 et induction de l'apoptose notamment. Toutefois, les progéniteurs hématopoïétiques proliférant activement sont insensibles à la diminution d'expression de *Sbds*. Ce modèle expérimental met donc en lumière la dépendance spécifique des lignées myéloïdes à un niveau d'expression élevé de *Sbds* comparée à l'indépendance des progéniteurs hématopoïétiques proliférant activement et a permis d'élucider l'origine moléculaire du défaut de la lignée myéloïde observée chez les patients atteints de SDS.

(v) La cirrhose amérindienne infantile ou NAIC

La cirrhose amérindienne infantile (NAIC pour « North American Indian Cirrhosis ») se présente d'abord sous la forme d'un ictère néonatale chez un enfant autrement en bonne santé. Cet ictère progresse en cirrhose de type biliaire dans l'enfance et dans l'adolescence puis en hypertension portale. Le taux de survie à l'âge adulte est inférieur à 50% et la seule thérapie efficace à l'heure actuelle demeure la transplantation hépatique³⁷⁰.

La NAIC est une ribosomopathie affectant exclusivement le foie. Elle est provoquée par la mutation du gène *CIRH1A* codant pour la protéine CIRHIN. L'homologue de la CIRHIN chez la levure est Utp4, une protéine impliquée dans le processome de la petite sous-unité du ribosome. Utp4 est essentiel à la maturation de l'ARNr et la formation de la petite sous-unité du ribosome³⁷¹. Au cours du développement embryonnaire murin, la protéine Cirhin est très spécifiquement exprimée au niveau du foie³⁷². Des approches de pertes d'expression de l'homologue de la Cirhin dans le poisson zèbre ont confirmé que le phénotype de la NAIC était spécifique au tissu hépatique. L'insuffisance du tissu hépatique résulte probablement de l'activation de TP53 suite à l'altération de la biogenèse des ribosomes³⁷³. La biogenèse des ribosomes hépatiques semble donc être un processus dépendant d'un facteur tissu spécifique et qui n'est pas compensé par d'autres FBR.

(vi) La dyskératose congénitale liée à l'X ou DC-X

La dyskératose congénitale liée à l'X est caractérisée par une insuffisance médullaire, un défaut de développement cranio-facial, un vieillissement prématuré, une leucoplasie des muqueuses, une fibrose pulmonaire interstitielle et une susceptibilité accrue au développement de cancers^{364,374,375}.

Des mutations ponctuelles du gène codant pour la dyskérine DKC1 provoquent la dyskératose congénitale liée à l'X³⁷⁶. La dyskérine est une pseudouridyl-synthase nucléolaire nécessaire à l'activité de la télomérase et impliquée dans la pseudouridylation des ARNr³⁷⁷,

Des défauts de traduction IRES-dépendante de certains sous-types d'ARNm codant pour le suppresseur de tumeur p27, et des facteurs anti-apoptotiques Bcl-xL et XIAP) ont été mis en évidence dans des modèles murins de la DC-X et chez les patients^{375,378,379}. D'autre part, des défauts de l'activité de la dyskérine ont été impliqués dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques expliquant en partie le phénotype des patients atteint de DC-X³⁸⁰.

Toutefois des études récentes utilisant des iPSC dérivées de patients atteints de DC-X n'ont pas identifiées d'altérations de pseudouridylation des ARNr ou de composition de pré-ARNr dans ces iPSC. En revanche, ces modèles ont révélé un défaut de l'homéostasie de télomères et une diminution de la voie de signalisation WNT. La dyskérine ayant à la fois un rôle sur l'homéostasie des télomères et la biogenèse des ribosomes, il est complexe d'établir la contribution respective de chaque mécanisme dans la physiopathologie de la DC-X. Ces contradictions sont peut-être liées au type cellulaire, les iPSC dérivées de patients qui pourraient posséder des protéines catalysant les pseudouridylations absentes dans les modèles murins.

(vii) Tumorigenèse et biogenèse des ribosomes

Au cours de la transformation maligne, la biogenèse des ribosomes est stimulée (augmentation de la transcription de l'ADNr) suite à l'activation de nombreux oncogènes et à la dé-répression de gènes suppresseurs de tumeurs (respectivement PI3K/Akt, mTOR, Ras/Raf/Erk, Myc et pRb et p53)^{381 382}. Ces oncogènes activent en particulier la transcription de gènes codant pour les PR, ainsi que celle des ARNr par le biais d'une augmentation de l'activité de l'ARN polymérase I, permettant ainsi le maintien du phénotype hyperprolifératif des cellules cancéreuses³⁸³.

En plus de ces altérations globales, des modifications spécifiques de l'expression des protéines ribosomiques (mutations de PR, surexpression de transcrits codant pour les PR, haploinsuffisance de PR), de la biogenèse des ribosomes et des modifications post-transcriptionnelles des ARNr (altération des niveaux d'expression de la FBL et des snoRNP) émergent comme impliquées dans la régulation de la traduction au cours de la tumorigenèse^{4,5,178,384,385}.

Ces différentes altérations seront décrites ci-dessous.

(a) Implication des PR dans la tumorigenèse

Les modifications de l'expression des transcrits des PR sont fréquentes dans les tumeurs³⁸⁶. Toutefois, ces observations sont pour la plupart corrélatives et nous ne disposons pas de preuves de l'existence de lien causal entre ces altérations et l'émergence de cellules tumorales. Ainsi, les PR

RPL15/eL15 et *RPL19/eL19* sont surexprimées dans les cancers gastriques et *RPL7A/eL8*, *RPL19/eL19*, *RPL37/eL37* dans les carcinomes prostatiques^{387–389}.

Chez l'homme, des mutations de différentes PR sont décrites au sein de tumeurs hématologiques et solides (Tableau 5). Différentes hypothèses mécanistiques sont proposées pour expliquer le lien entre les mutations de ces PR et l'augmentation de la susceptibilité au développement de certaines tumeurs. Une étude chez le poisson zèbre a démontré que l'haplo-insuffisance de différentes PR favorisait la tumorigenèse³⁹⁰. Les PR seraient des supresseurs de tumeurs dont l'haplo-insuffisance favorise le développement de tumeurs chez le poisson zèbre. D'autre part, des PR mutées contribueraient à la formation de ribosomes favorisant la traduction de transcrits oncogéniques et participeraient ainsi activement à la tumorigenèse. Il est également suggéré que ces PR mutées puissent induire un stress nucléolaire en réponse à une altération de la biogenèse des ribosomes qui résulte en une augmentation de l'instabilité génomique et favorise la tumorigenèse^{383,391}. Toutefois, la plupart des mutations de PR identifiées dans les cancers sont différentes des mutations identifiées chez les patients atteints de ribosomopathies^{391,392}. Des études fonctionnelles permettront de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents et de préciser le rôle des mutations de PR dans les cancers.

Enfin, de nombreuses PR exercent des fonctions cellulaires extra-ribosomiques telles que la réparation de l'ADN, la transcription et la maturation des ARN ou l'activation de l'apoptose^{226,233,393–395}. Certaines de ces fonctions extra-ribosomiques seraient détournées au profit des cellules cancéreuses pour permettre leur prolifération illimitée par échappement aux contrôles du cycle cellulaire, leur transformation oncogénique, la perte de contact intercellulaire et l'échappement à l'apoptose. En ce sens, il a été établi que les protéines RPS13/uS15, RPS3A/eS1, RPL13A/uL13, RPL23/uL14, RPL22/eL22 et bien évidemment les protéines RPL5/uL18 et RPL11/uL5 ont été démontrées comme impliquées à différents niveaux dans le processus de tumorigenèse^{225,389}.

(b) Altérations des profils d'expression des ARNr et des snoRNP dans la tumorigenèse

La plupart des études se concentrent sur le lien entre l'hétérogénéité de la composition des PR et la tumorigenèse. Toutefois, des altérations des ARNr, molécules catalysant l'activité biologique des ribosomes ont également été impliquées dans la tumorigenèse^{4,5,382}. Comme indiqué précédemment, la modification la plus fréquente des ARNr est la 2'-O-méthylation. Elle est catalysée sur plus de 105 sites de l'ARNr par la fibrillarine ou FBL²⁶⁴. La FBL est une méthyltransférase dont l'activité est guidée par les snoARN à boîtes C/D assurant sa spécificité.

Des altérations du niveau d'expression de la FBL ont été identifiées dans des carcinomes mammaires, pulmonaires et prostatiques, souvent associées à un mauvais pronostic^{5,396–398}. D'autre part, dans les carcinomes mammaires et colorectaux, une corrélation inverse entre la FBL et TP53 a été

démontrée. TP53 réprime la transcription de la FBL⁵. Les cellules cancéreuses dépourvues de TP53 (par mutation ou délétion) présentent donc une augmentation de la FBL et donc de la 2'-O-méthylation de leurs ARNr. Cette altération des modifications post-transcriptionnelles des ARNr est suivie par une diminution de la fidélité de la traduction en faveur de l'initiation de la traduction IRES-dépendante de transcrits oncogéniques et favorise ainsi la survie et la transformation néoplasique. Une étude complémentaire a validé l'interdépendance entre la FBL et p53 par des approches de perte d'expression³⁹⁶.

D'autre part, l'expression de divers snoARN et de snoRNP à boîtes C/D et H/ACA a été identifiée comme altérée dans différents cancers. L'augmentation de l'expression de certains snoARN pourrait participer à la tumorigenèse en augmentant globalement la biogenèse des ribosomes mais également en générant des ribosomes spécifiques plus adaptés aux besoins et au maintien des cellules cancéreuses³⁹⁹. Les snoRNP sont également régulés par TP53 et ainsi impliqués dans la tumorigenèse⁴⁰⁰.

(c) La biogenèse des ribosomes, une cible thérapeutique redécouverte pour le développement de chimiothérapies

Les cellules cancéreuses présentent un phénotype cellulaire hyper-prolifératif dont le maintien est possible par augmentation de la synthèse protéique globale, la sur-activation de voies de signalisation oncogéniques et l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, les cellules cancéreuses présentent une proportion de ribosomes et une synthèse des ARNr et des PR plus importante notamment grâce à l'augmentation de l'activité de l'ARN polymérase I.

Les ribosomes et leur biogenèse ont donc été envisagés comme des cibles thérapeutiques prometteuses et pertinentes pour le développement de nouvelles chimiothérapies plus spécifiques et moins toxiques (Figure 48).

Le premier médicament ciblant spécifiquement l'ARN polymérase I a été développé suite à un criblage cellulaire. Son efficacité a été validée dans un modèle murin de lymphomes des cellules B induits par l'oncogène c-Myc. La stratégie thérapeutique est une combinaison de l'inhibition de la biogenèse des ribosomes et de la traduction en ciblant l'ARN polymérase I et la voie PI3K/Akt/mTORC1 par les inhibiteurs CX-5461 et l'évérolimus respectivement^{4,179,382,401,402}. Le CX-5461 cible spécifiquement les cellules tumorales en induisant un stress génotoxique dépendant de p53 sans atteindre les lymphocytes B non-transformés^{401,402}. D'autre part, il a récemment été démontré que CX-5461 est capable d'induire l'apoptose en activant les voies ATM-ATR dans un modèle de leucémie lymphoblastique aigüe ainsi que l'autophagie en activant les voies de signalisation mTOR dans un modèle d'ostéosarcomes⁴⁰².

CX-5461 est actuellement en phase I d'essai clinique dans des cancers hématologiques et en phase I/II dans les carcinomes mammaires de stades avancés¹⁸⁰. Dans les modèles murins, ce traitement augmente les rémissions et améliore la survie globale.

D'autre part, différentes chimiothérapies largement prescrites dans les protocoles thérapeutiques actuels, décrites initialement comme perturbant spécifiquement la réplication de l'ADN ont été démontrées comme interférant avec la transcription de l'ARNr, l'ARN polymérase I et plus largement avec la biogenèse des ribosomes^{381,384}.

Parmi ces molécules, le 5-Fluorouracile (5-FU) est un anti-métabolite largement prescrit dans des protocoles de chimiothérapies de première ligne dans différents cancers solides et notamment les cancers colorectaux. Les effets cytotoxiques du 5-FU ont longtemps été expliqué par son impact sur la réplication de l'ADN, notamment, l'inhibition de la réplication de l'ADN et la création de cassures double-brin⁴⁰³. Toutefois, il a été démontré que l'effet cytotoxique du 5-FU était lié à sa capacité à interférer avec le métabolisme des ARN : incorporation dans les ARNr et modification de la traduction d'ARNm associés aux ribosomes⁴⁰⁴. L'impact du 5-FU sur la traduction a été élucidé récemment dans une lignée cellulaire de cancer colorectal : le 5-FU induit indirectement une reprogrammation du protéome via une traduction accrue d'une population d'ARNm en modulant la synthèse de microARN³⁸⁵. D'autre part, le 5-FU est incorporé à faibles doses dans les ribosomes. Le 5-FU pourrait donc exercer un impact indirect et direct sur l'activité traductionnelle.

L'oxaliplatine est un dérivé de sel de platine largement utilisé dans les protocoles de chimiothérapie, et notamment dans la prise en charge des cancers colorectaux et gastriques. Il est souvent associé au 5-FU et à l'acide folique (protocoles FOLFOX). L'oxaliplatine était jusqu'à présent considéré comme un agent alkylant perturbant la réplication de l'ADN par formation de ponts intrabrins. Toutefois, une étude récente utilisant une approche génétique par interférence ARN a démontré que contrairement aux autres sels de platine, l'oxaliplatine avait un mode d'action bien particulier : la cytotoxicité de l'oxaliplatine est causée par la génération d'un stress ribosomique et non par la génération de dommages au niveau de l'ADN. Ce mécanisme moléculaire présente donc un rationnel permettant rétrospectivement d'expliquer les différentes indications des sels de platine et potentiellement de prédire les patients ou organes susceptibles de bénéficier de ce traitement¹⁷⁸.

La dépendance des cellules cancéreuses à une biogenèse des ribosomes plus importante et/ou spécifique ouvre la voie à l'identification de biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitement ainsi qu'au développement de molécules thérapeutiques ciblant plus spécifiquement la biogenèse des ribosomes « cancéreux »^{178,179,385,405}. Un inhibiteur spécifique, réversible et puissant de la biogenèse de la sous-unité 60S a ainsi récemment été développé dans un modèle d'eucaryotes inférieurs⁴⁰⁶

(h) Altérations des mécanismes de surveillance des ribosomes et pathologies

Différents mécanismes moléculaires permettent d'expliquer le développement des ribosomopathies et l'implication des altérations de la biogenèse des ribosomes dans la tumorigenèse.

Des défauts de biogenèse majeurs activent différentes voies de surveillance du ribosome et de sa biogenèse et induisent l'apoptose des cellules présentant cette altération. Ces voies de surveillance sont la plupart du temps inactivées ou altérées dans les cellules cancéreuses et expliquent en partie le rôle des altérations des ribosomes et de leur biogenèse dans les cellules tumorales^{226,407,408}.

D'autre part, des défauts de biogenèse plus mineurs peuvent également avoir un impact sur l'activité des ribosomes et sa fidélité de la traduction aboutissant à un protéome altéré et au développement de phénotypes pathologiques, ribosomopathies ou tumeurs en fonction des transcrits dont la traduction est altérée^{355,409}.

- **Activation de la voie de signalisation T53 dans les ribosomopathies**

Le mécanisme de surveillance de la biogenèse des ribosomes et de l'intégrité génomique le plus fréquemment activé dans les ribosomopathies est la voie du facteur de transcription suppresseur de tumeur TP53 (Figure 49).

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation de TP53 suite à une dysfonction du ribosome sont aujourd'hui bien connus (Figure 50)^{407,410,411}. Les protéines ribosomiques RPL11/uL5 et RPL5/uL18 associées à l'ARNr 5S forment un complexe ribonucléoprotéique appelé 5S-RNP et contrôlent l'activation de TP53 et l'arrêt du cycle cellulaire⁴¹⁰. Lorsque la biogenèse des ribosomes est perturbée ou en cas d'haplo-insuffisance de PR, le complexe 5S-RNP s'associe à la E3-ubiquitine-ligase MDM2 plutôt qu'aux pré-ribosomes 60S⁴¹². Cette association conduit à la dissociation du complexe MDM2/TP53 et à la stabilisation de TP53 par défaut d'adressage au protéasome. Le complexe 5S-RNP (RPL11/RPL5/ARNr 5S) est activé en réponse à des stress oncogéniques ou réplicatifs qui provoquent respectivement une augmentation ou un ralentissement de la transcription des ARNr et créent un déséquilibre dans la biogenèse des ribosomes⁴⁰⁸ (Figure 39). La stabilisation de TP53 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire puis l'engagement des cellules dans des processus de sénescence, d'apoptose ou l'activation de la différenciation^{411,413}. Le complexe 5S-RNP est donc un acteur critique à l'interface de voies de signalisation contrôlant la croissance et la prolifération cellulaire.

D'autre part, des voies de signalisation autres que le complexe 5S-RNP sont capables d'activer TP53 en réponse à un défaut de biogenèse des ribosomes. Ainsi, la voie ARF contribue de manière non redondante à l'activation de TP53 suite à l'activation de l'oncogène c-Myc⁴¹⁴.

- **Activation des mécanismes de surveillance des ribosomes et de leur biogenèse indépendants de TP53**

L'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de l'apoptose en réponse à un stress nucléolaire sont également observés dans des modèles cellulaires mutés ou délétés en p53^{415,416} suggérant que d'autres voies de signalisation soient activées pour induire l'arrêt du cycle cellulaire en l'absence de TP53 fonctionnel.

Différents mécanismes ont été suggérés tels que: l'existence d'autres molécules senseurs de stress au sein du nucléole, un rétrocontrôle entre le niveau d'expression des protéines ribosomiques et l'activité des microARN, un rôle de l'axe RPL11/uL5 et du facteur de transcription E2F-1, ou l'activation de p27^{Kip1} par diminution de l'expression de la kinase PIM1 suite à un défaut de biogenèse des ribosomes⁴¹⁵⁻⁴¹⁹.

On recense également l'activation des voies de contrôle de l'intégrité génomique ATM-ATR, les voies de maintien de l'intégrité de l'architecture nucléolaire et notamment l'organisation de l'hétérochromatine des ADNr ou encore l'activation de l'autophagie.

D'autre part, RPL11/uL5 régule la réponse au stress nucléolaire via l'axe MDM2-T53 mais également en inhibant la transcription et l'activité de l'oncogène c-Myc. RPL11/uL5 agirait en empêchant le recrutement du co-activateur transcriptionnel TRRAP au niveau des régions promotrices des gènes cibles de c-Myc et en liant l'extrémité 3'UTR du transcrite de c-Myc^{420,421}. La liaison de RPL11/uL5 sur l'extrémité 3'-UTR de c-Myc serait augmentée en condition de stress nucléolaire. Ainsi, le stress nucléolaire par la libération de RPL11/uL5 et contribuerait ainsi également à diminuer les taux de c-Myc et les taux d'expression de la protéine c-Myc⁴²⁰. c-Myc étant un inducteur puissant de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique, l'axe RPL11/uL5- c-Myc se trouverait au carrefour de la régulation de ces processus. Ces études démontrent ainsi l'importance de la fonction extra-ribosomique de RPL11/uL5 dans la réponse au stress nucléolaire.

Ainsi, l'altération de la biogenèse ou de la stoechiométrie des ribosomes conduit à l'activation de différents mécanismes de contrôle qualité et de protection de l'intégrité cellulaire^{389,411}. Ces mécanismes de contrôle qualité des ribosomes et de leur biogenèse (TP53 et E2F1, ATM-ATR dépendants notamment) sont très fréquemment inactivés ou détournés dans les cellules cancéreuses. On comprend ainsi comment des altérations de la biogenèse des ribosomes sont tolérées dans les cellules tumorales et participent activement au maintien d'un protéome tumoral.

- **Altérations de la traduction des ARNm**

L'altération de la traduction spécifique de certaines sous-populations d'ARNm suite à un défaut de biogenèse des ribosomes participerait également au processus de tumorigenèse et à la susceptibilité accrue au développement de cancers observée chez les patients atteints de ribosomopathies.

En effet, la traduction de certains ARNm pourrait être retardée par accumulation de ribosomes mal formés ou modifiés présentant une fidélité de traduction réduite. En effet, en plus des modifications quantitatives, des altérations qualitatives de l'activité des ribosomes ont été identifiées dans les ribosomopathies et dans des cancers présentant des mutations de PR^{5,134,330,377,380,392,396,409}.

Ainsi, le rôle de la fibrillarine dans la tumorigenèse illustre l'impact de l'altération des ribosomes sur la traduction et la transformation cellulaire. Des ribosomes altérés auraient une affinité préférentielle pour la traduction de transcrits codant pour des protéines oncogéniques, notamment via des mécanismes d'initiation IRES-dépendants⁴⁰⁵.

c. Hétérogénéité de la biogenèse des ribosomes au cours du développement

(i) Régulation de la biogenèse des ribosomes au cours du développement embryonnaire et dans les cellules souches

Le rôle spécifique de la biogenèse des ribosomes dans la régulation de la traduction et le maintien de l'identité cellulaire est de plus en plus reconnu au sein de la communauté scientifique^{1,132,134,211,314,317,422}.

La biogenèse des ribosomes a toutefois longtemps été envisagée comme un processus conservé au cours de l'évolution et constitutif au cours des différents stades développementaux. Ainsi les mécanismes moléculaires et les facteurs de biogenèse des ribosomes (FBR) identifiées chez la levure ont été transposés directement chez les métazoaires²⁷⁹. Toutefois, des études récentes ont démontré qu'un grand nombre de FBR étaient spécifiques aux mammifères, suggérant au delà de la dimension de l'organisme, qu'un rôle tissu et/ou cellule spécifique de ces facteurs était envisageable^{242,251,255}.

De plus, des données émergent sur l'hétérogénéité de la biogenèse au cours du développement et le rôle spécifique de certains FBR dans le maintien de l'identité des cellules souches comparées aux cellules différenciées^{2,3,143,279}. Différents facteurs de biogenèse des ribosomes (FBR) sont surexprimés dans les cellules souches comparées aux cellules différenciées dans plusieurs modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* au sein de nombreuses espèces : levure, drosophile, poisson zèbre, souris. La délétion de gènes codant pour des FBR est souvent létale aux stades précoces du développement embryonnaire. Ainsi, les mutations perte de fonction des gènes codant pour la Fibrillarine (Fbl) ou pour Notchless (Nle) conduisent à un défaut de l'embryogenèse précoce au stade pré-implantatoire dans les embryons murins (Figure 51)^{423,424}. Ces FBR sont donc indispensables au cours de l'embryogenèse. L'étude du rôle de ces facteurs nécessite donc la mise en place de modèles expérimentaux de perte de fonction conditionnelle, l'utilisation de modèles de différenciation *in vitro*

avec des cultures de cellules souches embryonnaires ou *in vivo* pour l'études de populations particulières de cellules souches⁴²⁵.

La plupart des études fonctionnelles des FBR ont pour l'instant été réalisée dans des organismes modèles comme la levure *S.cerevisiae*, le poisson zèbre, la drosophile et plus récemment dans des cellules souches murines²⁷⁹. Il est donc important de valider le rôle biologique des FBR sur l'homéostasie des cellules souches dans des cellules de mammifères.

Chez l'homme, la mutation de FBR spécifiques au sein de l'embryon provoque le développement de pathologies hautement tissus-spécifiques appelées ribosomopathies. Les phénotypes pathologiques décrites précédemment suggèrent l'implication des FBR dans le maintien de l'homéostasie de certaines sous-populations de cellules souches adultes chez les mammifères^{137,366,371,372,419,426-430}.

En effet, le syndrome de Schwachman-Diamond ou maladie de Schwachman est causé par des mutations perte de fonction du gène *SBDS* impliquées dans la biogenèse des ribosomes. Il a récemment été démontré que la perte du gène *SBDS* affectait spécifiquement la lignée myéloïde et les myélocytes et pas les progéniteurs hématopoiétiques³⁶⁶. *SBDS* est donc indispensable au maintien des cellules souches myéloïdes mais pas à celui des progéniteurs hématopoiétiques.

De même *Notchless* (*Nle*), un facteur de biogenèse de la grande sous-unité ribosomique pré-60S a été identifiée comme indispensable à la biogenèse des ribosomes des cellules souches hématopoiétiques adultes murines mais pas dans les progéniteurs engagés. Ainsi, différentes voies de biogenèse des ribosomes seraient utilisées en fonction de l'identité cellulaire⁴³¹.

La Fibrillarine a récemment été caractérisée comme impliquée spécifiquement dans l'homéostasie et l'identité de cellules souches embryonnaires murines respectivement^{2,137}.

D'autre part, d'autres gènes codant pour des FBR présentant une expression tissu-spécifique et ont été démontrés comme impliqués dans l'homéostasie de cellules souches ou de progéniteurs hépatobiliaires, de cellules neurales, de progéniteurs pancréatiques et hématopoiétiques chez le poisson zèbre^{373,432-434}.

Le rôle de ces FBR dans l'homéostasie des cellules souches sera détaillé la partie 3.3 b. « spécificité de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches embryonnaires »^{2,435}.

(ii) Différentes étapes de la biogenèse des ribosomes sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie des cellules souches

(a) La transcription des ARNr est impliquée dans l'homéostasie des cellules souches

L'une des caractéristiques des cellules souches est de posséder un taux de synthèse des ARNr supérieur aux cellules différenciées. En effet, au cours de la différenciation, les facteurs de transcription lignées-spécifiques provoquent une diminution globale de la synthèse de l'ARNr⁴³⁶. Cette diminution de synthèse des ARNr a longtemps été considérée comme une conséquence du

processus de différenciation. Toutefois, des études récentes ont démontré que la diminution de la transcription de l'ADNr suffisait à activer l'engagement des cellules dans le processus de différenciation. Ce processus semble conservé puisqu'il a été observé au sein de cellules souches de drosophile et de mammifères^{437,438}.

Récemment Sanchez *et al.* ont soulevé un paradoxe dans un modèle de cellules souches germinales de drosophile, en démontrant qu'au cours de la différenciation, bien que le taux de transcription de l'ADNr soit globalement réduit, la synthèse protéique globale était augmentée dans les cellules différenciées⁴³⁹. D'autres études ont également mis en évidence des augmentations de la synthèse protéique globale au cours de la différenciation dans différents modèles expérimentaux de différenciation des cellules souches et viennent également souligner ce paradoxe^{131,440,441}. Les cellules souches hématopoïétiques illustrent parfaitement la complexité de cette question. En effet, la synthèse protéique des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est plus faible que celles de leurs progéniteurs engagés qui dérivent des CSH. Toutefois, les CSH sont plus sensibles à une perturbation de la biogenèse des ribosomes induite par la modification du taux d'expression de PR telles que Rpl24⁴⁴¹. Ainsi, cette étude de Signer *et al.* suggère l'existence d'une régulation qualitative complexe de la traduction en fonction de l'état de différenciation de ces cellules souches adultes.

Le taux de synthèse protéique étant généralement corrélé au taux de synthèse de l'ARNr, ces études suggèrent l'existence de mécanismes de régulation de la traduction indépendants de la régulation de la transcription de l'ADNr et impliqués dans le maintien de l'identité des cellules souches ou leur engagement dans le processus de différenciation. Les mécanismes de régulations de la synthèse protéique indépendants ou découplés de la transcription des ARNr restent à découvrir⁴³⁷.

Une des hypothèses soulevées est que l'augmentation du taux de synthèse de l'ARNr au sein des cellules souches leur permettrait de conserver des ribosomes pour assurer la synthèse de leur protéome « indifférencié » tout en préparant un stock de ribosomes voués à traduire le protéome de cellules filles engagées au cours de leur différenciation en fonction des signaux du microenvironnement⁴⁴⁰.

Une autre hypothèse est d'envisager les régulations entre la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique sur le plan qualitatif plutôt que sur le plan quantitatif. En effet, la surexpression de certains FBR au sein des cellules souches pourrait contribuer à l'incorporation spécifique de certaines PR, à leurs modifications post-traductionnelles ou à la liaison d'autres FBR en aval. Ces FBR contribueraient ainsi à modifier la structure des ribosomes et peut-être *in fine* leur affinité pour traduire certaines sous-populations d'ARNm sans modifier le taux de traduction global⁴⁴¹⁻⁴⁴³. En ce sens, la surexpression de la Fibrillarine induit une hyperméthylation des ARNr conduisant à la formation de ribosomes présentant une affinité préférentielle pour la traduction des ARNm

possédant une structure IRES (c-MYC, FGF1, VEGFA) par rapport aux ARNm possédant une coiffe en 5'⁵. La Fibrillarine exerce donc une régulation qualitative de la traduction.

Les travaux qui seront publiés dans les années à venir permettront sans doute d'élucider les mécanismes moléculaires de la régulation de la synthèse protéique et leur rôle dans la transition des cellules souches vers la différenciation en situation physiologique ou pathologique^{135,437,441,444}.

(b) Contrôle épigénétique et transcriptionnel de la biogenèse des ribosomes impliqués dans le maintien de l'identité souche

- ***Bmi1 active la transcription de PR spécifiques nécessaires à la l'érythropoïèse***

La protéine BMI1 appartient à la famille des protéines Polycomb (PcG) qui régulent la structure de la chromatine. Ces protéines sont entre autres impliquées dans la régulation épigénétique de l'identité des cellules souches et également la tumorigenèse. Les protéines PcG modifient l'accessibilité des promoteurs de nombreux gènes codant pour des protéines effectrices de l'identité souche et notamment le maintien des lignées erythroïdes et lymphoïdes. Gao *et al.* ont récemment démontré que Bmi1 était impliquée dans l'engagement des progéniteurs erythroïdes vers la dernière étape de différenciation de l'érythropoïèse chez l'homme et la souris¹⁴⁴.

De façon intéressante, la perte d'expression de Bmi1 au sein des progéniteurs erythroïdes conduit à une diminution de la transcription de plusieurs PR et perturbe la biogenèse des ribosomes. On observe également une stabilisation de TP53 puis de p21. Ainsi, au sein des progéniteurs erythroïdes, Bmi1 est capable de s'associer aux promoteurs de gènes codant certaines protéines ribosomiques requises pour la dernière étape de différenciation de ces progéniteurs. Bmi1 affecte donc l'identité des progéniteurs des lignés erythroïdes au moins en partie en régulant la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse¹⁴⁴.

- ***MXD1 est un facteur de transcription nucléolaire enrichi dans les cellules souches embryonnaires régulant la transcription des ARNr***

Le facteur de transcription MXD1 a récemment été identifié comme exprimé dans les cellules souches embryonnaires et des lignées de carcinomes et de leucémies⁴⁴⁵. MXD1 est une protéine nucléolaire agissant comme un répresseur transcriptionnel associé à la protéine MAX, notamment en réprimant la transcription de l'oncogène MYC. MXD1 est lié aux régions de l'ADNr transcrites et colocalise avec le facteur UBF, un facteur de transcription recrutant l'ARN polymérase I sur les régions promotrice de l'ADNr, ainsi que dans les régions intergéniques ribosomiques. La délétion de MXD1 par interférence à ARN induit une augmentation de la synthèse des pré-ARNr alors que son expression forcée la diminue. Ces résultats suggèrent le rôle de la protéine MXD1 dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches embryonnaires.

(c) *Rôles de FBR dans le contrôle de l'homéostasie des cellules souches*

Des FBR sont recrutés au cours de la transcription des ARNr et ils interviennent dans toutes les étapes de la biogenèse des ribosomes. Certains d'entre eux émergent comme étant différentiellement exprimés et fonctionnels dans les cellules souches comparées à leurs progéniteurs engagés ou aux cellules différenciées. Les FBR pour lesquels il existe une validation fonctionnelle ou l'hypothèse d'un rôle fonctionnel dans le maintien de l'identité souche seront décrits. Pour une revue exhaustive, voire les tableaux de la revue Brombin *et al.*, 2015²⁷⁹.

- ***Modifications post-transcriptionnelles des ARNr lors de la synthèse de la particule 90S***

- *La fibrillarine et la 2'-O-méthylation*

Comme décrit ci-dessus, la Fibrillarine est un FBR impliqué dans la maturation des particules pré-90S en catalysant les 2'-O-méthylations sur les pré-ARNr^{2,4,424}.

La Fibrillarine a récemment été identifiée comme surexprimée dans les cellules souches embryonnaires murines et impliquée dans le maintien de leur pluripotence de ces dernières². Le rôle spécifique de la Fibrillarine dans le maintien des CSE murines sera détaillé dans la partie b. Spécificité de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches embryonnaires murines.

- *Enzymes catalysant les pseudouridylations de l'ARNr*

Différentes enzymes catalysant des pseudouridylations des ARNr ont été identifiées comme impliquées dans le développement et le maintien de sous-populations de cellules souches embryonnaires ou adultes^{439,446}.

Notamment les pseudouridylations catalysées par la dyskérine. Cette isomérisation des uridines en pseudouridines peut influencer différents processus cellulaires de régulation de l'expression génique comme la régulation de l'efficacité de la traduction, l'épissage et la régulation de la longueur des télomères⁴⁴⁶. Ainsi, la dyskérine est également impliquée dans l'assemblage et le maintien de la stabilité des télomères.

Des mutations inactivatrices du gène codant pour la dyskérine sont à l'origine de la dyskératose congénitale. Cette maladie se caractérise par une insuffisance hématopoïétique par défaut du maintien de sous-populations de cellules souches hématopoïétiques. Toutefois, la dyskérine étant multifonctionnelle, les mécanismes moléculaires responsables du syndrome sont controversés.

Des études réalisées chez le poisson zèbre, la souris et plus récemment dans un modèle humain ont en effet mis en évidence le rôle de la perturbation de la biogenèse des ribosomes dans l'altération de la traduction et le développement de cette maladie^{374,377,379}. Toutefois, une autre étude utilisant des cellules souches induites (iPSC) dérivées de patients atteints de dyskératose congénitale liée à l'X démontre que les iPSC de patients mutés pour la dyskérine présentent un défaut d'activité de la télomérase et un défaut de synthèse des télomères, mais pas de défaut de pseudouridylation des

ARNr, suggérant que la DC soit principalement causée par un défaut de synthèse des télomères⁴⁴⁷. Cette étude s'appuie sur le fait que les mutations d'environ 10 gènes différents impliqués dans le maintien de l'intégrité des télomères sont en effet capable de provoquer la dyskératose congénitale⁴⁴⁷. Ainsi, les altérations de la pseudouridylation des ARNr ne semblent pas être l'étiologie principale de la dyskératose congénitale liée à l'X, mais cette hypothèse reste à confirmer.

- ***FBR impliqués aux différentes étapes d'assemblage de la particule 90S***

Différentes étapes de l'assemblage des pré-particules 90S ont été décrites comme impliquées dans le maintien de l'identité de cellules souches ou progénitrices et l'homéostasie de certains tissus.

Ainsi, la protéine Bms1 à activité GTPase est une protéine de biogenèse des ribosomes conservée assurant le recrutement de la nucléase Rcl1 qui permet *in fine* la synthèse de l'ARNr 18S⁴⁴⁸. Une étude publiée en 2012 a démontré que Bms1 est indispensable au maintien des hépatoblastes au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre^{254,432}. Ainsi, les embryons de poissons zèbres dépourvus de Bms1 présentent très rapidement une insuffisance hépatique. La protéine Bms1 est donc spécifiquement importante dans le maintien de l'identité des hépatoblastes.

De nombreux facteurs d'assemblage impliqués notamment dans la maturation de la particule pré-90S ont été identifiés comme enrichis dans les cellules souches germinales chez la drosophile par Sanchez *et al.* suggérant une activité de biogenèse des ribosomes plus importante⁴³⁹. Ces derniers ont démontré que la perte d'expression de ces facteurs conduisait à un défaut de différenciation des cellules souches germinales. Les facteurs d'assemblage des particules pré-90S sont donc indispensables à la différenciation de cellules souches en cellules germinales fonctionnelles chez la drosophile.

- ***Biogenèse des particules pré-40S***

La protéine Mbn (pour « Mushroom body miniature ») a récemment été identifiée grâce au développement de mutants de drosophile comme requise spécifiquement et indispensable à la maturation de la petite sous-unité ribosomique au sein des neuroblastes, mais facultative au sein des neurones ou des cellules ganglionnaires⁴⁴⁹. Ainsi, la protéine Mbn est un FBR de la petite sous-unité ribosomique indispensable à l'homéostasie des progéniteurs neuraux.

D'autre part, plusieurs facteurs du processome de la petite sous-unité ribosomique ont été identifiés comme enrichis dans les cellules souches embryonnaires murines. Un crible de perte d'expression par ARN interférents a en effet démontré leur rôle dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires murines³. La surexpression de ces facteurs permettrait le maintien d'une biogenèse des ribosomes et d'une synthèse protéique globale très active favorisant un taux de traduction élevé, en particulier pour des facteurs de transcription clés de la pluripotence comme Pou5f1, Nanog, Esrrb et Sox2 dont le temps de demi-vie protéique est court, environ 90 min.

- **Biogenèse des particules pré-60S**

Différents facteurs de biogenèse impliqués dans la maturation de la sous-unité 60S ont émergé comme impliqués dans l'homéostasie des cellules souches.

Notchless (Nle) est l'orthologue murin du facteur de maturation de la sous-unité 60S Rsa4 chez la levure. Notchless est impliqué entre autre dans l'export de la sous-unité pré-60S du noyau vers le cytoplasme^{275,298,304}. Le Bouteiller *et al.* ont été les premiers à démontrer *in vivo* la spécificité et la nécessité du FBR Notchless pour le maintien des cellules souches hématopoïétiques murines, mais pas dans les progéniteurs engagés (Figure 51)¹³⁷. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'un ou plusieurs FBR non-identifié(s) viennent prendre le relais de Notchless et assure l'export de la particule pré-60S au sein des progéniteurs engagés. Ainsi, l'exemple de Nle suggère que des FBR spécifiques seraient impliquées dans le maintien des différentes identités cellulaires et tissulaires.

Comme décrit ci-dessus, la ribosomopathie de Schwachman-Diamond est un syndrome provoqué par la mutation du gène *SBDS* et caractérisé cliniquement par une insuffisance médullaire résultant en une neutropénie congénitale^{365,366}. *SBDS* est un facteur de maturation cytoplasmique tardif des particules pré-60S³⁶⁷. *SBDS* coopère avec le facteur d'assemblage Efl1 pour permettre la libération du facteur d'initiation de la traduction eIF6. La physiopathologie et l'étiologie moléculaire de cette maladie ne sont pas complètement élucidées. En 2015, Zambetti *et al.* ont développé un modèle expérimental permettant d'évaluer l'impact phénotypique de la perte de *Sbds*. Ces derniers ont généré des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices murines partiellement délétées en *Sbds*³⁶⁹. La diminution de l'expression de la protéine *Sbds* affecte spécifiquement le maintien des lignées myéloïdes et leur différenciation en myélocytes par activation de mécanismes TP53 dépendants et induction de l'apoptose. De façon intéressante, les progéniteurs hématopoïétiques proliférant activement sont insensibles à cette diminution d'expression de *Sbds*. Ce modèle expérimental met donc en lumière la dépendance spécifique des lignées myéloïdes au facteur *Sbds* et à une biogenèse des particules pré-60S plus importante. Les progéniteurs hématopoïétiques engagés prolifèrent eux indépendamment de *Sbds*.

La protéine Nol9 est une polynucléotide 5'-kinase, non ribosomique, impliquée dans la biogenèse des ribosomes⁴⁵⁰. *NOL9* est nécessaire pour le clivage des régions ITS2 des pré-ARNr permettant la synthèse des 28S et 5,8 S et la formation de la sous-unité 60S. Une étude a récemment démontré dans un modèle de poisson zèbre muté pour *Nol9* que le défaut de clivage de la séquence ITS2 provoquait une insuffisance pancréatique, hépatique et digestive ainsi qu'une diminution drastique du nombre de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques résultant en un déficit des érythrocytes et des lymphocytes⁴⁵¹. Les insuffisances pancréatiques et hématopoïétiques dans les

poissons zèbres mutants sont directement liés à un défaut de formation des cellules progénitrices respectives par altération de la biogenèse des ribosomes en l'absence de Nol9. En revanche, les mécanismes moléculaires conduisant à la diminution des cellules progénitrices suite à la perte de Nol9 semblent être différents au sein du pancréas et du système hématopoïétique. En effet, un mécanisme TP53 dépendant semble contribuer à l'épuisement des cellules souches hématopoïétiques alors des mécanismes TP53 indépendant sont mis en place au sein du compartiment pancréatique.

De façon intéressante, une stimulation globale de la traduction au sein des mutants Nol9 ne rétablit ni les déficiences pancréatiques ni hématopoïétiques. Ces observations suggèrent ainsi que la protéine Nol9 exerce une régulation quantitative et également qualitative de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches. D'autre part, différents types mécanismes de surveillance de l'intégrité des ribosomes seraient mis en place au sein de différents types cellulaires pour activer l'arrêt du cycle cellulaire.

Les cellules de la crête neurale sont des cellules multipotentes formées au cours de la neurulation et à l'origine des tissus mésenchymateux et de la formation du squelette craniofacial⁴²⁹. La perturbation de l'homéostasie et de la différenciation de ces cellules au cours du développement embryonnaire conduit à la formation d'un ensemble de pathologies dénommées neurocristopathies. La compréhension de la physiopathologie moléculaire des neurocristopathies a récemment progressé par la mise en évidence d'un défaut de la biogenèse des ribosomes affectant spécifiquement la survie des cellules de la crête neurale et impliquant la maturation de l'ARNr 28S de la sous-unité pré-60S. Cette étude propose donc que les neurocristopathies soient considérées comme des ribosomopathies spécifiques des cellules souches neurales. De nombreux symptômes sont en effet communs entre les neurocristopathies et les ribosomopathies comme l'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) ou encore le syndrome de Treacher-Collins (TCS)^{409,430,452}.

- ***Protéines nucléolaires aux fonctions multiples ?***

La nucléoline est une protéine multifonctionnelle, principalement présente dans le nucléole, mais également détectable dans le nucléoplasme, le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique. La nucléoline est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (organisation de la chromatine, métabolisme de l'ADN et de l'ARN, prolifération, réponse aux stress). Toutefois, sa fonction principale est sa participation à différents niveaux du processus de biogenèse des ribosomes de la transcription de l'ADNr, la synthèse des pré-ARNr, leur clivage à l'assemblage et la maturation du ribosome^{453,454}. La nucléoline est surexprimée dans différents cancers. Son expression semble plus importante dans les cellules souches de carcinomes pulmonaires non à petites cellules alors qu'au

sein des glioblastomes, l'expression de la nucléoline est corrélée à une faible sous-population de cellules souches de glioblastome et donc prédictive de réponse au traitement⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷. D'autre part, une équipe a récemment mis en évidence le rôle de la nucléoline dans le maintien des cellules souches neurales de rat⁴⁵⁸. La déplétion de la nucléoline par ARN interférence induit la différenciation des cellules souches neurales *in vitro*. De plus, une étude a récemment mis en évidence le rôle de la nucléoline dans le maintien de la clonogénicité des cellules souches embryonnaires⁴⁵⁹. La déplétion de la nucléoline *in vitro* induit en effet l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose des CSE murines notamment en activant des mécanismes p53-dépendants. L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle de la nucléoline dans le maintien de sous-populations particulières de cellules souches. Toutefois, le lien entre l'impact de la nucléoline sur le phénotype des cellules souches et sa fonction dans la biogenèse des ribosomes reste à définir.

Recher *et al.* ont mis en évidence l'existence d'une signature génétique spécifique au sein d'une sous-population de cellules souches neurales au sein de l'embryon de poisson zèbre. Cette signature implique des gènes impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr comme la FBL, Nop56 et Nop58 et également dans des étapes plus tardives comme Notchless, impliqué dans la maturation de la sous-unité pré-60S¹⁴³. Différents FBR spécifiques contribueraient ainsi au maintien de la biogenèse des ribosomes dans cette sous-population de cellules souches. Cette étude n'a toutefois pas démontré l'implication fonctionnelle de ces FBR dans le maintien de la sous-population cellulaire de cellules progénitrices neurales chez l'embryon de poisson zèbre.

d. Rôle de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches embryonnaires murines

Plusieurs protéines nucléolaires impliquées dans la régulation de la biogenèse des ribosomes ont été identifiées comme importantes dans le maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires murines (CSEm). Le rôle de ces FBR intervenant à différents niveaux de la maturation des ribosomes et leur impact fonctionnel sur l'homéostasie des CSE seront détaillés ci-dessous.

(i) Rôle du taux de transcription des ARNr

Le maintien d'un taux de transcription de l'ADNr approprié est indispensable à l'homéostasie des CSEm. Ainsi, 17 facteurs impliqués dans le maintien de la pluripotence sont capables de se lier aux loci de l'ADNr. Le facteur de transcription de la pluripotence OCT4 a été identifié aux mêmes sites de liaison sur les ADNr de cellules souches embryonnaires murines et humaines^{437,438}. De plus, le traitement des cellules souches embryonnaires murines par un inhibiteur de la transcription des

ADNr provoque leur différenciation et leur apoptose. Le maintien d'un taux de transcription élevé des ARNr est donc indispensable à la survie des CSE murines.

D'autre part, la 2'-O-méthyl-transférase Fibrillarine a été identifiée comme capable de méthyler à la fois les pré-ARNr en formation et les histones H2A au niveau des loci de l'ADNr. Ces méthylations des histones permettent le recrutement de l'ARN polymérase I et renforcent la synthèse des ARNr et le processus global de biogenèse des ribosomes^{399,460}. La FBL est enrichie dans les CSE murines et impliquée dans leur pluripotence. La capacité de la FBL à stimuler la synthèse des ARNr participe donc probablement à son rôle dans le maintien de la pluripotence des CSE murines. La fonction de la FBL dans le maintien de la pluripotence des CSE murines sera abordée ci dessous (partie (iii)).

(ii) Rôle de la protéine Mki67ip/NIFK

Mki67ip et la nucléophosmine (NPM) sont deux protéines nucléolaires associées et surexprimées dans les CSE et dans les étapes précoces du développement embryonnaire. Leur expression diminue drastiquement au cours de la différenciation¹²⁷. Un criblage gain de fonction a permis d'identifier la protéine Mki67ip comme impliquée dans le maintien de la pluripotence¹²⁷. La nucléophosmine est également un FBR nucléolaire surexprimé dans les cellules souches et certains cancers⁴⁶¹. Mki67ip et la nucléophosmine agissent ainsi au sein d'un même complexe moléculaire pour orchestrer le maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires.

Le rôle de Mki67ip dans la biogenèse des ribosomes a été identifié récemment par Pan *et al.*⁴⁶². Mki67ip/NIFK est impliquée dans le clivage de la séquence ITS1 et permet la séparation des pré-particules 40S et 60S. La délétion de Mki67ip/NIFK provoque principalement un défaut de formation des ARNr 28S et 5,8S. Mki67ip/NIFK contribue à la biogenèse des ribosomes via son motif de liaison à l'ARN⁴⁶². Mki67ip/NIFK est transactivé par c-Myc, un régulateur clé de la biogenèse des ribosomes.

La délétion de Mki67ip/NIFK induit la différenciation des cellules souches embryonnaires murines (la diminution de l'expression des marqueurs de pluripotence et l'augmentation de l'expression des marqueurs lignées spécifiques) et un arrêt de leur prolifération via un arrêt du cycle cellulaire dépendant de TP53. Le mécanisme de l'activation de TP53 suggéré et la stabilisation de ce dernier par le complexe 5S-RNP (RPL5/RPL11/ARNr 5S) libéré suite à la perturbation de la biogenèse des ribosomes. Ainsi ces travaux soulignent l'importance de protéines nucléolaires régulant la biogenèse des ribosomes dans le maintien de l'identité des cellules souches à savoir leur pluripotence et leur clonogénicité.

(iii) Rôle de la Fibrillarine

La fibrillarine est une 2'-O-méthyltransférase catalysant les modifications post-transcriptionnelles des ARNr et leur maturation au sein des particules pré-90S. La FBL est également capable de méthyler les histones H2A et de stimuler la synthèse des ARNr.

La FBL est indispensable aux étapes pré-implantatoires du développement embryonnaires murins⁴²⁴. Toutefois, son rôle dans la survie et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires murines (CSEm) n'a été décrit que récemment. En effet, Watanabe-Susaki *et al.* ont démontré que le maintien d'un taux d'expression stable de la méthyltransférase permettait de prolonger la pluripotence des CSEm même en l'absence de LIF, une condition de culture favorisant leur entrée en différenciation. À l'inverse, une perte d'expression même partielle de la FBL active l'engagement des CSEm vers la différenciation vers la lignée neuronale. On observe en effet une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation spécifiques des neurones². D'autre part, la FBL ainsi que d'autres facteurs du complexe de méthylation de l'ARNr (NOP56 et NOP58) ont été identifiés comme surexprimés dans d'autres modèles de cellules souches adultes notamment, dans les neuroblastes de drosophile et dans certains progéniteurs neuro-épithéliaux chez le poisson zèbre¹⁴³.

(iv) Rôle du processome de la petite-sous unité ribosomique

Un crible de perte de fonction par ARN interférents a permis d'identifier six gènes codant pour des protéines du processome de la petite sous-unité du ribosome impliqués dans l'homéostasie des cellules souches embryonnaires murines (*Krr1*, *Ddx47*, *Ddx52*, *Nol6*, *Pdcd11* et *Rrp7a*). Comme décrit ci-dessus, le processome de la petite sous-unité du ribosome assure la maturation des pré-ARNr 18S et la formation des particules pré-40S. Ces protéines de la petite sous-unité du ribosome sont exprimées préférentiellement dans les cellules souches embryonnaires murines et nécessaires à leur maintien. Réciproquement, la délétion de facteurs de transcription clé de la pluripotence (*Esrrb*, *Nanog*, *Pou5f1*, *Sox2*, *Tbx3*, et *Tcl1*) induit une diminution de la plupart des composants du processome de la petite sous-unité du ribosome dont *Krr1*, *Wdr43* et *Mpp10*³. La surexpression de ces facteurs permettrait aux CSE murines de maintenir un taux de traduction globale élevé pour maintenir l'expression protéique des facteurs de transcription de la pluripotence ayant un temps de demi-vie court comme *Nanog* et *Esrrb*.

D'autre part, ces protéines de biogenèse de la petite sous-unité contribuent à la reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites. Certains composants du processome de la petite sous-unité du ribosome sont donc fonctionnellement impliqués dans le maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires murines.

RÉSULTATS

1. Préambule: Rlp24 est un facteur de biogenèse de la particule pré-60S chez la levure

Pour rappel, la protéine Rsl24d1, à laquelle je me suis intéressée au cours de ma thèse, est l'homologue eucaryote supérieur de la protéine Rlp24 chez la levure. En l'état, l'essentiel des connaissances établies sur Rsl24d1/Rlp24 ont été obtenues chez la levure et constituent le point de départ de mes travaux de thèse. Ces connaissances seront résumées en préambule aux résultats obtenus lors de ma thèse.

a. Structure de Rlp24 et de Rsl24d1 et homologie avec la protéine ribosomique Rpl24/eL24

(i) Structure de la protéine Rlp24 et homologie avec Rsl24d1

La protéine Rlp24 a initialement été isolée associée à Nog1 et Nog2 sur des particules pré-60S chez la levure (Figure 52)²⁷⁴. Rlp24 est constituée de 199 acides aminés chez la levure *S.cerevisiae* contre 163 pour Rsl24d1 chez l'homme et la souris. L'extrémité N-terminale de Rlp24 est conservée et contient une structure en doigts de zinc composée de 4 cystéines conservées au sein des paralogues Rlp24-like (rlp24p) mais seulement la moitié sont conservées au sein des paralogues Rpl24-like (rpl24a,rpl24b) (Figure 53). La conservation de ces protéines Rlp24-like chez les eucaryotes suggère que les protéines Rlp24 et Rlp24l exercent toutes les deux des fonctions importantes et non-redondantes.

Les séquences peptidiques de Rsl24d1 sont très conservées entre les mammifères. Les séquences peptidiques murines et humaines de Rlp24/Rsl24d1 sont en effet identiques à 98,2% et similaires à 99,4% (Figure 54).

La conservation de la séquence peptidique de Rlp24/Rsl24d1 est moins importante entre les mammifères et les levures : l'identité entre la protéine Rlp24/Rsl24d1 chez la levure et chez les mammifères est de 44% et la similarité de 59% (souris et hommes) (Figure 55).

(ii) Homologie entre les séquences peptidiques de Rlp24/Rsl24d1 et Rpl24

Les séquences peptidiques de Rlp24 et de son homologue Rpl24 diffèrent, notamment au niveau de leurs extrémités C-terminale chez *S.cerevisiae*. Rlp24/Rsl24d1 présente en effet une extension C-terminale absente de Rpl24 (Figure 57)³¹⁰. Les séquences C-terminale de Rlp24/Rsl24d1 établissent donc probablement des contacts avec des facteurs associés aux ribosomes et/ou des extensions d'ARNr au cours de la maturation des ribosomes. D'autre part, chez la levure, Rlp24 et Rpl24 présentent des localisations sub-cellulaires différentes, suggérant des fonctions moléculaires

différentes²⁷⁴. Au sein du ribosome, Rpl24/eL24 se trouve à l'interface avec la petite sous-unité 40S chez les Archaea¹⁶⁹. Ces observations ont récemment été validées dans le ribosome humain où Rpl24/eL24 établit un pont moléculaire avec la sous-unité 40S (pont eB23) impliqué dans un changement conformationnel lors de la rotation de la sous-unité 40S par rapport à la sous-unité 60S (Figure 26, 29)¹⁷⁶.

Chez la souris, les séquences peptidiques de Rsl24d1 et Rpl24 sont identiques à 29% et similaires à 42% (Figure 56, uniprot). La séquence peptidique de Rpl24/eL24 est conservée entre les mammifères (100% d'identité et de similarité entre les séquences de Rpl24 murines et humaines).

b. Rlp24, un facteur navette de biogenèse de la particule pré-60S

(i) Rlp24 est un facteur navette associé aux particules pré-60S

Chez la levure, la protéine Rlp24 présente majoritairement une localisation nucléolaire. Toutefois, elle est également détectée au sein du nucléoplasme et transitoirement au sein du cytoplasme²⁷⁴. À l'inverse, des expériences d'immunofluorescence ont démontré que la PR Rpl24 présente une localisation exclusivement cytoplasmique²⁷⁴.

De nombreuses protéines impliquées dans les étapes de maturation précoces des particules pré-ribosomiques présentent une localisation exclusivement nucléaire et/ou nucléolaire. La localisation cytoplasmique de Rlp24 suggère donc que ce facteur soit impliqué dans des étapes de maturations tardives des sous-unités-60S. Saveanu *et al.* ont en effet démontré en 2003 que Rlp24 était un facteur navette transitant entre le noyau et le cytoplasme associé aux particules pré-60S jusque dans la fraction cytoplasmique dans le modèle de levure.

(ii) Rlp24 est un facteur de la biogenèse des particules pré-60S chez la levure

Rlp24 est associée aux particules pré-ribosomiques pré-60S précoces et tardives. On la retrouve en effet associée aux précurseurs pré-ARNr 27S et 7S chez la levure.

Saveanu *et al.* ont démontré que la déplétion de Rlp24 altérait la maturation des ARNr et provoquait une diminution globale de la quantité de sous-unités 60S libres formées et une augmentation relative des sous-unités 40S libres non incorporées²⁷⁴. D'autre part, cette déplétion provoque une accumulation des pré-ARNr intermédiaires 35S et 27SB ainsi que la formation d'un intermédiaire aberrant 23S formé par le retard du clivage du précurseur 35S²⁷⁴. Rlp24 n'étant pas associé physiquement au précurseur 35S, l'accumulation de cet intermédiaire est probablement indirecte et liée à une perturbation globale de la voie de biogenèse de la sous-unité 60S (Figure 60). En revanche, Rlp24 est associé physiquement aux précurseurs 27SB présents dans les complexes associés à Nog1

(Figure 54,60). La déplétion de Rlp24 ou de Nog1 bloque le clivage du pré-ARNr 27SB ainsi que les étapes de maturation suivantes comme la formation du précurseur 7S²⁷⁴. Plus précisément, Rlp24 est nécessaire pour le clivage de l'espaceur interne 2 (ITS2) au site 3 du pré-ARNr 27S situé entre les ARNr mature 5,8S et 25S chez la levure^{273,274,463}.

Il est important de noter que la déplétion de Rlp24 contrairement à celle de Nog1 aboutit à la formation de complexes pré-60S instables, suggérant l'implication de Rlp24 à la fois dans la biogenèse et la stabilisation des sous-unités pré-60S ou bien que Nog1 intervienne plus tardivement que Rlp24 à un moment où la sous-unité pré-60S est plus stable.

c. Rôle de Rlp24 dans le recrutement de Nog1 au sein des particules ribosomiques pré-60S

Les données de structure du ribosome de levure suggèrent que la GTPase Nog1 se lie au sein de la particule pré-ribosomique 60S par son extrémité N-terminale (NTD) orientée en direction du PTC (Fig. 52a)²⁷⁶. D'autre part, le domaine GTPase et le NTD de Nog1 interagissent respectivement avec Nog2 et Nsa2. Le domaine C-terminal de Nog1 entoure la particule pré-60S sur un quart de son périmètre au niveau de la tige P0/uL10 et du centre de transfert de la liaison peptidique. Nog1 établit des interactions avec les facteurs d'assemblage Tif6, Rlp24, Arx1, ainsi qu'avec les PR Rpl3/uL3, Rpl31/eL31, Rpl22/eL22, Rpl19/eL19, Rpl35/uL29, et différentes hélices d'ARNr de cette région.

De plus, Saveanu *et al.* ont également démontré par des approches de co-immunoprécipitation que la GTPase Nog1 interagissait directement et spécifiquement avec Rlp24. En effet, Rlp24 s'associe précocement aux particules pré-60S nucléolaires et guide l'assemblage de Nog1 au sein de ces complexes. Nog1 associé à Rlp24, assure dans un second temps le recrutement et la liaison de Nog2. En plus des données expérimentales, l'interaction entre Rlp24 et Nog1 a récemment été capturée par une analyse de cryo-microscopie électronique de précurseurs pré-60S nucléoplasmiques purifiés à partir d'un épitope de Nog2 (Figure 57)²⁷⁶.

Le domaine C-terminal de Nog1 s'imbrique à une longue hélice (résidus 85 à 130) de l'extrémité C-terminale de Rlp24. Ces données suggèrent l'assemblage séquentiel de ces deux facteurs puis leur libération sous la forme d'un sous-complexe. En effet, par la suite le complexe Nog1-Rlp24 est libéré et la protéine Rlp24 est remplacée simultanément par la protéine ribosomique eL24/Rpl24 (Figure 58,59).

L'ensemble de ces données a permis d'établir un modèle d'assemblage séquentiel des facteurs Rlp24, puis Nog1 et Nog2 au cours de la maturation cytoplasmique des sous-unités pré-60S^{273,274,276,295}.

d. **Drg1 initie la libération de Rlp24 et les étapes de maturation cytoplasmique de la sous-unité pré-60S**

(i) L'extrémité C-terminale de Rlp24 interagit avec l'AAA-ATPase Drg1

En 2010, Lo *et al.* ont émis l'hypothèse que l'extension C-terminale de Rlp24, qui diffère significativement de celle de Rpl24/eL24, puisse être impliquée fonctionnellement dans la maturation et/ou l'export des particules pré-60S. Pour tester cette hypothèse, ces derniers ont développé une souche de levures mutantes délétées des 53 acides aminés C-terminaux de Rlp24 (Rlp24ΔC). L'expression de Rlp24ΔC à un niveau proche de Rlp24 endogène provoque un défaut de croissance, une diminution de la formation de sous-unités 60S matures et une accumulation de la protéine mutée dans le cytoplasme. Toutefois, le mutant Rlp24ΔC conserve sa capacité à s'associer aux pré-ribosomes 60S. Ces données suggèrent que le domaine C-terminal de Rlp24 n'est pas le domaine permettant la liaison de Rlp24 aux particules pré-60S. Une fois Rlp24 associée aux particules pré-60S, son domaine C-terminal est toutefois requis pour assurer sa fonction dans la biogenèse des ribosomes, probablement en établissant des interactions avec d'autres facteurs de maturation du ribosome. Lo *et al.* ont ensuite démontré par des approches de co-immunoprécipitation que l'extrémité C-terminale de Rlp24 permettait l'interaction spécifique avec l'AAA-ATPase Drg1, une enzyme identifiée par Pertschy *et al.* comme catalysant la libération de Rlp24^{273,295,309,310,463} (Figure 58,59). Nog1 est lui présent à la fois dans les particules associées à Rlp24 et Rlp24ΔC mutantes. L'interaction de Nog1 avec l'extrémité C-terminale de Rlp24 a lieu aux niveaux des résidus amino-acyl C-terminaux 85 à 130 alors que le mutant Rlp24ΔC est dépourvu des résidus 146 à 199^{276,310}. Rlp24ΔC bloque donc spécifiquement l'interaction avec Drg1.

(ii) L'AAA-ATPase Drg1 : structure et fonction

Drg1 est une protéine contenant deux domaines AAA à activité ATPase nommés D1 et D2 et un domaine N-terminal formant une plateforme d'interaction avec des protéines adaptatrices dont la nucléoporine Nup116, nécessaire pour l'activité de Drg1 *in vivo*. Drg1 est active sous forme d'une structure homohexamérique.

Les fonctions de l'extrémité N-terminale de Drg1 ont été établies par homologie de séquence avec l'ATPase Cdc48⁴⁶⁴. Drg1 présente en effet une forte homologie avec Cdc48 (47 % d'homologie des séquences des domaines AAA) chez la levure et l'orthologue de Cdc28 chez les mammifères p97/VCP. Les domaines D1 et D2 convertissent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP en force mécanique pour agir sur des substrats spécifiques. Par homologie avec les domaines de p97/VCP, le domaine D1 est celui qui permet l'assemblage de Drg1 en structure hexamérique, sa forme active, alors que le domaine D2 est considéré comme le site catalytique principal^{273,302,464,465}.

Chez la levure, Drg1 est un facteur exclusivement cytoplasmique associé aux particules pré-60S Arx1, agissant très rapidement après l'export de ces particules via les ports nucléaires. La protéine Drg1 est en effet capable de se lier à des séquences peptidiques particulières des nucléoporines Nup116 (Figure 45,55)³⁰⁵. L'activité de Drg1 est essentielle à la maturation de la sous-unité pré-60S et au recyclage du facteur navette Nog1^{274,295}. La délétion de Drg1 ou sa mutation provoque en effet une rétention de Nog1 et Rlp24 sur les particules pré-60S contenant Arx1 dans le cytoplasme²⁷³. Drg1 permettrait donc directement la libération de Rlp24-Nog1 puis les étapes de maturation cytoplasmique suivantes des particules pré-60S dont la libération de Arx1 puis celle du facteur Tif6. Cette hypothèse a été vérifiée en 2012. Kappel *et al.* ont démontré que Rlp24 est capable de recruter Drg1 au sein des particules pré-60S dans le cytoplasme et d'induire un changement conformationnel du domaine D2 de Drg1. Ce changement conformationnel active l'hydrolyse de l'ATP au sein du domaine D2 de Drg1 et permet la libération directe et spécifique de Rlp24 qui active par la suite les libérations des facteurs Nog1, Arx1 et Tif6 des particules pré-60S isolées *in vitro*^{274,302,310}. Le décrochage de Rlp24 des sous-unités pré-60S est donc un processus actif nécessitant l'hydrolyse d'ATP et l'interaction de Drg1 avec la nucléoporine Nup116. Par la suite une seconde étape d'hydrolyse d'ATP au sein du domaine D1, permet la dissociation de Drg1 sous forme monomérique et sa séparation de Rlp24. Les facteurs sont ensuite dissociés et recyclés pour entrer dans d'autres cycles de maturation des sous-unités 60S.

e. Rlp24 est remplacé par la PR Rpl24/eL24 au sein des particules pré-60S cytoplasmiques

Malgré une homologie de séquences importante entre Rlp24 et la PR Rpl24/eL24, ces deux protéines ne semblent pas présentes en même temps dans les particules ribosomiques 60S. D'autre part, la libération de Rlp24 semble indispensable à la liaison de Rpl24/eL24. Rlp24 et Rpl24 occuperaient donc successivement, et de façon mutuellement exclusive, le même site de liaison sur les particules pré-60S. Ce modèle est appuyé par le fait qu'en l'absence d'un export fonctionnel des sous-unités pré-60S, Rpl24/eL24 reste cytoplasmique alors que d'autres protéines ribosomiques comme Rpl25 sont capables de s'accumuler dans la fraction nucléaire²⁷⁴.

Ce modèle a été confirmé par les travaux de Kappel *et al.* qui ont en effet démontré que l'AAA-ATPase Drg1 catalyse la libération de Rlp24 et son remplacement par Rpl24/eL24, ce qui constitue une des premières étapes de maturation de la sous-unité pré-60S au sein du cytoplasme (Figure 58,59)^{273,305}.

Une fois incorporée au sein de la sous-unité pré-60S, Rpl24 recrute la protéine à doigts de zinc Rei1 avec laquelle elle interagit physiquement^{273,274,295,305,308,309}. Rei1 assure ensuite le recyclage de Arx1-Alb1 et indirectement celui de Tif6^{273,274,295,309,463}. L'interdépendance de ces étapes de maturation constitue un contrôle qualité et un mécanisme de surveillance de la maturation cytoplasmique des sous-unités ribosomiques pré-60S.

Très peu de données sont actuellement disponibles sur le rôle de Rsl24d1, l'homologue de Rlp24 chez les eucaryotes supérieurs. Les facteurs d'interaction et le rôle de Rsl24d1 dans la biogenèse des ribosomes ne sont pas décrits chez les mammifères.

Rsl24d1 a toutefois récemment été décrit comme enrichi au sein d'embryons de rats arrêtés au stade deux cellules⁴⁶⁶. Chez l'homme, *RSL24D1* a également été identifié dans des études visant à définir des biomarqueurs prédictifs de résistance aux chimiothérapies dans les cancers de l'ovaire et à définir des facteurs génétiques prédictifs de maladie rénale chronique chez l'enfant^{467,468}. De plus, le facteur *RSL24D1* a récemment été identifié comme surexprimé dans différentes lignées de carcinomes colorectaux. Son enrichissement au niveau transcriptionnel est corrélé à une sensibilité à l'oxaliplatine, une chimiothérapie dont l'activité cytotoxique est médiée par induction de stress de la biogenèse des ribosomes¹⁷⁸.

2. Objectifs de la thèse

L'hétérogénéité des ribosomes et leur biogenèse émergent comme impliquées fonctionnellement au cours du développement embryonnaire et dans l'homéostasie des cellules souches adultes et embryonnaires. En effet, différents travaux ont récemment identifiés des facteurs de biogenèse des ribosomes spécifiquement enrichis dans les cellules souches et indispensables à leur maintien. Toutefois, le nombre de facteurs caractérisés fonctionnellement dans les CSE murines est encore très restreint et peu de travaux établissent aujourd'hui des relations mécanistiques entre la fonction moléculaire de ces facteurs dans la biogenèse des ribosomes et leur rôle dans le maintien de l'identité des CSE murines.

Ainsi, en collaboration avec l'équipe dirigée par Jean-Jacques Diaz, mon équipe cherche à identifier et à caractériser des facteurs associés aux ribosomes pouvant être impliqués dans l'homéostasie des cellules souches embryonnaires murines (CSEm). Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'implication de la protéine Rsl24d1 dans le maintien des CSEm. Rsl24d1 est un facteur associé aux ribosomes décrit dans le modèle de levure et préférentiellement exprimé dans les cellules souches embryonnaires murines à l'état de pluripotence naïf comparées aux cellules différenciées. J'ai donc tout d'abord cherché à évaluer le rôle de l'enrichissement de Rsl24d1 dans

l'homéostasie de CSE murines. J'ai pour cela mis en place des approches expérimentales de perte d'expression combinées à des tests fonctionnels permettant d'évaluer si la déplétion de Rsl24d1 exerçait un impact sur l'homéostasie des CSEm et sur quelles propriétés en particulier : la déplétion de Rsl24d1 impacte-t-elle la clonogénicité, la pluripotence et/ou le taux de prolifération cellulaire élevé des CSEm? Pour compléter ces approches de perte d'expression de Rsl24d1, un vecteur de surexpression inducible de Rsl24d1 a récemment été développé au sein de l'équipe.

Par ailleurs, comme décrit ci-dessus, l'homologue de Rsl24d1 chez la levure Rlp24 est un facteur de biogenèse des ribosomes participant à la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique lors des étapes tardives de sa maturation cytoplasmique. Rlp24 est dans ce modèle associé aux pré-particules ribosomiques au sein du nucléole et également au sein du cytoplasme. Je me suis donc demandée si cette fonction de Rsl24d1 était conservée chez les mammifères. Pour cela, j'ai tout d'abord cherché à préciser la localisation sub-cellulaire de ce facteur et à évaluer si chez les mammifères Rsl24d1 était comme chez la levure un facteur navette présent à la fois dans la fraction nucléolaire et cytoplasmique. J'ai par la suite utilisé des approches de perte d'expression de Rsl24d1 par ARN sh combinées à des approches de profils polysomiques sur gradients de sucrose pour évaluer l'impact de Rsl24d1 sur la composition des ribosomes cytoplasmiques.

J'ai enfin cherché à comprendre en quoi cette protéine de biogenèse des ribosomes pouvait être indispensable à l'homéostasie des cellules souches embryonnaires. Contribue-t-elle au maintien d'un taux global de synthèse protéique élevé ou participe-t-elle plus spécifiquement à la traduction préférentielle de certains transcrits au sein des CSEm ?

Mes travaux de thèse ont ainsi soulevé des questions sur le rôle d'un facteur de la biogenèse des ribosomes dans la régulation des CSEm. Les approches expérimentales que j'ai développées ont apporté certaines réponses. Différents points restent toutefois à élucider et seront abordés dans la discussion générale.

3. Manuscrit en préparation

Abstract

Embryonic stem cells (ESC) possess clonogenic and pluripotency abilities i.e. they are able to self-renew indefinitely in the same developmental state and to differentiate in all the cell types composing embryonic and adult tissues. ESC homeostasis is coordinated by complex networks of different levels of gene expression regulations, including epigenetic, transcriptional and post-transcriptional levels. Furthermore, emerging evidences point out that the translational machinery, ribosomes, are directly implicated in the control of adult and embryonic stem cell homeostasis in different model organisms. Along this line, we have identified Rsl24d1, a ribosomal associated

protein (RaP), which is strongly expressed in naïve murine ESCs compared to their differentiated progenies. We demonstrated that Rsl24d1 actively contributes to ESC homeostasis and its expression is essential for ESC proliferation and clonogenic capacities. Finally, we have also demonstrated that Rsl24d1, like Rlp24 its yeast ortholog, is associated to pre-ribosomes in ESCs from the nucleus to the cytoplasm and is required for the biogenesis of the large ribosomal subunit.

Introduction

Embryonic stem cells (ESCs) are undifferentiated cells isolated from the inner cell mass of preimplantation embryos^{8,469}. ESCs are characterized by their clonogenic and pluripotency abilities i.e. they possess an infinite self-renewal potential while retaining the capacity to differentiate in all types of embryonic and adult tissues. Numerous factors have been shown to constitute the regulatory network maintaining ESCs identity and homeostasis. Core transcription factors (TFs) such as Oct4, Sox2 and Nanog are indeed established as central players in the transcriptional control shaping ESC identity¹²⁰. More recently, evidences have suggested an important contribution of translational regulations in stem cell fate determination in different models of drosophila and mammalian stem cells^{2,143,279,317,429,431,443}. Different studies have indeed highlighted a functional heterogeneity of ribosomes, the translational machinery, and their biogenesis during embryonic development and in mESCs homeostasis^{1,2,204,317,331}. Ribosome biogenesis is a complex and highly coordinated process occurring mainly in the nucleolar compartment and ending in the cytoplasm. It comprises ribosomal DNA transcription, and pre-ribosomal RNA processing coordinated with the recruitment and assembly of ribosomal proteins to ultimately form cytoplasmic ribosomal particles mature for translation. Ribosome biogenesis is orchestrated by hundreds of ribosomal associated proteins (RaPs) and snoRNAs. Ribosome biogenesis is highly regulated and tightly correlated to cell proliferative and physiological status. Indeed, an increase in nucleolar size and number has been associated to increased rRNA production. This quantitative modulation of ribosome biogenesis has been historically associated to cancer cells phenotypes displaying high plasticity and enhanced proliferative potential^{248,319,470}.

Along this line, ESCs have specific cell cycles with a short G1 phase and display characteristic large nucleoli which have been shown to be highly remodelled upon differentiation thereby suggesting a functional correlation between ribosome biogenesis and ESC homeostasis⁴⁷⁰⁻⁴⁷². However, to date, few factors have been functionally implicated in controlling ribosome biogenesis in the context of mammalian ESCs or ESC fate determination^{2,3}. For example, Fibrillarin (FBL), an enzyme catalyzing 2'-O-methylations of rRNAs during ribosome biogenesis together with members of the small subunit

processome, a complex mediating 18S rRNA processing have been recently involved in the maintenance of mouse ESCs^{2,3}.

In this context, we aimed at identifying novel ribosome biogenesis factors that contribute to the regulation of mESCs identity and gene expression control. First, by comparing the transcriptome of murine pluripotent cells (ESCs and induced Pluripotent Stem Cells or iPSCs) to differentiated cells and mouse tissues, we identified *Rsl24d1* (*Rlp24*) as the most significantly enriched Ribosome associated Protein (RaP) in mESCs. In yeast, Rlp24 has been characterized as a late pre-60S biogenesis factor, yet little is known about its function in higher eukaryotes and in mammalian cells^{273,274,303,305,463}. More precisely, Rlp24 has been shown to bind to nucleolar pre-60S particles and to shuttle through the nuclear pore complex together with pre-60S particles. Once in the cytoplasm, Rlp24 is released by the AAA-ATPase Drg1, a key step required for the subsequent incorporation of the late core ribosomal protein Rpl24 (eL24) during the latest steps of 60S subunits maturation in yeast models. After having validated *Rsl24d1* expression profile in different naïve embryonic stem cell lines, we investigated its functions in mESCs homeostasis by modulating its expression. To do so, we used *Rsl24d1* loss of function approaches mediated by shRNAs and assessed mESCs clonogenic, proliferative and pluripotent capacities upon *Rsl24d1* depletion. We then uncovered *Rsl24d1* subcellular localization and its impact on ribosome biogenesis in mammalian cells.

Results

a. *Rsl24d1* is enriched in mESCs and its expression is rapidly decreasing during differentiation

As a first step towards identifying Ribosomal associated Proteins (RaPs) impacting mESC fate, we mined available RNA-seq data to search for potential candidates differentially expressed between murine pluripotent cells (ESCs, iPSCs) and differentiated cells and tissues. In agreement with previous studies, most of the RPs and RaPs displayed a higher expression, at the mRNA level, in ESCs and in iPSCs compared to differentiated cells but only few factors were strongly enriched in pluripotent cells (Figure 1A)^{2,3,459}. Therefore, we selected four factors enriched in pluripotent cells, *Rps2/u55*, *Rps5/u57*, *Rpp25*, *Rsl24d1* and validated their enrichment at the mRNA and protein levels (data not shown). Among the four factors identified, *Rsl24d1* demonstrated the most significant enrichment in ESCs (Figure 1A). Although *Rsl24d1* functions in higher eukaryotes remain unknown, its yeast ortholog Rlp24, is a key 60S subunit processing factor^{273,274,305,463}.

We first validated *Rsl24d1* expression profile in naive embryonic stem cells and during embryoid body (EB) differentiation, using an independent mESC model. *Rsl24d1* is indeed highly expressed in

highly proliferative naive ESCs and its expression gradually decreases upon EB differentiation (Figure 1B). Western blot analysis with two independent antibodies also confirmed a preferential expression of Rsl24d1 in ESCs and a significant down-regulation as early as day 5 of EB differentiation (Figure 1C and Figure S1A). Moreover, parallelly, we assessed the expression of different ribosomal proteins, from both the small and the large ribosomal subunits, to rule out the possibility that the loss of Rsl24d1 detection during EB differentiation may reflect a global decrease of the stoichiometry of ribosome components (Figure 1C and Supplemental Figure S1A). However, we didn't observe a similar decrease of the different RPs. Western blotting next confirmed that the expression profile of Rsl24d1 is conserved between different mESC lines (Supplemental Figure S1B). Similarly to our observation in naive CGR8 ESCs, Rsl24d1 is highly expressed in naive R1 and G4 mESCs and lost upon EB differentiation regardless of the ESC model analyzed. Moreover, Rsl24d1 is also highly expressed at the protein level in the three mESC models cultured in ground state condition (2i media). Rsl24d1 is thus strongly enriched in pluripotent mESCs both at the mRNA and at the protein levels. Therefore, we decided to go further in its characterization by evaluating its subcellular localization in mESCs.

b. Rsl24d1 is associated to nuclear pre-ribosomes and to cytoplasmic 60S subunits

To understand the molecular function of Rsl24d1 and decipher whether like its yeast ortholog Rlp24, Rsl24d1 is involved in ribosome maturation processes, we first examined its subcellular localization in mESCs. To this end, a C-terminally FLAG-tagged Rsl24d1 was transiently expressed in mESCs, and the localization of the exogenous proteins was established by immunofluorescence using an antibody against the FLAG epitope. While the co-expressed GFP is detected similarly in the cytoplasm and in the nuclei of mESCs, the FLAG-Rsl24d1 protein is mainly localized in nuclear sub-regions that strongly resemble nucleoli (Figure 2A), thereby suggesting a role of this protein in ribosome biogenesis.

To further establish that Rsl24d1 is a Ribosomal associated Protein (RaP), following nucleo-cytoplasmic fractionation, nuclear pre-ribosomes and cytoplasmic ribosomes were purified on sucrose cushions. Western blotting revealed that, unlike Rps6 and Rpl9 control RPs which are similarly detected in nuclear and cytoplasmic ribosomes, Rsl24d1 is exclusively detected associated to nuclear pre-ribosomes (Figure 2B). This subcellular localization is consistent with observations describing that the yeast Rlp24 protein is implicated in pre-60S ribosomal particle shuttling and maturation^{273,274,305}. Rsl24d1 association with nuclear pre-ribosomes suggests that Rsl24d1 may be a component of pre-ribosomes participating in mESC ribosome biogenesis pathway.

In agreement with the yeast model, we next assessed whether Rsl24d1 could also be detected associated to late cytoplasmic pre-60S particles in mESCs. We thus performed polysome profiling on

wild-type mESCs, using sucrose gradient separation to isolate the different cytoplasmic ribosomal fractions (i.e., 40S, 60S, 80S free ribosomes and polysomes) (Figure 2C). Western blotting confirmed that Rsl24d1 is clearly and specifically detected in the fraction corresponding to the 60S subunit and, to a minor extent in the 80S ribosomes. Moreover, Rsl24d1 is completely absent in polysomes, the actively translating ribosomes bound to mRNAs, suggesting that Rsl24d1 is no longer needed in mature and actively translating 80S ribosomes. In complete agreement with its role as a shuttling factor in yeast, Rsl24d1 in mESCs is associated to both nuclear pre-ribosomes and cytoplasmic 60S particles and maybe more accurately to late pre-60S subunits. This dual sub-cellular localization suggests a dynamic role of Rsl24d1 in the late maturation steps of the 60S subunit.

c. Rsl24d1 is a pre-60S biogenesis factor

Taking into consideration the localization of Rsl24d1 in mESCs, we further examined its molecular function as a ribosome biogenesis factor in mammals. mESC lines expressing either a control shRNA or depleted for *Rsl24d1* were generated (Figure 3A). Polysome profiling assays performed on both Rsl24d1 expressing and depleted mESCs revealed that the loss of Rsl24d1 (Figure 3B) induces a significant decrease of free 60S subunits and a relative increase of free 40S subunits compared to control condition. Rsl24d1 depletion thus alter 60S subunits biogenesis. The relative increase of free 40S subunits may be due to an incapacity of synthesized 40S subunits to associate to 60S subunits due to alteration of their biogenesis. We confirmed the statistical significance of the impact of Rsl24d1 depletion on 60S subunit biogenesis in four independent knockdown assays (polysome profiles not shown). Interestingly, mESCs depleted for Rsl24d1 also induce a relative decrease of free 80S subunit compared to control mESCs. This decrease may be consequent to the decrease of the pool of free 60S subunits leading to an incapacity to assemble and form mature 80S ribosomes. Strikingly, the profile of the actively translating ribosomes, polysomes, doesn't seem affected by Rsl24d1 depletion, suggesting that Rsl24d1 has no impact on the already active pool of mature ribosomes in mESCs.

Complementarily, we analyzed the relative amounts of global 28S to 18S rRNA in *Rsl24d1* expressing and depleted mESCs using Bioanalyzer arrays (Figure 3C). In accordance to polysomes profiling experiments, we identified a slight decrease of the relative 28S/18S ratios confirming an impact on rRNA 28S synthesis and pre-60S ribosomes biogenesis. The moderate effect of *Rsl24d1* depletion on 28S/18S rRNA ratios compared to the important decrease of free 60S subunit observed in polysomes profiling experiments may be explained by the fact that in this experiments total RNAs were analyzed and this may attenuate the impact of *Rsl24d1* depletion on newly synthesized ribosomal RNAs.

Our results thus demonstrate that *Rsl24d1* is actually a pre-60S biogenesis factor whose depletion alters 60S particles biogenesis and the relative ratios between 60S, 40S and 80S free subunits. *Rsl24d1* depletion thus alter mature ribosomes formation and potentially also their activity.

d. *Rsl24d1* is implicated in mESCs homeostasis

Having validated that *Rsl24d1* was a ribosome biogenesis factor, we next wanted to assess whether *Rsl24d1* enrichment in mESCs may play a functional role in their homeostasis. To address this question, we performed shRNA mediated depletion of *Rsl24d1* with two different shRNAs. We first evaluated the efficiency of the knockdown at the transcript and at the protein level (Figure 4A).

We then addressed the impact of *Rsl24d1* depletion on the expression of core pluripotency markers *Oct4* and *Sox2* by qRT-PCR (Figure 4C). Interestingly, cells depleted for *Rsl24d1* show a reduced expression of both *Oct4* and *Sox2* at the transcriptional level. However, this decrease is only statistically significant with the shRNA inducing the strongest knockdown. This correlation between the efficiency of *Rsl24d1* depletion and the decrease of *Oct4* and *Sox2* expression suggested that *Rsl24d1* may moderately impact the expression of pluripotency markers.

We then wanted to gain functional insights in *Rsl24d1* impact on the ability of mESCs to initiate differentiation and give rise to daughter cells expressing markers of the three embryonic germ layers i.e. ectoderm, mesoderm and endoderm. To this end, we performed early differentiation assays and evaluated the expression of differentiation markers of the three embryonic germ layers in control mESCs and in mESCs depleted for *Rsl24d1* (Figure 4D). mESCs were differentiated at low density without LIF and in presence of retinoic acid for four days. Retinoic acid treatment biased differentiation towards the ectoderm layer. First we validated that this differentiation protocol was efficient by assessing *Oct4* expression levels between day 0 and day 4 in control mESCs. *Oct4* level quickly drops upon differentiation. *Rsl24d1* expression also decreases even if the decrease is less drastic (Figure 4.D). Additionally, we validated the efficiency of *Rsl24d1* depletion at day 0 in mESCs : *Rsl24d1* depletion is of approximately 60% of the total transcript. We then assessed the relative expression of ectoderm, mesoderm and endoderm markers at day 0 and day 4 after differentiation in control and *Rsl24d1* depleted mESCs. Depletion of *Rsl24d1* seems to have a moderate impact on the ability of mESCs to form precursors of the three embryonic layers. Indeed, expression of ectoderm and mesoderm markers are slightly altered upon *Rsl24d1* knockdown while endoderm markers are not impacted (Figure 4.D). This stronger impact on ectoderm differentiation may be due to the bias towards ectoderm formation induced by retinoic acid differentiation protocol. Thus *Rsl24d1* seems

to have a moderate impact on the ability of mESCs to initiate differentiation in the three embryonic germ layers. This early differentiation assay need to be repeated and further validated.

We then explored the impact of *Rsl24d1* depletion on clonogenic capacities by measuring alkaline phosphatase activity (colorimetric measurement) in control versus *Rsl24d1* depleted mESCs (Figure 4.A). Alkaline phosphatase (AP) is highly active in pluripotent cells and its enzymatic activity is correlated to mESCs self-renewal capacities. We used two control sh as positive controls and two sh against *Oct4* as negative controls. Plated at clonal density, mESCs ability to form AP positive colonies was significantly impaired upon *Rsl24d1* depletion (Figure 4.A). The number of colonies was significantly lower in absence of *Rsl24d1*. Accordingly, the shRNA inducing the most important depletion of *Rsl24d1* seems to have the most drastic impact on mESCs colony forming abilities and clonogenic capacities. These experiments indicate that *Rsl24d1* is required for the maintenance of mESCs clonogenic capacities.

mESCs are characterized by a short doubling time and high proliferation rates. We thus asked whether *Rsl24d1* depletion could impact mESCs proliferation capacities. Using the same loss of expression system (two different shRNAs against *Rsl24d1*), we monitored mESCs proliferation rate by live cell imaging (Incucyte®) in wild-type, control and *Rsl24d1* depleted mESCs (Figure 4.B). Consistent with our results on clonogenic capacities, we found that the shRNA inducing *Rsl24d1* stronger depletion exerts the most drastic effect on mESCs proliferation rate. Nonetheless, the two *Rsl24d1* shRNA significantly impaired mESCs proliferation capacities compared to wild type and control sh. We confirmed *Rsl24d1* impact on cell proliferation using a complementary technology, the xCelligence™ live cell analysis technology (Figure 4 Suppl).

Rsl24d1 is down-regulated during differentiation of mESCs into EBs (Figure 1.B et C) and high protein synthesis is thought to be required for mESCs maintenance. Indeed, a decrease of protein synthesis rate (from 60 to 70 %) has been described to occur during EB formation by hanging drop culture and neural differentiation by retinoic acid (RA) treatment³. This results were validated by S³⁵ methionine incorporation and polysome profile analysis in mESCs compared to differentiated embryoid bodies. mESCs require an increase protein synthesis rate compared to their differentiated progeny. We thus decided to investigate the impact of *Rsl24d1* depletion on mESCs global protein synthesis to assess whether it may recapitulate the decrease of protein synthesis rate occurring upon differentiation (Figure 5). To this end, we measured nascent protein synthesis rates by incorporating AHA (a methionine analog) and quantifying Click-iT AHA Alexa® Fluor 488 intensity in control versus *Rsl24d1* depleted mESCs. *Rsl24d1* depletion seems to decrease global protein synthesis rate by 45 % compared with that of control sh (Figure 5). However, this experiment need to be repeated to improve the reproducibility of the quantifications.

Some data published in the literature are contradictory to our observation and support an enhanced translation rate during EB differentiation compared to mESCs¹³¹. The reason for this discordance is unclear yet.

Together, our results show that the ribosome biogenesis protein Rsl24d1 is essential for mouse embryonic stem cell homeostasis, particularly for maintenance of their clonogenic and cell proliferation capacities and moderately for their pluripotency.

e. Rsl24d1 expression level is tightly controlled by mESCs

To go further in the characterization of Rsl24d1 function in mESCs maintenance, stable cell lines overexpressing Rsl24d1 in a doxycycline-inducible manner were developed. Strikingly, we observed that upon expression of the exogenous Rsl24d1 protein, the expression of the endogenous Rsl24d1 is progressively decreased and nearly undetectable at the highest concentration of doxycycline (1000 ng.mL⁻¹)(Figure 3.D). These results suggest that Rsl24d1 expression is kept in a specific physiological window by mESCs. Both a depletion and an overexpression of Rsl24d1 seems deleterious for mESCs. Additionally, Rpl24 expression seems also affected by Rsl24d1 induced overexpression, suggesting that a competition between the two homologous proteins may be taking place in ribosomes binding. As in yeast, Rsl24d1 and Rpl24 may occupy the same binding site on ribosomes.

f. Discussion and conclusion

In this study we show that *Rsl24d1* is critical for mouse embryonic stem cell homeostasis. Rsl24d1 is preferentially expressed in mESCs both in the naïve and ground state of pluripotency. Our data highlight that *Rsl24d1* function is necessary to maintain mESCs clonogenicity, high proliferation rate but seem to impact moderately their differentiation potential. Rsl24d1 depletion actually leads to a rapid decrease of mESCs capacities.

We now need to validate the impact of *Rsl24d1* depletion on the ability of mESCs to form precursors of the three embryonic germ layers by repeating the early differentiation experiments. To this end, we are currently developing inducible *Rsl24d1* depletion vectors that will help improving mESC survival and decrease cell death induced by *Rsl24d1* depletion.

Moreover, Rsl24d1 seems to contribute to mESCs homeostasis by enabling cells to sustain a high protein synthesis rate maybe to support the appropriate expression of labile core pluripotency transcription factors like *Esrrb*, *Tfcp2l1* and *Nanog* that display short half-lives³. However, experiments of nascent protein synthesis quantifications need to be repeated in order to improve

the reproducibility of the Clik-iT AHA[®] staining and decrease the variations among biological replicates.

We also demonstrate that Rsl24d1 is involved in the maturation of pre-60S ribosomal subunits and its function is conserved between yeasts and mammals : Rsl24d1 is able to shuttle from the nucleolus to the cytoplasmic compartment most likely associated to pre-60S particles.

Rsl24d1-deficient mESCs rapidly lose their clonogenic and proliferation capacities and are unable to maintain their identity *in vitro*. Understanding the molecular mechanisms underlying this stem cell exhaustion *in vitro*, will be an important step towards elucidating the role of this ribosome biogenesis factor of the 60S subunit in mammalian embryonic stem cell homeostasis. Indeed, few studies have been performed in mammalian stem cells and even fewer have been focused on 60S biogenesis factors. Notchless, the murine ortholog of yeast 60S subunit maturation factor Rsa4 has been demonstrated to be implicated in pre-60S maturation in adult murine hematopoietic stem cells but not anymore in lineage committed-progenitors and differentiated cells. This study has shown for the first time that a pre-60S biogenesis factor was specifically required in adult stem cells compared to their differentiated counterparts¹³⁷. The molecular mechanism responsible for hematopoietic stem cell exhaustion upon Notchless depletion is supposed to rely on p53 stabilization and cell cycle arrest upon ribosome biogenesis alterations, known as « ribosomal stress pathway » or « nucleolar stress pathway ». Along this line, Fibrillarin, a nucleolar rRNA methyltransferase has recently been implicated in mESCs homeostasis in a p53-dependent manner^{2,3}. However, another study has suggested the activation of p53-independent mechanisms in mESCs deficient for components of the small subunit processome (Ddx47, Ddx52 et Krr1). Wnt/ β -catenin/c-Myc signaling pathway being strongly activated in mESCs , c-Myc may also directly play a role by its ability to inhibit p53 induced cell cycle arrest and apoptosis following ribosome biogenesis alteration. Thus, both p53-dependent and independent mechanisms seem to occur upon ribosome biogenesis alterations in mESCs. Therefore, it will be important to evaluate the molecular mechanisms responsible for mESCs exhaustion upon *Rsl24d1*-depletion : are p53-dependent or independent mechanism mainly activated upon Rsl24d1 depletion? Can similar mechanisms be partially activated in the differentiation process of mESCs into embryoid bodies where depletion of Rsl24d1 naturally occurs ? *Rsl24d1*-deficient mESCs rapidly lose their proliferation capacities suggesting an alteration of their cell cycle. Indeed, mESCs are known to have a special cell cycle regulation with a very short G1 phase. This short G1 phase is supposed to create an open window allowing pluripotent cells to integrate differentiation signals that push them towards differentiation⁴⁵. It will thus be really interesting to investigate how Rsl24d1 depletion may alter cell cycle regulation and how this may contribute to an increased propensity of mESCs entering differentiation or undergoing senescence or apoptosis.

Additionally, it will be interesting to investigate Rsl24d1 impact on mESCs' ribosome composition and translational activity and efficiency. Indeed, as a pre-60S biogenesis factor, Rsl24d1 may be required to build ribosomes with slight variations that may orchestrate a specific translational program required for mESC homeostasis. On the other hand, Rsl24d1 may allow mESCs to have an important stock of dormant cytoplasmic pre-60S subunits ready to initiate translation upon differentiation cues. Performing mass spectrometry analysis on Rsl24d1 depleted mESCs will thus be important to assess the impact of Rsl24d1 on the composition of mature cytoplasmic ribosomes. Complementarily, ribosome profiling experiments in Rsl24d1-deficient mESCs will allow us to understand whether this ribosome biogenesis factor may lead to the formation of ribosomes with different affinities for some transcripts and may thus contribute to the control of gene expression that orchestrate maintenance of stem cell identity⁴⁴⁰.

Finally, Rsl24d1 being strongly enriched in pluripotent mESCs, it will be really interesting to investigate its expression profile in iPSC and evaluate whether Rsl24d1 expression may contribute to enhanced somatic cell reprogramming. Rsl24d1 characterization is based on *in vitro* cell lines. It will thus be essential to evaluate its function *in vivo* and particularly its role during early steps of mouse embryogenesis. Characterization of the role of the pre-60S biogenesis factor Rsl24d1 may thus contribute to a better understanding of gene network regulating mESCs identity and may also contribute to the development of future innovative therapies based on pluripotent stem cells.

g. Experimental procedures

Cell culture

Low-passage CGR8 mouse embryonic stem cells (mESCs) were grown in GMEM BHK-21 (Life® 11710-035) with 10% ESC grade heat inactivated FCS (Sigma F0926), 1x non-essential amino acid (Life® 11140-050), 2% Sodium Pyruvate 100mM (Life® 11360-070), 0.1% β -mercaptoethanol 100mM (Sigma M6250), 1x Leukemia Inhibitory Factor (LIF, home-made) in 37°C, 5% CO₂ incubator. CGR8 mouse embryonic stem cells were maintained on 0,2% gelatin (Sigma-G9391)-ddH₂O coated dishes. Cell media is changed every two days. When cells reach 60-80 % confluency, they are trypsinized and amplified at a density of $1,5 \cdot 10^6$ cells/ 10 cm dish.

Low passage CGR8 mouse embryonic stem cells (mESCs) were grown in KoDMEM (Life® 10829-018), 15% Knock-Out Serum Replacement (Life® KSR 10828-028), 1x non-essential amino acid (Life® 11140-050), 1% GlutaMax 2mM (Life® 35050-38), 0.1% β -mercaptoethanol 100mM (Sigma M6250),

1x Leukemia Inhibitory Factor (LIF, home-made), 1x 2i supplement (ESGRO®-2i Supplement kit, ESG1121, Millipore-Merck).

Low passage R1 & G4 mouse embryonic stem cells (mESCs) (ATCC® CRL-11268, were grown in DMEM-High Glucose (Life® 11960-044) with 10% ESC grade heat inactivated FCS (Sigma F0926), 1% GlutaMax 2mM (Life® 35050-38), 1x non-essential amino acid (Life® 11140-050), 1% Sodium Pyruvate 100mM (Life® 11360-070), 0.1% β-mercaptoethanol 100mM (Sigma M6250), 1x Leukemia Inhibitory Factor (LIF, home-made), with Penicillin/Streptomycin (Life® 15140-122) in 37°C, 5% CO₂ incubator on feeder layers of mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs).

CGR8 mouse embryonic stem cells (mESCs) were grown in differentiation media for embryoid bodies formation with in GMEM BHK-21 (Life® 11710-035) with 20% heat inactivated FBS (Sigma F2442), 1x non-essential amino acid (Gibco™ 11140-050), 2% Sodium Pyruvate 100mM (Gibco™ 11360-070), 0.1% β-mercaptoethanol 100mM (Sigma® M6250).

293T human embryonic kidney cells were grown in DMEM (Gibco™ DMEM-10938-025) with 10% heat inactivated FBS (Sigma® F2442), 1x non-essential amino acid (Gibco 11140-050), 2% Sodium Pyruvate 100mM (Gibco 11360070), 1x Penicillin-Streptomycin 50mg.mL⁻¹(Life – 15140-122) in 37°C, 5% CO₂ incubator.

Lentiviral production

HEK 293T cells were used as packaging cells to produce lentiviruses. At 50-70% confluency, 293T cells were co-transfected with plasmids coding for lentivirus structural components and replication proteins (Gag/Pol/Env or pLP1 : 3μg, pLP2: 3μg, pLP-Vsvg: 2μg), and pLKO.1-shRNA (4μg) using the transfection reagent FuGENE® HD (Promega®). FuGENE® is a lipidic reagent with high efficiency for DNA transfection and low toxicity. Plasmids were transfected at a ratio 4 :1 (FuGENE : DNA) in OptiMEM (Gibco 319850-47) media without antibiotics. 24h later, media were changed. 72h after transfection, lentiviral supernatants were collected, filtrated and concentrated with centricons (Vivaspin®20, Sartorius, 3000 g, 90 min) before being snap-frozen in liquid nitrogen and storage at -80°C. Frozen lentiviral supernatant are then thawed and titrated before infections.

***Rsl24d1* gene Knockdown**

Gene knockdown was achieved by infections of CGR8 mESCs with lentiviruses expressing small hairpin RNA targeting Rsl24d1/Rlp24. shRNA were used as negative control shCOO5 & sh GFP (targeting gene absent in CGR8) and as positive control shRNA Oct4 (pluripotency transcription

factor). shRNA sequences are listed in Table 1. Efficiency of the knockdown was assessed by qRT-PCR and by Western-Blot.

Table 1 : sequences of shRNA

sh Rsl24d1 v1	CCGGCGCACGCAAACAGGAAAGTTTCTCGAGAAACTTTCCTGTTGCGTGCGTTTTT
	AATTAACAAACGCACGCAAACAGGAAAGTTTCTCGAGAAACTTTCCTGTTGCGTGCG
sh Rsl24d1 v2	CCGGCGTAGAAATGAACCTGTGAACTCGAGTTTCACAGGTTCAATTTCTACGTTTTT
	AATTAACAAACGTAGAAATGAACCTGTGAACTCGAGTTTCACAGGTTCAATTTCTACG
sh Oct4 v1	CCGGCAAGGGAGGTAGACAAGAGAACTCGAGTTCTTGTCTACCTCCCTTGTTTTTG
	AATTCAAAAACAAGGGAGGTAGACAAGAGAACTCGAGTTCTTGTCTACCTCCCTTGT
sh Oct4 v2	CCGGCCACTTCACCACACTCTACTCCTCGAGGAGTAGAGTGTGGTGAAGTGGTTTTTG
	AATTCAAAAACCACTTCACCACACTCTACTCCTCGAGGAGTAGAGTGTGGTGAAGTGG
shCOO5	CCGGTACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGTATTTTT
	AATTAATAATACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGTA
shGFP	CCGGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCGAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTCTTTTTG
	AATTCAAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCGAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGC

Rsl24d1 Overexpression

Overexpression vector were design and generated using the Gateway® technology (Life technologies®, invitrogen).

First, double stranded DNA with Rsl24d1 cDNA flanked with either N-terminal or C-terminal Flag-TAG sequences and flanked by sequences of the Gateway® cloning technology (*attB*, Invitrogen®) allowing BP recombination, were synthesized by gBlocks® Gene Fragments technology in the IDT company (Integrated DNA Technology).

Then, this dsDNA fragment was inserted in the pDONR™221 entry plasmid by BP recombination (*attP*, Invitrogen®) following the company recommendations (equimolar amount of *attB*-DNA/entry vector) (Figure 61). The obtained plasmid was then amplified (transformation of competent *E.Coli* DB3.1, *gyrA462* allele resistant to the toxicity of *ccdB* gene and Midiprep, GeneEltute™ Endotoxin-Free Plasmid miniprep kit, Sigma® PLED35-1KT) and sequenced (Genoscreen, sequencing methog M13FW and rev). This entry vector was then used to transfer the tagged Rsl24d1-dsDNA into the plasmid PB-TAG-ERP2 (Plasmid 80479, Addgene®) using an LR recombination reaction. This reaction was performed between the *attL* extremities of our gene of interest and the *attR*-containing destination vector following the manufacturer's recommendations. The plasmids PB-TAG-Rsl24d1-obtained were then amplified (using *E.Coli* DB3.1, Midi/Maxiprep, Sigma® kit) and sequenced. In

order to generate stable cell lines, this plasmid was then directly transfected onto CGR8 mESCs with the pBase/pCyL43 coding for the PiggyBac transposase (ratio 5 :1/ PB-TAG-Rsl24d1-Flag-Tag :pBase), following the same transfection protocol than for 293T cells (FuGENE® HD). 24h after, the media was changed and 48h transfected clones were selected using puromycin (Sigma® P8833, 1,5µg.mL⁻¹). Efficiency of the overexpression was assessed at the protein level by Western blotting.

Infections

The day before infections, CGR8 mESCs were plated at 30-40% confluency (4x10⁶ cells/10 cm dish). One hour prior infection, 50%–70% confluency cells were incubated in 6mL fresh mESC media with Polybrene 8 µg.mL⁻¹ (Sigma® 107689). CGR8 cells were infected overnight at a Multiplicity of infection of 2 and 10. 12h later, media were changed and 24h later selection of infected cells was performed using puromycin (1,5µg.mL⁻¹, Sigma™ P8833).

Hanging drop method of Embryoid formation : model of *in vitro* differentiation

mESCs were cultivated in suspension without antidifferentiation factors, LIF. Embryonic stem cells differentiate spontaneously and form three-dimensional multicellular aggregates. These cell aggregates are called embryoid bodies (EB). Hanging drop culture is a widely used EB formation induction method. This method is reproducible when EBs are formed with the same starting number of cells.

At day 0, CGR8 mESCs are harvested and diluted 25000 cells/mL with differentiation medium (GMEM BHK-21 (Gibco 11710-035) with 20% ESC grade heat inactivated FCS (Sigma F0926), 1x non-essential amino acid (Gibco® 11140-050), 2% Sodium Pyruvate 100mM (Gibco 1136-039), 0.1% β-mercaptoethanol 100mM (Sigma M6250)). 20 µL drops (approximately 500 cells) of this cell suspension are laid on the lid of bacterial plates. Once covered with drops, the lid is gently turned over and placed on the top of a bacterial plate filled with 5mL PBS to avoid evaporation. The hanging drop plates are placed in the incubator for 2 days. At day 2, small EBs are formed at the end of each drop. These EBs are resuspended in 10mL differentiation media in new bacterial plates. The resuspended EBs are left in the incubator for 3 days. At day 5, EBs are plated in adherent condition in presence of retinoic acid (10⁻⁸M, R-2625 Sigma-Merck®) in plates coated with gelatin 0,2% and placed back in the incubator. At day 6 and day 8, media is changed in each plate with fresh differentiation media containing retinoic acid. EBs are harvested all along this protocol and allow the monitoring of the expression of different genes/proteins during early differentiation. Once the protocol is completed, the EBs are beating in the plate as a witness of the efficient differentiation and formation of cardiomyocytes.

Early differentiation assays

mESCs were plated at low density (2×10^5 cells/10 cm plate) on 0,2% gelatin coated dish in CGR8 media (GMEM BHK-21 (Life® 11710-035) with 10% ESC grade heat inactivated FCS (Sigma F0926), 1x non-essential amino acid (Life® 11140-050), 2% Sodium Pyruvate 100mM (Life® 11360-070), 0.1% β -mercaptoethanol 100mM (Sigma M6250)), without LIF and with retinoic acid (10^{-8} M, R-2625 Sigma-Merck®) for four days. Media was changed every days. After 96h, mESCs were harvested and RNA was extracted.

Similarity searches for Rlp24/Rsl24d1 and Rpl24/eL24 homologues

The amino acid sequences of yeast Rsl24d1/Rlp24 (Uniprot: Q07915), mouse Rsl24d1/Rlp24 (Uniprot: Q99L28), human Rsl24d1/Rlp24 (Uniprot: Q9UHA3), yeast Rpl24 (Lo et al., 2010), mouse Rpl24 (Uniprot: Q8BP67), human RPL24 (Uniprot: P83731) was used for Blast searches of nonredundant databases. Similar sequences were retrieved and compared with the Rpl24- related sequences, and multiple alignments were obtained with Protein alignment tools emboss needele (Tools > Pairwise Sequence Alignment > EMBOSS Needle).

RNA extraction and qRT-PCR

- **Total RNA**

Total RNA (RNA_{tot}) was extracted and purified using either TRI Reagent® (Sigma, T9424) or Trizol Reagent (Invitrogen® 15596) following the manufacturer's protocol. Glycoblue (Ambion®) was used as a carrier to facilitate RNA precipitation. RNA concentration and its purity was assessed by titration with the spectrophotometer Nanodrop 2000/2000c™ (ThermoScientific™) and analysis of the 260/230 and 260/280 ratios.

- **Reverse Transcription**

1 μ g of RNA_{tot} was converted to cDNA using SuperScript™ II Reverse Transcriptase Mix (Invitrogen™ 18064-071 : 5X First-Strand Buffer, OligoDT 602 $ng \cdot \mu L^{-1}$, Random primers 100 $ng \cdot \mu L^{-1}$, dNTP mix 0,5 μ M final for each dNTP, SuperScript Reverse Transcriptase II 200 U, DTT 10 mM final, RNase OUT 40U). The different steps were the following : denaturation of RNA (65°C, 5min), Incubation reaction mix without Reverse transcriptase at RT for 10 min, polymerisation by RT at 42°C for 50 min, heat inactivation of RT at 70°C for 15min. cDNA obtained are diluted to 10 $ng \cdot \mu L^{-1}$ and stored at -20°C.

- **qPCR analysis**

qPCR was performed using the SybrMix 2X containing SybrGreen a DNA intercalating dye (Roche, Applied Biosystem) in a reaction mix containing : 1 μ L of cDNA at 10 $ng \cdot \mu L^{-1}$, 5 μ L of SybrMix 2X, 3,5 μ L of ultra-pure H₂O and 0,5 μ L of 10 μ M qPCR primers. Primers were used at 10 μ M per reaction. All qPCR primer sequences are listed in Table 2.

The different steps of the qPCR protocol are the following : initial denaturation 10min/95 °C, 45 cycles of 3 steps : denaturation of 20sec/95°C, hybridation 10 sec at 65°C and elongation 10sec at 72°C, at the end, a melting curve obtained by progressive temperature increase from 65°C to 95°C (2°C/sec). Relative quantification is established at the end of each elongation step by the Light Cycler® 96 (Roche®). The relative quantification of cDNA is established using the Ct method. Relative cDNA expression was normalized using the following mouse housekeeping gene used: *β-actin*, *Psmid9*, *Tbp*, *603B20Rik*.

Table 2 : qPCR Primer list

Gene Symbol	Forward	Reverse
Rsl24d1 v1	GATGTCGGACACCCATCAAA	TGCAGAATCGGAACACATAAGA
Rsl24d1 v2	(i) <u>GTTCTGGCTGTCCTGAAACT</u>	ACGCCTTTAATCCCCTAACTC
Sox2	AAATCTCCGACGCGAAACGACA	CCTCCAGATCTATACATGGTCCGA
Nanog	AAGCCAGGTTCTTCCTTCTTCCA	AGGTCAGGAGTTCAAATCCCAGCA
Klf4	ACCTTTCACACTGTCTTCCCACGA	ACAAGCTGACTTGCTGGGAACTTG
<i>β-actin</i>	GAAATCGTGCGTGACATCAAAG	TGTAGTTTCATGGATGCCACAG
Tbp	GGGATTCAGGAAGACCACATAG	CCTCACCAACTGTACCATCAG
Psmid9	CTCTCTGGGTTGAGGCATTATT	GAGAATTCAGACAGGCTATG
6030460B20Rik	TCTGGTACACTCGACTCACT	TCCACAGCCTTTATCCTGTTAC
Fgf5	AGCGCGACGTTTTCTTCGTCTTC	ATGGAAACCGATGCCACTCTGC
Pax6	GAGAGAACACCAACTCCATCAG	CCTCAATCTGCTCTTGGGTAAA
Nestin	TTTCTTCTGTGGCTCACCTG	GAGGAGCAGCAATGATGAGT
PDGFRa	TGGCCAACTGACCATGCCA	TTGTCGCGCAACAGGTTCTC
Foxa2	CATCCGACTGGAGCAGCTA	TGTGTTTCATGCCATTCATCC
TBra	TGAAGGCGCCTGTGTCTTTCAGC	TGGCTGGTGATCATGCGTTGC
Wnt3	TGTTCCAATATTGGGGGCG	GGCCAGGGACCACCAAAT

Nodal	TTCAACCTGATTGGCTGGGG	TATCGTTTCAGCAGGCTCTGG
Gsc	CACAGACAGTCGATGCTACTT	GTCCTGGGCCTGTACATTATT
Sox17	CAGAACCCAGATCTGCACAA	GCTTCTCTGCCAAGGTCAAC
Gata4	TTCTGCTCGGACTTGGGAC	TTCCAGGCAGGTGGAGAATAAG
Gata6	CTCAGGGGTAGGGGCATCA	GAGGACAGACTGACACCTATGTA
Oct4/Pou5f1	CCATGCATTCAAACCTGAGGCACCA	ACAGCATCACTGAGCTTCTTTCCC

Polysome profiling on sucrose gradients

Polysome profiling on sucrose gradients was performed by comparing the control shRNA (shCOO5) and to the targeted shRNA against Rsl24d1, with each having 4 independent biological replicates.

- **Tranlation inhibition and Cell Fractionation**

Translation was irreversibly inhibited by incubating cells for 10 min in usual culture media supplemented with 25 ng.μL⁻¹ Emetine (Sigma-Merck™ E2375) in 37°C, 5% CO₂ incubator. Cell pellets were lysed in a hypotonic lysis buffer (3x size of the pellet of cells) (10 mM Tris pH7.4, 1mM MgCl₂, 10 mM KCl mg.mL⁻¹, RNase OUT 10U.mL⁻¹ (Invitrogen®, 10777-019)) and incubated for 10 min at 4°C with mild occasional vortexing. The cytoplasmic membrane was disrupted using Precellys® homogenizer at slow speed (4500rpm, 10 sec, 2mL tubes, Ozyme™). Then the supernatant was collected and the cytoplasmic fraction was clarified by sequential centrifugation (700 g, 10 min, 4°C pellet the nuclei; 12 000 g, 10min, 4°C pellet mitochondria). Cleared cell lysate (2mg of protein sample) was then loaded onto a 10%–50% sucrose gradient and centrifuged at 35,000 rpm for 2.5hr at 4°C. Gradients were fractionated using a Brandel™ gradient (BR-188) fractionator with continuous A254nm measurement. We collected fractions corresponding to the free mRNPs, 40S, 60S, 80S ribosomes and polysomes containing multiple ribosomes bound along an mRNA molecule being translated.

- **Protein Extraction : TCA precipitation**

Proteins from the different fractions (free mRNPs, 40S, 60S, 80S, polysomes) were purified using the TCA precipitation protocol : add 1V of ice cold 100 % TCA to 4V of protein sample. Mix by inversion,, let 15 min, 4°C and centrifuge 13 000 g, 15 min. Then, wash the obtained pellet 2 times with 200μL Acetone, without disrupting the pellet and centrifuge at 13 000g, 15 min . Let the pellet dry for 15-30

min and resuspend it in 1X loading buffer (described in WB part). Denature the protein samples by heating for 5-10min at 95°C.

Western Blot

- **Protein extraction and dosage**

Cells were washed in 1X PBS, harvested and proteins were directly extracted in 1X RIPA buffer (30 min on ice, Vortex every 10 min ; 150 mM sodium chloride, 1.0% NP-40 or Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 25mM Tris, pH 7.6) or 1X Laemmli buffer (DTT 0.1%, Bromophenol blue, 0.0005%, Glycerol, 10%, SDS (electrophoresis-grade), 2%, Tris-HCl, 63mM pH 6.8). Protein content was quantified using DC™ Protein Assay (Biorad) method, a colorimetric reaction similar to Lowry assay.

- **Electrophoresis**

Protein samples were loaded onto 12% home-made SDS–PAGE gel. After running, proteins were transferred by semi-dry transfer system using Trans-Blot Turbo or wet transfer using wet/tank blotting system (Bio-Rad®) following manufacturer’s protocol. The PVDF membranes were blocked in 5% nonfat dry milk in PBST/TBST for 1 hour, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody, then washed three times for 5 minutes in PBST/TBST, incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (anti-Mouse and anti-Rabbit from Cell Signaling, and anti-Goat from Dako) for 1 hour, and then washed three times for 5 minutes in PBST/TBST. The western blot signals were developed using Diagnostics ECL Substrate (WesternBright ECL Spray-HRP Substrate for X-ray Film, K-12049-D50) and Pierce™ ECL WB Substrate (32106) and imaged with ChemiDoc MP (Bio-Rad®) or using developing film (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm™ ECL, GE28906837).

Table 3 : list of the antibodies used for WB analysis

Primary Antibodies	Company	Reference
anti-goat Rsl24d1	Santa Cruz®	sc-324290 / S14
anti-rabbit Rsl24d1	Sigma®	HPA063392
anti-Rpl24	ThermoFischer Scientific®	PA5-30157
anti-mouse Rps2 / uS5	Abnova®	H00006187-M01, clone 3G6
Anti-rabbit Rps6	Cell signaling®	5G10
anti-mouse Rpl19	Abcam®	ab58328
anti- β-actin-peroxidase	Sigma-Aldrich®	A3854

Anti-mouse α -tubulin	Sigma®	T6074
Anti-Oct3/4	BD Tranduction Laboratories™	611203
Anti-rabbit Sox2	Abcam®	Ab97959
Anti-rabbit Rpl13	Abcam®	Ab50880

Alkaline phosphatase assay

To assess ES cells self-renewal capacities at cloning density, cells were plated at 3000 cells per well (~100 cells/cm²) in 6-well dishes and cultured for 7 days. Cells were grown in their usual culture media in presence of puromycine (1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma®P8833). On day 6, colonies were stained for alkaline phosphatase activity (Alkaline Phosphatase detection kit®, SCR-004, Merck-Millipore). Numbers of AP positive (pink) and differentiated colonies (white) were scored by microscopic examination and quantified with computer-assisted image analysis using the ImageJ analysis (NIH). All assays were performed in triplicates.

Proliferation assays

- **xCelligence®**

Real-time cell behavior was monitored using xCELLigence RTCA system (Roche), which allows label-free and dynamic monitoring of cells by measuring electrical impedance. 5000 cells were seeded in 96 E-plates (Roche) after the puromycine selection for 7 days of cells infected by shRNA (puromycine, 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Sigma®P8833). RTCA system displays the measurements of impedance signal as Cell Index (CI) values, providing quantitative information about the different biological status of the cells including proliferation. Impedance was acquired every 15 min for 5-7 days. CI values were analyzed during the linear phase of proliferation at the same time point between experiments. Assays were performed in triplicates.

- **Incucyte®**

CGR8 mESCs (750 cells/well) infected with shRNA control or Rsl24d11 with MOI (« Multiplicity of Infection ») 10 were grown in a 24-well cell culture plate (Corning® Costar®). Confluency percentage was monitored using the high definition automated imaging system from IncuCyte® (Essen BioScience) following the manufacturer's instruction. The experiments were performed in duplicate. The data was analyzed using analysis of variance.

Time lapse images were acquired using IncuCyte®, a live cell imaging microscope that fits within the standard carbon dioxide incubator (www.esseninstruments.com). Images were captured in 2h intervals and collated into a .wmv file using software from IncuCyte.

28S/18S ratios : Bioanalyzer®

Quality of RNA and the relative level of rRNA 28S/18S were analyzed from RNA samples extracted from sh control and sh Rsl24d1/ Rlp24 using BioAnalyzer (Agilent) (RIN ranging from 8,9 to 10). Assays were performed in triplicates.

Click-iT L-azidohomoalanine (AHA) labelling

Nascent protein synthesis was detected in wild-type mESCs, control sh and shRNA targeting Rsl24d1 using Click-iT® AHA Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis HCS Assay (Invitrogen C10289). Quantification of Alexa Fluor® intensity was performed using HighThroughput Imaging with Operetta® High-Screen Content Imaging (PerkinElmer™). The kit was used according to the manufacturers indications. AHA is an analog for L-methionine, containing a azide moiety. When added to straved cultured cells, AHA is incorporated into proteins during active protein synthesis. After a click reaction between the azide moiety and an alkyne, the azide-containing proteins can be detected with an alkyne tagged with Alexa Fluor 488 fluorescent dye.

Nucleo-cytoplasmic fractionation

CGR8 cells plated 2 days prior are harvested using trypsin following standard protocol. The cells are counted, and rinsed in cold PBS at least once. The final PBS wash is removed and the cells kept on ice. mESCs are resuspended in 3 volumes of buffer AH (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5mM, KCl 10mM, DTT 0,5mM Protease and Phosphatase inhibitor) and kept on ice for 15 min. 0,05 % NP-40 is added to the cell suspension for 3 min on ice and then the suspension is centrifuged 1,000g, 10 min at 4°C.

The supernatant correspond to the cytoplasmic fraction. The pellet corresponds to the nuclei.

After a centrifugation at 10,000g, 10 min at 4°C, the supernatant corresponding to the cytoplasmic fraction is recovered in special tubes and either protein are extracted in 5X RIPA buffer or the sample is submitted to a ribosome purification step (ultracentrifugation on sucrose cushions).

The nuclear pellet is washed with 200 µl of AH buffer without detergent, by pipetting ang gently tapping. The sample is centrifuged at 1,000g, 5 min at 4°C. The supernatant is discarded and the nuclear pellet is resuspended in 120 µL of buffer S1 (Sucrose 0,25M, MgCl₂ 10mM, protease & phosphatase inhibitor). This nuclear suspension is layered over 120 µL of S3 buffer (Sucrose 0,88M, MgCl₂ 0,5mM, protease & phosphatase inhibitor) in a tube and centrifuged at 2800 g for 10 min at

4°C. The supernatant is discarded and the pellet corresponding to the nuclei is resuspended in 1X RIPA and sonicated using Bioruptor® sonication device (Diagenode™) (5X 10 seconde cycles). The solution is then centrifuged at 21,000g for 10 min at 4°C. The supernatant is collected and correspond to the nuclei.

Ribosome purification

Cytoplasmic ribosomes were purified from $5-6 \times 10^6$ cells from wild type mESCs and embryoid bodies. Ribosome purification was performed according to the protocol published by Belin *et al.*, 2010 (PMID : 21154551). Cell pellets were resuspended in 300 µl of buffer A (250 mM sucrose, 250mM KCl, 5mM MgCl₂,and 50mM Tris-HCl, pH 7.4) and lysed in 0.7% NP-40 for 15 min on ice. Nuclei and mitochondria were removed by two successive centrifugations at 750g and 12,000g, respectively. The concentration of KCl in the supernatants was adjusted to 500 mM, and samples were deposited above a 1 M sucrose cushion containing 500 mM KCl. Ribosome pellets were obtained after ultracentrifugation at 75,000 rpm for 2 hours at 4°C in a TL100 ultracentrifuge (Beckman™) and resuspended in 100 µL of buffer C (25mM KCl, 5mM MgCl₂, and 50mM Tris-HCl, pH 7.4). Ribosomes were quantified by measuring the optical density (OD) at 260 nm as described by Diaz *et al.*, 2002 (PMID:12016002).

CONCLUSION ET DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Rôle du facteur de biogenèse des ribosomes Rsl24d1 dans l'homéostasie des CSE murines

a. Rôle de Rsl24d1 dans l'homéostasie des cellules souches

L'expression de Rsl24d1 diminue rapidement au cours de la différenciation en corps embryoïdes. Ce modèle de différenciation mime les étapes de différenciation physiologique ayant lieu au stade blastocyste précoce du développement embryonnaire *in vivo*. Des expériences de déplétion de Rsl24d1 nous ont permis de démontrer que ce facteur de biogenèse des ribosomes est indispensable au maintien de l'homéostasie des CSE murines i.e. le maintien de leur prolifération et de leur clonogénicité *in vitro*. Des expériences préliminaires ont montré un impact modéré de la déplétion de Rsl24d1 sur la pluripotence des mESCs et nécessitent d'être validées. L'ensemble de ces résultats suggère donc que Rsl24d1 est requis dans l'homéostasie des CSE murines à l'état de pluripotence naïf.

Pour préciser le rôle de Rsl24d1 dans l'homéostasie des CSE pluripotentes comparées aux cellules différenciées, de façon complémentaire aux approches de déplétion de *Rsl24d1* par interférence à ARN mises en place au cours de ma thèse dans les CSE murines, des modèles de déplétion conditionnelle de *Rsl24d1* seront mis en place. Ces modèles permettront une déplétion inductible de la protéine de biogenèse des ribosomes à la fois dans les cellules pluripotentes et dans les cellules différenciées (corps embryoïdes). Ainsi, il sera possible d'évaluer si la déplétion de Rsl24d1 a un impact sur la biogenèse des ribosomes dans les cellules différenciées issues des CSE murines. Ces expériences contribueraient en effet à démontrer une régulation spécifique de la biogenèse des ribosomes au cours des différents états développementaux et au cours des transitions entre ces états. De plus, si la biogenèse des ribosomes de progéniteurs et/ou de cellules différenciées est indépendante de Rsl24d1, il est possible qu'un ou plusieurs autres facteurs prennent le relai et assurent la fonction de Rsl24d1 dans la biogenèse de la sous-unité 60S, de manière similaire au mécanisme décrit pour le facteur Notchless dans les cellules souches hématopoïétiques¹³⁷.

Une autre façon d'évaluer le rôle différentiel de Rsl24d1 dans les cellules pluripotentes comparées aux cellules différenciées pourrait être de suivre le profil d'expression de Rsl24d1 au cours de la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC. Il serait en effet intéressant d'évaluer dans quelle mesure, le maintien d'une expression exogène stable de Rsl24d1 au sein de cellules somatiques pourrait contribuer ou faciliter la reprogrammation en cellules pluripotentes induites. Cette approche permettrait de mettre en évidence le rôle de Rsl24d1 dans le maintien d'une voie de biogenèse des ribosomes indispensable à l'identité des cellules souches pluripotentes.

D'autre part, il serait également pertinent d'évaluer le profil d'expression de Rsl24d1 et son rôle potentiel dans d'autres modèles de cellules souches et plus particulièrement les cellules souches adultes comme les neuroblastes, les cellules souches hématopoïétiques ou les cellules souches germinales dans lesquelles des différentiels d'expression de facteurs de biogenèse des ribosomes ont déjà été décrits au sein de la littérature²⁷⁹.

Enfin, l'évaluation de l'expression de Rsl24d1 au cours du développement embryonnaire *in vivo* pourra apporter des indications importantes sur l'implication potentielle de Rsl24d1 dans les étapes précoces du développement embryonnaire chez les mammifères. Les délétions de la Fibrillarine et de Notchless par exemple aboutissent à un arrêt développemental précoce avant l'implantation chez l'embryon murin²⁷⁹. Aux vues du phénotype hautement reproductible obtenu par déplétion de Rsl24d1 sur l'homéostasie des cellules souches embryonnaires, il est probable que la délétion du facteur de biogenèse de la sous-unité 60S conduise de façon similaire à Nle et à la Fbl à un arrêt développemental précoce. Toutefois, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que la délétion de Rsl24d1 conduise à une altération plus restreinte et tissu-spécifique au cours de l'embryogenèse. Cette seconde hypothèse suggérerait que Rsl24d1 joue un rôle plus spécifiquement dans l'homéostasie de cellules progénitrices nécessaires au maintien de certains tissus au cours du développement embryonnaire. Des modèles de délétion de Rsl24d1 *in vivo* seront donc indispensables pour mieux caractériser le rôle de Rsl24d1 dans l'homéostasie des cellules souches chez les mammifères.

b. Rsl24d1 et la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches : une régulation quantitative ?

Le rôle du contrôle de la biogenèse des ribosomes sur la régulation de l'expression de programmes géniques a longtemps été considéré comme une fonction quantitative permettant d'augmenter la synthèse protéique globale en fonction des besoins cellulaires. En effet, différentes études ont montré qu'un taux de transcription des ARNr plus important était indispensable dans les CSE murines comparées à leurs descendances différenciées. D'autre part, 17 facteurs de transcription de la pluripotence dont Oct4 ont été identifiés au niveau de loci de l'ADNr au sein des CSE murines⁴³⁵ et un fort taux de transcription des ARNr est en général corrélé à un taux accru de synthèse protéique.

D'autre part, au cours de la différenciation, la transcription de l'ARNr est restreinte par les facteurs de transcription lignées spécifiques⁴³⁶. Jusqu'à présent, cette diminution de la transcription des ARNr était perçue comme une conséquence de l'activation des programmes de différenciation. Cependant, des études récentes ont mis en évidence qu'une diminution de la transcription des ARNr pouvait à

elle seule orchestrer le processus de différenciation et était indispensable à la survie des cellules souches².

Dans ce contexte, le facteur de biogenèse des ribosomes Rsl24d1, pourrait contribuer à l'homéostasie des CSE murines en permettant le maintien d'une activité de biogenèse des ribosomes élevée et un taux de synthèse protéique accru au sein des CSE murines. En effet, la déplétion de Rsl24d1 semble diminuer de façon importante la synthèse de protéines naissantes (Figure 5). Cette expérience reste toutefois préliminaire et nécessite d'être répétée pour confirmer cette conclusion. En effet, cette expérience souffre d'une trop grande variabilité entre les réplicats biologiques, notamment en raison d'une forte mortalité cellulaire suite à la déplétion de Rsl24d1 et par conséquent d'un nombre de cellules marquées variable et faible. D'autre part, la concentration des réactifs permettant d'effectuer la réaction de Click avec l'azido-homoalanine (AHA) devra être optimisée pour diminuer l'intensité du signal de fond et discriminer plus facilement les cellules marquées lors de la quantification automatisée (microscope HCS Operetta®, PerkinElmer). Toutefois, bien que les résultats de nos marquages métaboliques soient préliminaires, le modèle de différenciation en corps embryoïde à partir duquel l'enrichissement de Rsl24d1 a été validé, a été associé à une diminution globale de la synthèse protéique³. Cette étude a en effet démontré que cette diminution globale de la synthèse protéique au cours de la différenciation contribuait à la dégradation préférentielle des protéines instables ayant un temps de demi-vie court. Les facteurs de transcription de la pluripotence comme Nanog, Esrrb, Tfcp2l1, Klf4, Oct4 et Sox2 ayant un temps de demi vie de 90 min seraient ainsi rapidement dégradés au cours de la différenciation³. La biogenèse des ribosomes participerait ainsi indirectement à l'homéostasie des CSE murines et à leur engagement vers la différenciation en contrôlant le niveau d'expression protéique de régulateurs transcriptionnels de la pluripotence.

Une étude a toutefois récemment suggéré qu'une diminution globale de la synthèse protéique puisse être associée à une augmentation sélective de la traduction de certains groupes d'ARNm dans un modèle cellulaire de carcinome colorectal³⁸⁵. Il est donc possible d'imaginer que la diminution de synthèse protéique associée à la diminution de l'expression de Rsl24d1 dans les CSE murines puisse être associée à une augmentation spécifique de la traduction de certaines sous-populations de transcrits facilitant la transition entre l'état de pluripotence et l'état différencié. Des expériences de profilages de ribosomes (ou « Ribosome Profiling ») au sein de CSE murines contrôle et déficientes pour Rsl24d1 permettront de discriminer le rôle de Rsl24d1 dans la régulation spécifique de la traduction de sous-populations de transcrits et la régulation qualitative de l'activité traductionnelle.

c. Le niveau d'expression de *Rsl24d1* est contrôlé dans les CSE murines

La génération de lignées stables de CSEm surexprimant de façon inducible *Rsl24d1* au laboratoire montre que suite à l'induction de l'expression exogène de *Rsl24d1*, l'expression de *Rsl24d1* endogène est proportionnellement diminuée. Ce résultat suggère fortement que *Rsl24d1* doit être maintenue dans une fenêtre d'expression spécifique au sein des CSE murines. En effet, la somme des expressions exogènes et endogènes de *Rsl24d1* semble constante dans notre modèle de CSE murines. Il sera donc important d'évaluer l'impact de la surexpression de *Rsl24d1* sur la composition et sur l'activité traductionnelle des ribosomes dans les CSE murines, ainsi que sur le phénotype des CSEm i.e. leur clonogénicité, leur prolifération et leur capacité à se différencier en corps embryoïdes fonctionnels et à générer des progéniteurs exprimant des marqueurs des trois feuilletts embryonnaires. Cette approche de surexpression sera ainsi une approche complémentaire à celle des CSE murines déplétées en *Rsl24d1* pour élucider l'impact de *Rsl24d1* sur la machinerie traductionnelle et sur l'homéostasie des CSE murines. L'expression de *Rsl24d1* étant hautement contrôlée au sein des CSE murines, la diminution comme l'augmentation de l'expression de ce facteur de biogenèse des ribosomes pourrait perturber la biogenèse des ribosomes et l'homéostasie des CSE murines. Il est possible d'imaginer l'existence de mécanismes de rétrocontrôle permettant de maintenir l'expression de *Rsl24d1* constante dans les CSE murines. Ces boucles de rétrocontrôle pourraient faire intervenir les extrémités 3' ou 5'-UTR du transcrit *Rsl24d1*, des composants de la machinerie traductionnelle (PR ou ARNr) ou bien des régulations transcriptionnelles de l'expression de *Rsl24d1* par des facteurs de transcription de la pluripotence comme Oct4, Sox2 ou Nanog.

D'autre part, parallèlement à la surexpression exogène de *Rsl24d1* induite par la doxycycline, on observe une diminution progressive de l'expression de *Rpl24/eL24* qui devient presque indétectable. Ce résultat préliminaire suggère l'existence d'une boucle de rétrocontrôle ou d'une liaison compétitive entre *Rsl24d1* et *Rpl24/eL24* pour la liaison du ribosome au sein des CSE murines. En effet, d'après les données structurales et expérimentales obtenues chez la levure, *Rlp24(Rsl24d1)* et *Rpl24* possèdent le même site de liaison sur le ribosome et il est possible que la surexpression de *Rsl24d1* déplace *Rpl24* de son site de liaison ou l'empêche de se lier aux ribosomes. La protéine *Rpl24* libre pourrait ensuite intégrer des voies cellulaires de recyclage ou de dégradation spécifiques des protéines. Il est également possible que la surexpression de *Rsl24d1* perturbe globalement la biogenèse des ribosomes et que l'expression de toutes les protéines ribosomiques suive le même profil que *Rpl24* suite à l'induction de l'expression de *Rsl24d1* par la doxycycline. Il sera donc important d'évaluer le niveau d'expression d'autres protéines ribosomiques au cours de la surexpression de *Rsl24d1*. Cette expérience nous permettra d'évaluer si la surexpression de *Rsl24d1* affecte de façon globale la composition de la machinerie traductionnelle ou si son effet semble plus spécifique.

2. Impact de Rsl24d1 sur la biogenèse de la sous-unité 60S

a. Étapes de maturation des pré-ARNr affectées par la déplétion de Rsl24d1

L'homologue de Rsl24d1 chez la levure Rlp24, est impliqué dans la maturation des pré-ARNr. En effet, une forme mutante de *Rlp24* aboutit à l'accumulation des précurseurs 27SB, 35S et la formation du précurseur aberrant 23S suggérant à la fois un rôle direct de Rlp24 dans le clivage des pré-ARNr 27SB et un rôle indirect dans l'accumulation des pré-ARNr 35S et 23S^{273,305,310,463}. Nos résultats démontrent que chez la souris, comme chez la levure, Rsl24d1 est impliqué dans la maturation de la sous-unité ribosomiques 60S et est détectée à la fois dans la fraction nucléaire et cytoplasmique. D'autre part, nos résultats démontrent que les ARNr 28S sont légèrement diminués comparés aux ARNr 18S dans les CSE murines déficientes pour Rsl24d1. Ces données, bien que non significatives statistiquement suggèrent un rôle de Rsl24d1 dans la maturation de l'ARNr 28S. Il sera donc important d'évaluer précisément les étapes de clivages des pré-ARNr qui sont affectées par la déplétion de Rsl24d1. Pour cela, des approches de Northern Blot sont actuellement développées au sein du laboratoire. Ces approches nous permettront d'identifier quels précurseurs de pré-ARNr s'accumulent en l'absence de Rsl24d1 et par conséquent dans quelles étapes de clivage est impliqué Rsl24d1 dans les CSE murines.

b. Interaction entre Rsl24d1 et Rpl24/eL24

Chez les levures *S.cerevisiae*, Rlp24 (Rsl24d1) est décrit comme un facteur navette, associé à la fois dans la fraction nucléaire et la fraction cytoplasmique aux particules pré-60S, nucléolaires précoces et cytoplasmiques tardives. Juste après l'export cytoplasmique de la particule pré-60S, différents facteurs associés aux ribosomes assurent le remplacement de Rlp24 par la protéine ribosomique mature Rpl24/eL24. Ainsi, chez la levure, Rpl24 est détectée exclusivement dans la fraction cytoplasmique. La séquentialité de ce processus de maturation de la sous-unité 60S constitue un mécanisme de surveillance de l'intégrité de la biogenèse des ribosomes s'assurant que seules les particules ribosomiques compétentes soient libérées pour initier la traduction.

De façon intéressante, dans les CSE murines, Rsl24d1 est comme chez la levure associée à la fois aux pré-ribosomes nucléaires et aux particules 60S cytoplasmiques libres. Toutefois, contrairement aux données chez la levure, dans les CSE murines, suite à nos expériences de fractionnement nucléo-cytoplasmiques, Rpl24 est détectée à la fois dans la fraction nucléaire et cytoplasmique. Toutefois, la localisation nucléaire de Rpl24 doit être validée dans les CSEm en réalisant de nouveaux protocoles de fractionnement nucléocyttoplasmiques pour s'assurer qu'aucune contamination de la fraction nucléaire par la fraction cytoplasmique ne pourrait expliquer la détection de Rpl24 au sein du noyau. Le protocole de fractionnement nucléo-cytoplasmiques a été réalisé plusieurs fois, toutefois, son

optimisation est complexe en raison de la fragilité des membranes des CSE murines. En gardant bien à l'esprit les limites des résultats de fractionnement, la localisation nucléaire de Rpl24 suggérerait la co-existence de deux sous-populations différentes de ribosomes dans les CSE murines, l'une avec Rsl24d1 l'autre avec Rpl24/eL24. Ces deux populations de ribosomes pourraient utiliser différentes voies de biogenèse des ribosomes et/ou pourraient aboutir à des ribosomes présentant une composition et peut-être une activité traductionnelle différentes. En ce sens, des études récentes combinant des approches de co-immunoprécipitation à des approches de profilage de ribosomes ont mis en évidence l'hétérogénéité de la composition en protéines ribosomiques des ribosomes dans les CSE murines¹. Cette hétérogénéité semble conférer aux ribosomes une affinité particulière pour la traduction de sous-groupes de transcrits impliqués notamment dans le contrôle du métabolisme cellulaire, les régulations du cycle cellulaire et le développement. L'hétérogénéité des protéines ribosomiques contribue donc au réseau post-transcriptionnel de régulation de l'expression génique au sein des CSE murines. Il sera donc indispensable d'évaluer si Rsl24d1 et Rpl24/eL24 sont mutuellement exclusifs sur les ribosomes matures et sur les particules pré-60S par des approches de co-immunoprécipitation couplées à des analyses en Western-blot ou à des analyses de spectrométrie de masse. Ces expériences nous permettront d'établir si les protéines Rpl24/eL24 détectées dans la fraction nucléaire sont effectivement liées aux pré-ribosomes ou bien si elles se trouvent simplement dans la fraction nucléaire suggérant alors plutôt une fonction extra-ribosomique. D'autre part, des expériences de cryomicroscopie électronique des particules pré-ribosomiques 60S et des sous-unités 60S matures au sein des CSE murines permettront d'établir si Rpl24/eL24 et Rsl24d1 possèdent bien le même site de liaison au sein des ribosomes de mammifères.

c. Identification des partenaires protéiques interagissant avec Rsl24d1

L'identification des partenaires interagissant avec Rsl24d1, tout au long de la maturation des particules pré-60S sera nécessaire pour progresser dans la caractérisation moléculaire de Rsl24d1 dans les CSE murines. Ainsi, on peut se demander si les facteurs homologues à ceux identifiés chez la levure interagissent avec Rsl24d1. Rsl24d1 est-il associé physiquement avec l'extrémité C-terminale de l'homologue mammifère de la GTPase Nog1 ? Est-il possible de détecter Rsl24d1 au sein des particules pré-60S purifiées à partir de Nog1 ou de Nog2 ? L'homologue mammifère de l'AAA-ATPase Drg1 catalyse-t-il l'extraction de Rsl24d1 des pré-particules 60S au sein du cytoplasme et son remplacement par la protéine ribosomique mature Rpl24/eL24 ? D'autre part, si d'autres facteurs interagissent avec Rsl24d1 chez la souris, quels pourraient être leurs rôles ?

L'identification des partenaires interagissant avec Rsl24d1 permettra ainsi de progresser dans la compréhension de la voie de biogenèse de la sous-unité 60S chez les mammifères et ultimement

permettra peut-être l'identification d'inhibiteurs de la biogenèse des ribosomes plus spécifiques chez les mammifères. Certains inhibiteurs ont ainsi déjà été développés chez la levure⁴⁰⁶.

d. Rsl24d1, un facteur anti-associatif comme eIF6 ?

Comme décrit précédemment, le facteur eIF6 (Tif6 chez la levure) est un facteur anti-associatif: sa liaison à la sous-unité 60S prévient l'association à la sous-unité 40S. eIF6 exerce un rôle important dans le contrôle traductionnel impliqué dans l'homéostasie tissulaire en condition physiologique et en condition pathologique notamment dans le syndrome de Schwachman Diamond et dans certains cancers^{142,473}. eIF6 constitue en effet un mécanisme de surveillance de la synthèse de la pré-particule 60S. eIF6 se situe sur la sous-unité 60S à l'interface avec la sous-unité 40S et interagit physiquement avec les protéines ribosomiques Rpl23/uL14 et Rpl24/eL24. La proximité de liaison entre eIF6 et Rpl24/eL24 et la liaison hypothétique de Rsl24d1 au même site au sein de la sous-unité 60S suggère que Rsl24d1 soit également situé à une interface entre la sous-unité 60S et 40S. Rsl24d1 pourrait également être un facteur anti-associatif chez les mammifères. Des études de cryo-microscopie électronique à partir de pré-particules 60S permettront d'explorer cette hypothèse.

3 Rôle de Rsl24d1 dans d'autres tissus adultes et en conditions pathologiques

Un article publié récemment a démontré que la cytotoxicité de l'oxaliplatine, un agent chimiothérapeutique dérivé des sels de platine largement utilisé en clinique, jusque là supposé agir en activant les voies de dommages de l'ADN, agissait en réalité en induisant un stress de la biogenèse des ribosomes. Le mode d'action de l'oxaliplatine diffère donc de ces analogues comme le cisplatine dont la toxicité est basée sur la création de dommages à l'ADN¹⁷⁸.

De manière intéressante, dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre la sensibilité à l'oxaliplatine et une forte expression transcriptionnelle de *RSL24D1* dans différentes lignées cellulaires tumorales. Les auteurs suggèrent que cette sensibilité à l'oxaliplatine dans les cellules cancéreuses soit due à une « addiction » de ces cellules à un niveau de traduction élevé, comme en témoigne la forte expression du facteur de biogenèse des ribosomes *RSL24D1*. Ces cellules cancéreuses seraient donc plus sensibles aux stress affectant la biogenèse des ribosomes car dépendantes de ce niveau de traduction. De plus, une analyse d'enrichissement de l'expression de gènes (ou « Gene Set Enrichment Analysis ») a démontré rétrospectivement que les gènes codant pour des composants du ribosome étaient les gènes permettant de mieux discriminer la réponse des patients à l'oxaliplatine : les patients atteints de cancers colorectaux étaient considérés comme

sensibles alors que les patients atteints de cancers de l'ovaire étaient considérés comme résistants à l'oxaliplatine.

D'autre part, les altérations cellulaires augmentant l'activité de la machinerie traductionnelle (activations constitutives de la voie mTOR), induisent une résistance aux chimiothérapies classiques. Différents inhibiteurs de la voie mTOR ont ainsi reçu l'autorisation de mise sur le marché dans différentes pathologies par la FDA et l'EMA, notamment dans les cancers du rein métastatiques (évérolimus). L'activité traductionnelle semble donc être prédictive de réponse aux traitements dans différents cancers.

Dans ce contexte pathologique, mon travail de thèse mettant en évidence le rôle de Rsl24d1 dans l'homéostasie des CSE murines pourrait être partiellement transposé à l'étude des mécanismes moléculaires du maintien des cellules cancéreuses. En effet, les cellules souches et les cellules cancéreuses partagent des propriétés biologiques comme un fort taux de prolifération cellulaire, un état indifférencié et un besoin métabolique important caractérisé par une biogenèse des ribosomes accrue. D'autre part, certains facteurs de transcription embryonnaires sont ré-activés de manière aberrante au sein des cellules cancéreuses et participent activement au processus de tumorigenèse aux étapes précoces et tardives⁴⁷⁴⁻⁴⁷⁷. Il est donc possible de supposer que RSL24D1 puisse avoir un rôle fonctionnel dans le maintien de lignées de cellules cancéreuses parmi lesquelles des lignées de carcinomes colorectaux. RSL24D1 pourrait donc contribuer à l'« addiction » à la traduction décrite par les auteurs dans ce contexte pathologique. Il sera donc très intéressant d'évaluer en détail les interactions entre RSL24D1 et l'oxaliplatine : la cytotoxicité de l'oxaliplatine est-elle médiée en ciblant RSL24D1 ? Ou bien est-ce que l'oxaliplatine altère la biogenèse des ribosomes à un autre niveau ? La cytotoxicité de l'oxaliplatine est-elle dépendante de l'activation de p53 par le stress nucléolaire ? Pour répondre à ces questions, le modèle des CSE murines constitue un outil pertinent avec une forte expression de Rsl24d1 pour modéliser l'activité de l'oxaliplatine dans les cellules cancéreuses enrichies en *RSL24D1*. Ces travaux permettront peut-être dans l'avenir le développement de stratégies thérapeutiques perturbant la biogenèse des ribosomes de manière plus ciblée et ainsi moins toxique. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer si d'autres facteurs de biogenèse des ribosomes sont surexprimés dans certains cancers et pourraient servir de biomarqueurs et/ou de cibles thérapeutiques en participant à l'« addiction » à la traduction dans ces cellules tumorales.

4. Conclusion

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis de caractériser le rôle d'une protéine de biogenèse des particules ribosomiques pré-60S particulièrement enrichie dans les cellules souches embryonnaires murines. Les approches expérimentales développées suggèrent que des facteurs de biogenèse spécifiques et/ou des voies de biogenèse des ribosomes particulières soient indispensables à l'homéostasie des cellules souches embryonnaires murines.

Le rôle des régulations de la biogenèse des ribosomes est en effet de plus en plus reconnu chez les mammifères et dans les cellules souches pluripotentes. Toutefois, peu de données fonctionnelles sont disponibles sur la régulation de ce processus dans les cellules souches embryonnaires *in vitro*. Certains composants de la machinerie de biogenèse des ribosomes ont toutefois récemment été décrits comme impliqués dans le maintien des propriétés particulières des cellules souches embryonnaires, notamment leur clonogénicité et leur pluripotence. Ainsi, l'activité de la Fibrillarine, une méthyltransférase contribuant à la maturation des ARNr et l'activité de certains facteurs de maturation de la sous-unité 40S ont été impliqués dans l'homéostasie des cellules souches embryonnaires murines. Dans ce contexte, le facteur de maturation tardif des particules pré-60S Rsl24d1 constituerait un autre acteur spécifique de la biogenèse des ribosomes des cellules souches embryonnaires murines à l'état de pluripotence naïf. L'ensemble de ces facteurs orchestrerait une voie de biogenèse des ribosomes particulière participant aux réseaux complexes de régulations de l'expression génique au sein des cellules souches embryonnaires. Ces facteurs pourraient conférer aux cellules pluripotentes une adaptabilité et une plasticité accrue *in vitro* et peut-être également *in vivo* au cours du développement embryonnaire. D'autre part, l'étude des facteurs de maturation de la sous-unité 40S et les résultats de mes travaux de thèse suggèrent que cette voie de biogenèse des ribosomes particulière orchestre le maintien d'une synthèse protéique globale importante assurant le renouvellement des facteurs de transcription de la pluripotence au niveau protéique au sein des cellules souches embryonnaires. Toutefois, des études plus approfondies sont nécessaires pour évaluer plus précisément les relations mécanistiques entre la protéine de biogenèse des ribosomes Rsl24d1 et l'homéostasie des cellules souches embryonnaires. En effet, Rsl24d1 pourrait également contribuer à la formation de ribosomes particuliers ayant une affinité préférentielle pour la traduction de certaines sous-populations de transcrits indispensables à l'homéostasie des cellules souches embryonnaires. Des approches de profilages polysomiques permettront d'évaluer cette possibilité. D'autre part, des données protéomiques sur la composition des ribosomes cytoplasmiques en présence ou en l'absence de Rsl24d1 pourraient apporter de nouvelles informations sur le rôle de la régulation de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches embryonnaires murines.

Enfin, l'évaluation du rôle de Rsl24d1 sur la biogenèse des ribosomes dans d'autres modèles de cellules souches embryonnaires et adultes et dans des modèles pathologiques, notamment dans les carcinomes colorectaux dans lesquels *RSL24D1* est enrichi permettra de progresser dans la compréhension de la contribution de ce facteur de biogenèse des ribosomes dans l'homéostasie des cellules souches.

BIBLIOGRAPHIE

1. Shi, Z. *et al.* Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* **32**, 710–714 (2017).
2. Watanabe-Susaki, K. *et al.* Biosynthesis of Ribosomal RNA in Nucleoli Regulates Pluripotency and Differentiation Ability of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* **32**, 3099–111 (2014).
3. You, K. T., Park, J. & Kim, V. N. Role of the small subunit processome in the maintenance of pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 2004–2009 (2012).
4. Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J.-J. Ribosome heterogeneity in tumorigenesis: the rRNA point of view. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e983755 (2015).
5. Marcel, V. *et al.* p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* **24**, 318–30 (2013).
6. Boroviak, T., Nichols, J. & Nichols, J. The birth of embryonic pluripotency. *Philos. Trans. R. Soc. Trans. R. Soc.* **369**, (2014).
7. Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A. & Nichols, J. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* **16**, 513–526 (2014).
8. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
9. Stevens Leroy C., L. C. C. SPONTANEOUS TESTICULAR TERATOMAS IN AN INBRED STRAIN OF MICE*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**, 1080–1087 (1954).
10. LEWIS J. KLEINSMITH AND G. BARRY PIERCE, J. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma cells. *Cancer Res.* (1964).
11. Martello, G. & Smith, A. The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 647–675 (2014).
12. Martin, G. R. & Evans, M. J. Differentiation of Clonal Lines of Teratocarcinoma Cells : Formation of Embryoid Bodies In Vitro. **72**, 1441–1445 (1976).
13. Evans, M. Discovering pluripotency : 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 680–686 (2011).
14. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. & Evans, M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* (1986).
15. Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L. & Melton, D. W. Germ Line Transmission and Expression of a Corrected HPRT Gene Produced by Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. **56**, 313–321 (1988).

16. Kalkan, T. *et al.* Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. (2016).
17. Hirai, H., Karian, P. & Kikyo, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. **23**, 11–23 (2011).
18. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* **12**, 2048–2060 (1998).
19. Chen, X. *et al.* Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* **133**, 1106–1117 (2008).
20. Ohtsuka, S., Nakai-Futatsugi, Y. & Niwa, H. LIF signal in mouse embryonic stem cells. *Jak-Stat* **4**, 1–9 (2015).
21. Ying, Q., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281–292 (2003).
22. Ying, Q.-L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523 (2008).
23. Benezra, R. Role of Id Proteins in Embryonic and Tumor Angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 237–241 (2001).
24. Norton, J. D. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* **3905**, 3897–3905 (2000).
25. Guo, X. & Wang, X. Signaling cross-talk between TGF- β / BMP and other pathways. 71–88 (2009).
26. Wilder, P. J. *et al.* Inactivation of the FGF-4 Gene in Embryonic Stem Cells Alters the Growth and / or the Survival of Their Early Differentiated Progeny. **629**, 614–629 (1997).
27. Kunath, T. *et al.* FGF stimulation of the Erk1 / 2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. **2902**, 2895–2902 (2007).
28. Lanner, F. & Rossant, J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* **137**, 3351–3360 (2010).
29. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. **10**, 55–63 (2004).
30. Doble, B. W., Patel, S., Wood, G. A., Kockeritz, L. K. & Woodgett, J. R. Functional Redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt / β -Catenin Signaling Shown by Using an Allelic Series of Embryonic Stem Cell Lines. *Dev. Cell* **12**, 957–971 (2007).
31. Doble, B. W. & Woodgett, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.*

- 116**, 1175–86 (2003).
32. Berge, D. *et al.* Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1070–1075 (2011).
 33. Clevers, H. Wnt / β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **127**, 469–480 (2006).
 34. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
 35. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/b-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).
 36. Merrill, B. J., Gat, U., Dasgupta, R. & Fuchs, E. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.* **15**, 1688–1705 (2001).
 37. Merrill, B. J. *et al.* Tcf3 : a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* **131**, 263–274 (2004).
 38. Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A. & Hannah, R. Article Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3 / Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal. 491–504 (2012).
 39. Wu, C. *et al.* Function of Wnt / b-catenin in counteracting Tcf3 repression through the Tcf3 – b-catenin interaction. *Dev. stem cellsevelopment stem cells* **139**, 2118–2129 (2012).
 40. Wray, J. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 838–845 (2011).
 41. Silva, J. & Smith, A. Capturing Pluripotency. *Cell* **132**, 532–536 (2008).
 42. Choi, J. *et al.* Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **548**, 219–223 (2017).
 43. White, J. & Dalton, S. Cell Cycle Control of Embryonic Stem Cells. 131–138 (2005).
 44. Abdelalim, E. M. Molecular Mechanisms Controlling the Cell Cycle in Embryonic Stem Cells. *Stem cell Rev. reports* **9**, 764–773 (2013).
 45. BOWARD, B., WU, T. & DALTON, S. Concise Review : Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells* **34**, 1427–1436 (2016).
 46. Soufi, A. & Dalton, S. Cycling through developmental decisions : how cell cycle dynamics control pluripotency , differentiation and reprogramming. *Co. Biol.* **143**, 4301–4311 (2016).
 47. Nichols, J. & Smith, A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* **4**, 487–492 (2009).
 48. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **131**, 663–676 (2006).
 49. Boroviak, T. *et al.* Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev. Cell* **35**, 366–382 (2015).
 50. Morgani, S., Nichols, J. & Hadjantonakis, A. The many faces of Pluripotency : in vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Dev. Biol.* **17**, 10–12 (2017).

51. Wray, J., Kalkan, T. & Smith, A. G. The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1027–32 (2010).
52. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
53. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. S. Viable Offspring Derived from Fetal And Adult Mammalian Cells. *Cloning Stem Cells* **9**, 3–7 (2007).
54. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).
55. Smith, A. G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688–690 (1988).
56. Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell* **10**, 678–684 (2012).
57. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **448**, 313–318 (2007).
58. Chin, M. H. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell* **5**, 111–123 (2012).
59. Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z. & Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**, 212–216 (2011).
60. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-.). **282**, 1145–1147 (1998).
61. Brons, I. G. M. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191–195 (2007).
62. Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196–199 (2007).
63. Coucouvanis, E. & Martin, G. R. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* **126**, 535–546 (1999).
64. Welling, M. & Geijsen, N. Uncovering the true identity of naïve pluripotent stem cells. *Trends Cell Biol.* **23**, 442–448 (2013).
65. Fluckiger, A.-C. *et al.* Cell Cycle Features of Primate Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **24**, 547–556 (2006).
66. Teslaa, T. & Teitell, M. A. Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *EMBO J.* **34**, 138–153 (2015).
67. Kumari, D. States of Pluripotency : Naïve and Primed Pluripotent Stem Cells. (2016).
68. Chenoweth, J. G. & Tesar, P. J. Isolation and maintenance of mouse epiblast stem cells. *Methods Mol. Biol.* **636**, 25–44 (2010).

69. Schnerch, A., Cerdan, C. & Bhatia, M. Distinguishing Between Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Regulation : The Best Laid Plans of Mice and Men. *Stem Cells* **28**, 419–430 (2010).
70. Levenstein, M. E. *et al.* Basic FGF Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells* **24**, 568–574 (2015).
71. Theunissen, T. W. *et al.* Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell* **19**, 502–515 (2016).
72. Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**, 1063–1069 (2009).
73. Gardner, R. L. & Brook, F. A. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. **243**, 235–243 (1997).
74. Nichols, J. & Smith, A. The origin and identity of embryonic stem cells. **8**, 3–8 (2011).
75. O'Connor, M. D. *et al.* Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 1109–1116 (2008).
76. Chambers, I. & Tomlinson, S. R. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* **136**, 2311–2322 (2009).
77. Wesselschmidt, R. L. The teratoma assay: an in vivo assessment of pluripotency. *Methods Mol. Biol.* **767**, 231–241 (2011).
78. Coulombel, L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Med. Sci.* **25**, 798–801 (2009).
79. Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–1234 (2007).
80. Macarthur, B. D. & Lemischka, I. R. Statistical mechanics of pluripotency. *Cell* **154**, 484–489 (2013).
81. Stumpf, P. S. *et al.* Stem Cell Differentiation as a Non-Markov Stochastic Process. *Cell Syst.* **5**, 268–282.e7 (2017).
82. Herberg, M., Kalkan, T., Glauche, I., Smith, A. & Roeder, I. A model-based analysis of culture-dependent phenotypes of mESCs. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
83. Keller, G. M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 862–869 (1995).
84. Smith, A. G. Embryo-Derived Stem cells: Of Mice and Men. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 435–62 (2001).
85. Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. & Kemler, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**, 27–45 (1985).

86. Fathi, F. & Altiraihi, A. T. Formation of embryoid bodies from mouse embryonic stem cells cultured on silicon-coated surfaces. 11–16 (2009).
87. Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K. V. & Nagy, A. Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies by Hanging-Drop Cultures. 1073–1077 (2016).
88. Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science (80-.)*. **265**, 1098–1101 (1994).
89. Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N. & Kodama, H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* **125**, 1747–1757 (1998).
90. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* **19**, 1129–1155 (2005).
91. Murry, C. E. & Keller, G. Review Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell* **132**, 661–680 (2008).
92. Turner, D. A., Baillie-Johnson, P. & Martinez Arias, A. Organoids and the genetically encoded self-assembly of embryonic stem cells. *BioEssays* **38**, 181–191 (2016).
93. Knoblich, J. A. & Lancaster, M. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (80-.)*. **345**, (2014).
94. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* **165**, 1586–1597 (2016).
95. Meissner, A. *et al.* Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. **454**, 766–771 (2008).
96. Tee, W. & Reinberg, D. Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs. *Co. Biol.* **3**, 2376–2390 (2014).
97. Boland, M. J., Nazor, K. L. & Loring, J. F. Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation. *Circ. Res.* **10**, 311–325 (2014).
98. Rugg-gunn, P. J., Cox, B. J., Ralston, A. & Rossant, J. Distinct histone modifications in stem cell lines and tissue lineages from the early mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. Dev. Biol.* **107**, 10783–10790 (2010).
99. Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. & Ramalho-Santos, M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 36–47 (2011).
100. Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* **8**, (2006).
101. Lee, T. I. *et al.* Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **125**, 301–313 (2006).
102. Wutz, A. Epigenetic alterations in human pluripotent stem cells: a tale of two cultures. *Cell Stem Cell* **11**, 9–15 (2012).
103. Izzo, A. *et al.* Dynamic changes in H1 subtype composition during epigenetic reprogramming.

- J. Cell Biol.* **10**, 1–12 (2017).
104. Watanabe, A., Yamada, Y. & Yamanaka, S. Epigenetic regulation in pluripotent stem cells : a key to breaking the epigenetic barrier. (2012).
 105. Davenport, T. G., Jerome-majewska, L. A. & Papaioannou, V. E. Mammary gland , limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3 , the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. 2263–2273 (2003).
 106. Tang, F. *et al.* Tracing the Derivation of Embryonic Stem Cells from the Inner Cell Mass by Single-Cell RNA-Seq Analysis. *Stem Cell* **6**, 468–478 (2010).
 107. Boyer, L. a L. a. *et al.* Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Young* **122**, 947–956 (2005).
 108. Nichols, J. *et al.* Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. **95**, 379–391 (1998).
 109. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3 / 4 defines differentiation , dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **24**, 2–6 (2000).
 110. Beck, S. & Jonghwan, B. L. Multi-layered global gene regulation in mouse embryonic stem cells. 199–216 (2015).
 111. Okamoto, K. & Okazawa, H. A Novel Octamer Binding Transcription Factor Is Differentially Expressed in Mouse Embryonic Cells. **60**, 461–472 (1990).
 112. Shi, G. & Jin, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. 1–9 (2010).
 113. Deveale, B. *et al.* Oct4 Is Required , E7 . 5 for Proliferation in the Primitive Streak. **9**, (2013).
 114. Ambrosetti, D., Basilico, C. & Dailey, L. Synergistic Activation of the Fibroblast Growth Factor 4 Enhancer by Sox2 and Oct-3 Depends on Protein-Protein Interactions Facilitated by a Specific Spatial Arrangement of Factor Binding Sites. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6321–6329 (1997).
 115. Rizzino, A. & Wuebben, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 780–791 (2016).
 116. Masui, S. *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3 / 4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, (2007).
 117. Chambers, I. *et al.* Functional Expression Cloning of Nanog , a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. **113**, 643–655 (2003).
 118. Loh, Y.-H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **38**, 431–440 (2006).
 119. Silva, J. *et al.* Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* **138**, 722–737 (2009).
 120. Young, R. A. Review Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell* **144**, 940–954 (2011).
 121. Munoz Descalzo, S. *et al.* A competitive protein interaction network buffers Oct4-mediated differentiation to promote pluripotency in embryonic stem cells. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 694–694

- (2014).
122. Hnisz, D. *et al.* Convergence of Developmental and Oncogenic Signaling Pathways at Transcriptional Super-Enhancers. *Mol. Cell* **58**, 362–370 (2015).
 123. Carey, M. The Enhanceosome and Transcriptional Synergy. *Cell* **92**, 5–8 (1998).
 124. Marson, A. *et al.* Resource Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. 521–533 (2008).
 125. Lu, R. *et al.* Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. *Nature* **70**, 646–656 (2009).
 126. Hackett, J. a. & Surani, M. A. Regulatory Principles of Pluripotency: From the Ground State Up. *Cell Stem Cell* **15**, 416–430 (2014).
 127. Abujarour, R., Efe, J. & Ding, S. Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency. *Stem Cells* **28**, 1487–1497 (2010).
 128. Diana GUALLAR and Jianlong WANG. RNA-binding proteins in pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Front. Biol. (Beijing)*. **29**, 997–1003 (2014).
 129. Chen, Q. & Hu, G. Post-transcriptional regulation of the pluripotent state. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **46**, 15–23 (2017).
 130. Shi, Z. & Barna, M. Translating the Genome in Time and Space : Specialized Ribosomes , RNA Regulons , and RNA-Binding Proteins. (2015).
 131. Sampath, P. *et al.* A Hierarchical Network Controls Protein Translation during Murine Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* **2**, 448–460 (2008).
 132. Xue, S. & Barna, M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 355–369 (2012).
 133. Filipovska, A. & Rackham, O. Specialization from synthesis: How ribosome diversity can customize protein function. *FEBS Lett.* **587**, 1189–1197 (2013).
 134. Kondrashov, N. *et al.* Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**, 383–97 (2011).
 135. Truitt, M. L. *et al.* Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer Article Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. *Cell* **162**, 59–71 (2015).
 136. Zhou, F., Roy, B. & von Arnim, A. G. Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. *BMC Plant Biol.* **10**, 193 (2010).
 137. Le Bouteiller, M. *et al.* Notchless-dependent ribosome synthesis is required for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2351–69 (2013).
 138. Bulut-Karslioglu, A. *et al.* Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state. *Nature* **540**,

- 119–123 (2016).
139. Yamanaka, S. *et al.* Essential role of NAT1/p97/DAP5 in embryonic differentiation and the retinoic acid pathway. *EMBO J.* **19**, 5533–5541 (2000).
 140. Easley, C. A. *et al.* mTOR-Mediated Activation of p70 S6K Induces Differentiation of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells. *Cell. Reprogram.* **12**, 263–274 (2010).
 141. Sugiyama, H. *et al.* *Nat1* promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 340–345 (2017).
 142. Brina, D., Miluzio, A., Ricciardi, S. & Biffo, S. Biochimica et Biophysica Acta eIF6 anti-association activity is required for ribosome biogenesis , translational control and tumor progression \square . *BBA - Gene Regul. Mech.* **1849**, 830–835 (2015).
 143. Recher, G. *et al.* Zebrafish midbrain slow-amplifying progenitors exhibit high levels of transcripts for nucleotide and ribosome biogenesis. *Development* **140**, 4860–9 (2013).
 144. Gao, R. *et al.* Bmi1 promotes erythroid development through regulating ribosome biogenesis. *Stem Cells* **33**, 925–938 (2015).
 145. Fouillard, L. Cellules souches et thérapie cellulaire. *Hématologie* **13**, 64–65 (2007).
 146. ClinicalTrials.gov : Clinical trials with Induced Pluripotent stem cells. *Search Results* 10/03/2017 1–5 (2017). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=induced+pluripotent+stem+cells>. (Accessed: 10th March 2017)
 147. ClinicalTrials.gov : Embryonic stem cell base clinical trials. 2–5 (2017). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=embryonic+stem+cells+&cntry1=&state1=&Search=Search>.
 148. Nguyen, P. K., Rhee, J.-W. & Wu, J. C. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. *JAMA Cardiol.* **1**, 831–841 (2016).
 149. HAS. Brief summary of the transparency committee opinion Holoclar (amplified autologous limbal stem cells), stem cells for autologous transplant. *Ophthalmology* 2016–2017 (2017).
 150. Hirsch, T. *et al.* Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* **551**, 327–332 (2017).
 151. Park, I.-H. *et al.* Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* **134**, 877–886 (2008).
 152. Hamidi, S., Vainchenker, W., Raslova, H. & Paris, D. Cellules souches pluripotentes induites : de l' historique a ` l' application. *Hématologie* **19**, 20–32 (2013).
 153. Yamanaka, S. A Fresh Look at iPS Cells. *Cell* **137**, 13–17 (2009).
 154. Nussbaum, J. *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* **21**, 1345–1357 (2007).
 155. Roy, N. S. *et al.* Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons

- enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat. Med.* **12**, 1259–1268 (2006).
156. Kouskoff, V., Lacaud, G., Schwantz, S., Fehling, H. J. & Keller, G. Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13170–13175 (2005).
157. Wang, L. *et al.* Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* **21**, 31–41 (2004).
158. Zandstra, P. W. *et al.* Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng.* **9**, 767–778 (2003).
159. Klug, M., Soonpaa, M., Koh, G. & Li, F. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* **98**, 216–224 (1996).
160. Keirstead, H. S. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **25**, 4694–4705 (2005).
161. Laflamme, M. A. *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1015–1024 (2007).
162. Guo, G. *et al.* Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports* **6**, 437–446 (2016).
163. Palade, G. E. A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 59–67 (1955).
164. McQuillen, K., Roberts, R. B. & Britten, R. J. Synthesis of Nascent Protein By Ribosomes in Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **45**, 1437–47 (1959).
165. Palade, G. Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science (80-.).* **189**, 867–867 (1975).
166. Kirsch, J. F., Siekevitz, P. & Palade, G. E. Amino Acid Incorporation in Vitro by Ribonucleoprotein Particles Detached from Guinea Pig Liver Microsomes. *J Biol Chem* **235**, 1419–1424 (1960).
167. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
168. Cate, J. H. D. & Cate, J. H. D. Human eIF3 : from ‘ blobology ’ to biological insight. *Philos. Trans. R. Soc. Trans. R. Soc.* **372**, 1–9 (2017).
169. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2. *Science (80-.).* **289**, 905–920 (2000).

170. Yusupov, M. M. Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science (80-.)*. **292**, 883–896 (2001).
171. Ramakrishnan, V. The ribosome: Some hard facts about its structure and hot air about its evolution. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **74**, 25–33 (2009).
172. Ban, N. *et al.* A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* **93**, 1105–1115 (1998).
173. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov, M. Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science (80-.)*. **21**, 1203–1210 (2010).
174. Armache, J.-P. *et al.* Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19748–19753 (2010).
175. Anger, A. M. *et al.* Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* **497**, 80–85 (2013).
176. Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K. & Klaholz, B. P. Structure of the human 80S ribosome. *Nature* **520**, 640–645 (2015).
177. Khatter, H. *et al.* Purification, characterization and crystallization of the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
178. Bruno, P. M. *et al.* A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat. Med.* 1–13 (2017).
179. Devlin, J. R. *et al.* Combination therapy targeting ribosome biogenesis and mRNA translation synergistically extends survival in MYC-driven lymphoma. *Cancer Discov.* **6**, 59–70 (2016).
180. Yan, S. *et al.* The Potential of Targeting Ribosome Biogenesis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–17 (2017).
181. Ben-Shem, A. *et al.* The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science (80-.)*. **334**, 1524–1529 (2011).
182. Jenner, L. *et al.* Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 759–67 (2012).
183. Ban, N. *et al.* A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 165–169 (2014).
184. Macé, K., Giudice, E. & Gillet, R. La synthèse des protéines par le ribosome Un chemin semé. **31**, (2015).
185. Nissen, P. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science (80-.)*. **289**, 920–930 (2000).
186. Muth, G. W. A Single Adenosine with a Neutral pKa in the Ribosomal Peptidyl Transferase Center. *Science (80-.)*. **289**, 947–950 (2000).
187. Noller, H. F. MINIREVIEW Peptidyl Transferase : Protein , Ribonucleoprotein , RNA ? **175**,

- 5297–5300 (1993).
188. Zhang, B. & Cech, T. R. Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature* **390**, 96–100 (1997).
 189. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W. & Hall, M. N. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* **144**, 757–768 (2011).
 190. Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. & Bukau, B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 589–597 (2009).
 191. Javed, A., Christodoulou, J., Cabrita, L. D. & Orlova, E. V. The ribosome and its role in protein folding: Looking through a magnifying glass. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **73**, 509–521 (2017).
 192. Demeshkina, N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M. & Yusupova, G. A new understanding of the decoding principle on the ribosome. *Nature* **268**, 10813–10819 (2012).
 193. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**, 1234–1242 (2009).
 194. Steitz, T. A. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 242–253 (2008).
 195. Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557–572 (2002).
 196. Voorhees, R. M., Weixlbaumer, A., Loakes, D., Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **55**, 243–251 (2009).
 197. Lomakin, I. B., Gagnon, M. G. & Steitz, T. A. Antimicrobial peptides targeting bacterial ribosome. *Oncotarget* **6**, 18744–5 (2015).
 198. Bernabeu, C. & Lake, J. A. Nascent polypeptide chains emerge from the exit domain of the large ribosomal subunit: immune mapping of the nascent chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3111–5 (1982).
 199. Milligan, R. A. & Unwin, P. N. Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome. *Nature* **319**, 693–5 (1986).
 200. Bhushan, S. *et al.* α -Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 313–317 (2010).
 201. Voss, N. R., Gerstein, M., Steitz, T. A. & Moore, P. B. The Geometry of the Ribosomal Polypeptide Exit Tunnel. *J. Mol. Biol.* **360**, 893–906 (2006).
 202. Nilsson, O. B. *et al.* Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel. *Cell Rep.* **12**, 1533–1540 (2015).

203. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**, 731–745 (2009).
204. Fujii, K., Shi, Z., Zhulyn, O., Denans, N. & Barna, M. Pervasive translational regulation of the cell signalling circuitry underlies mammalian development. *Nat. Commun.* **8**, 1–13 (2017).
205. Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O. & Sonenberg, N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* **25**, 6416–6422 (2006).
206. Rafaela Lacerda;Juliane Menezes; Luisa Roma. More than just scanning : the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 1659–1680 (2017).
207. Hershey, J. W. B., Sonenberg, N. & Mathews, M. B. Principles of Translational Control : An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2012).
208. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–127 (2010).
209. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 318–327 (2005).
210. Jackson, R. J. The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–20 (2013).
211. Xue, S. *et al.* RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* (2014).
212. Sunnie Thompson. So You Want to Know if Your Message Has an IRES? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 697–705 (2013).
213. Elfakess, R. *et al.* Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7598–7609 (2011).
214. Hinnebusch, A. G. & Lorsch, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation - new insights and challenges.pdf. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–25 (2012).
215. Nandagopal, N. & Roux, P. P. Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Transl. (Austin, Tex.)* **3**, e983402 (2015).
216. Chaillou, T., Kirby, T. J. & Mccarthy, J. J. Ribosome Biogenesis: Emerging Evidence for a Central Role in the Regulation of Skeletal Muscle Mass. *J. Cell. Physiol.* **229**, 1584–1594 (2014).
217. Burgos, H. L., O'Connor, K., Sanchez-Vazquez, P. & Gourse, R. L. Roles of Transcriptional and Translational Control Mechanisms in Regulation of Ribosomal Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **199**, JB.00407-17 (2017).
218. Topisirovic, I. & Sonenberg, N. Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* **145**, 333–334 (2011).
219. Brina, D. *et al.* Translational control by 80S formation and 60S availability. *Cell Cycle* **10**, 3441–

- 3446 (2011).
220. Kaczanowska, M. & Ryden-Aulin, M. Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 477–494 (2007).
 221. Marshall, E., Stansfield, I. & Romano, M. C. Ribosome recycling induces optimal translation rate at low ribosomal availability. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20140589–20140589 (2014).
 222. Mills, E. W. & Green, R. Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science (80-.)*. **358**, eaan2755 (2017).
 223. Horos, R. *et al.* Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* **119**, 262–272 (2012).
 224. Zarai, Y., Margaliot, M. & Tuller, T. On the ribosomal density that maximizes protein translation rate. *PLoS One* **11**, 1–26 (2016).
 225. Zhou, X., Liao, W. J., Liao, J. M., Liao, P. & Lu, H. Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 92–104 (2015).
 226. Warner, J. R. & McIntosh, K. B. How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Mol. Cell* **34**, 3–11 (2009).
 227. Malygin, A. a., Parakhnevitch, N. M., Ivanov, A. V., Eperon, I. C. & Karpova, G. G. Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6414–6423 (2007).
 228. Mazumder, B. *et al.* Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* **115**, 187–198 (2003).
 229. Wan, F. *et al.* Ribosomal Protein S3: A KH Domain Subunit in NF- κ B Complexes that Mediates Selective Gene Regulation. *Cell* **131**, 927–939 (2007).
 230. Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P. & Silver, P. A. Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell* **131**, 557–571 (2007).
 231. O'Leary, M. N. *et al.* The Ribosomal Protein Rpl22 Controls Ribosome Composition by Directly Repressing Expression of Its Own Paralog, Rpl22i1. *PLoS Genet.* **9**, e1003708 (2013).
 232. Zhang, Y. *et al.* Control of hematopoietic stem cell emergence by antagonistic functions of ribosomal protein paralogs. *Dev. Cell* **24**, 411–25 (2013).
 233. Zhang, Y. *et al.* Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl22i1 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing Article Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl22i1 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing. *CellReports* **18**, 545–556 (2017).
 234. Gentilella, A. *et al.* Autogenous Control of 5' TOP mRNA Stability by 40S Article Autogenous Control of 5' TOP mRNA Stability by 40S Ribosomes. *Mol. Cell* **67**, 55–70 (2017).
 235. Baserga, S. J. W. J. L. Ribosome Biogenesis in the Yeast. *Yeastbook* **195**, 643–681 (2013).

236. Thomson, E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Cell Sci. glance* (2013).
237. Karbstein, K. Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends Cell Biol.* **23**, 242–250 (2013).
238. Kressler, D., Hurt, E. & Baßler, J. Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 673–683 (2010).
239. Kressler, D., Hurt, E. & Ba, J. Review A Puzzle of Life : Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 1–15 (2017).
240. Plisson-chastang, C., Larburu, N. & Gleizes, P. Ribosomal 60S-subunit production : the final scene. *Nat. Publ. Gr.* **22**, 837–838 (2015).
241. Thomson, E., Ferreira-Cerca, S. & Hurt, E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 4815–21 (2013).
242. Tafforeau, L. *et al.* The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors. *Mol. Cell* **51**, 539–551 (2013).
243. Thiry, M. & Lafontaine, D. L. J. Birth of a nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* **15**, 194–199 (2005).
244. Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cogley, A. & Lamond, A. I. NOPdb: Nucleolar proteome database - 2008 Update. *Nucleic Acids Res.* **37**, 181–184 (2009).
245. Pederson, T. The Nucleus Introduced. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–17 (2011).
246. McClintock, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* **21**, 294–326 (1934).
247. Mosgoeller, W. *'Nucleolar ultrastructure in vertebrates'*. (Plenum publishers, 2004).
248. Derenzini, M. *et al.* Nucleolar function and size in cancer cells. *Am. J. Pathol.* **152**, 1291–7 (1998).
249. Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. & Lamond, A. I. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585 (2007).
250. Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M. & Lamond, A. I. The Nucleolus under Stress. *Mol. Cell* **40**, 216–227 (2010).
251. Tafforeau, L. Qu'en est-il de la biogenèse des ribosomes chez l'homme ? *Medecine/Sciences* **31**, 622–627 (2015).
252. Venema, J. & Tollervey, D. *Saccharomyces cerevisiae*: *Annu. Rev. Genet.* **99**, 261–311 (1999).
253. Kressler, D., Linder, P. & de La Cruz, J. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7897–7912 (1999).
254. Kornprobst, M. *et al.* Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* **166**, (2016).
255. Mullineux, S. T. & Lafontaine, D. L. J. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs:

- Where do we stand? *Biochimie* **94**, 1521–1532 (2012).
256. Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A. & Gleizes, P.-E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**, 225–242 (2015).
 257. Wang, M., Anikin, L. & Pestov, D. G. Two orthogonal cleavages separate subunit RNAs in mouse ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11180–11191 (2014).
 258. Couté, Y. *et al.* Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 215–234 (2006).
 259. Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 437–440 (1999).
 260. Lempiäinen, H. & Shore, D. Growth control and ribosome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 855–863 (2009).
 261. Albert, B. *et al.* A Molecular Titration System Coordinates Ribosomal Protein Gene Transcription with Ribosomal RNA Synthesis. *Mol. Cell* **64**, 720–733 (2016).
 262. Sloan, K. E. *et al.* Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J. Cell Biol.* **200**, 577–588 (2013).
 263. Carron, C., O'Donohue, M. F., Choemmel, V., Faubladiet, M. & Gleizes, P. E. Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals. *Nucleic Acids Res.* **39**, 280–291 (2011).
 264. Decatur, W. A. & Fournier, M. J. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 344–351 (2002).
 265. 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* **3**, 397–414 (2012).
 266. Kornprobst, M. *et al.* Architecture of the 90S Pre-ribosome : A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome Article Architecture of the 90S Pre-ribosome : A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* **166**, 380–393 (2016).
 267. Zhang, Y., Yang, L. & Chen, L.-L. Life without A tail: New formats of long noncoding RNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2013).
 268. Atzorn, V., Fragapane, P. & Kiss, T. U17/snr30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1769–78 (2004).
 269. Ramesh, M. & Woolford, J. L. Eukaryote-specific rRNA expansion segments function in ribosome biogenesis. *Rna* **22**, 1153–1162 (2016).
 270. Pillet, B., Mitterer, V., Kressler, D. & Pertschy, B. Hold on to your friends: Dedicated chaperones of ribosomal proteins. *BioEssays* **1600153**, 1–12 (2016).

271. Pausch, P. *et al.* Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones. *Nat. Commun.* **6**, 7494 (2015).
272. Simsek, D. & Barna, M. An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *Curr. Opin. Cell Biol.* **45**, 92–101 (2017).
273. Pertschy, B. *et al.* Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6581–6592 (2007).
274. Saveanu, C. *et al.* Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4449–4460 (2003).
275. Leidig, C. *et al.* 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nat. Commun.* **5**, 3491 (2014).
276. Wu, S. *et al.* Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature* **534**, 133–137 (2016).
277. Barrio-Garcia, C. *et al.* Architecture of the Rix1–Rea1 checkpoint machinery during pre-60S-ribosome remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 37–44 (2015).
278. Ramesh, M. & Jr, J. L. W. Eukaryote-specific rRNA expansion segments function in ribosome biogenesis. 1153–1162 (2016).
279. Brombin, A., Joly, J.-S. & Jamen, F. New tricks for an old dog: ribosome biogenesis contributes to stem cell homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **34**, 61–70 (2015).
280. Phipps, K. R., Charette, J. M. & Baserga, S. J. The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 1–21 (2011).
281. Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M. & Klinge, S. Architecture of the yeast small subunit processome. *Science (80-.)*. **355**, eaal1880 (2017).
282. Schäfer, T., Strauß, D., Petfalski, E., Tollervey, D. & Hurt, E. The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J.* **22**, 1370–1380 (2003).
283. Fernández-Pevida, A., Kressler, D. & de la Cruz, J. Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**, 191–209 (2015).
284. Wells, G. R. *et al.* The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5399–5409 (2016).
285. Zhu, J., Liu, X., Anjos, M., Correll, C. C. & Johnson, A. W. Utp14 Recruits and Activates the RNA Helicase Dhr1 To Undock U3 snoRNA from the Preribosome. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 965–78 (2016).
286. Nerurkar, P. *et al.* Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **319**, 107–140 (2015).
287. Sloan, K. E., Gleizes, P. E. & Bohnsack, M. T. Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA–Protein Complexes. *J. Mol. Biol.* **428**, 2040–2059 (2016).

288. Zemp, I. *et al.* Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J. Cell Biol.* **185**, 1167–1180 (2009).
289. Ferreira-Cerca, S. *et al.* ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1316–23 (2012).
290. Kutay, U. *et al.* A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
291. Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H. & Milkereit, P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol. Cell* **20**, 263–275 (2005).
292. Léger-Silvestre, I. *et al.* The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.* **23**, 2336–2347 (2004).
293. Johnson, M. C., Ghalei, H., Doxtader, K. A., Karbstein, K. & Stroupe, M. E. Structural Heterogeneity in Pre-40S Ribosomes. *Structure* **25**, 329–340 (2017).
294. Turowski, T. W. *et al.* Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res.* **42**, 12189–12199 (2014).
295. Lebreton, A. *et al.* 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4988–4999 (2008).
296. Gasse, L., Flemming, D. & Hurt, E. Coordinated Ribosomal ITS2 RNA Processing by the Las1 Complex Integrating Endonuclease, Polynucleotide Kinase, and Exonuclease Activities. *Mol. Cell* **60**, 808–815 (2015).
297. de la Cruz, J., Karbstein, K. & Woolford, J. L. Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 93–129 (2015).
298. Konikkat, S. & Woolford, J. L. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem. J.* **474**, 195–214 (2017).
299. Dez, C. *et al.* Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6324–37 (2004).
300. Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B. & Hurt, E. The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J. Cell Biol.* **181**, 935–944 (2008).
301. Gamalinda, M. *et al.* A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes Dev.* **28**, 198–210 (2014).
302. Kressler, D., Hurt, E., Bergler, H. & Baßler, J. Biochimica et Biophysica Acta The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation — Molecular machines that strip pre-ribosomal particles. *BBA - Mol. Cell Res.* **1823**, 92–100 (2012).

303. Ma, C. *et al.* Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 214–220 (2017).
304. Matsuo, Y. *et al.* Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* **505**, 112–116 (2013).
305. Kappel, L. *et al.* Rlp24 activates the AAA-ATPase Drg1 to initiate cytoplasmic pre-60S maturation. *J. Cell Biol.* **199**, 771–782 (2012).
306. Greber, B. J. Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *Rna* **22**, 1643–1662 (2016).
307. Hedges, J., West, M. & Johnson, A. W. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J.* **24**, 567–79 (2005).
308. Meyer, A. E., Hoover, L. A. & Craig, E. A. The cytosolic J-protein, Jjj1, and Rei1 function in the removal of the Pre-60 S subunit factor Arx1. *J. Biol. Chem.* **285**, 961–968 (2010).
309. Panse, V. G. & Johnson, A. W. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 260–266 (2010).
310. Lo, K. Y. *et al.* Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol. Cell* **39**, 196–208 (2010).
311. Zetterberg, A. & Killander, D. Quantitative cytophotometric and autoradiographic studies on the rate of protein synthesis during interphase in mouse fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* **40**, 1–11 (1965).
312. White, R. J. RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 69–78 (2005).
313. Ruggero, D. *et al.* Translational Control in Cancer Etiology. (2013).
314. Mauro, V. P. & Edelman, G. M. The ribosome filter hypothesis. *PNAS Biochem.* **6**, 2246–2251 (2002).
315. Castle, J. C. *et al.* Digital genome-wide ncRNA expression, including SnoRNAs, across 11 human tissues using poly-a-neutral amplification. *PLoS One* **5**, 1–9 (2010).
316. Dinman, J. D. Pathways to Specialized Ribosomes : The Brussels Lecture. *J. Mol. Biol.* **428**, 2186–2194 (2016).
317. Simsek, D. *et al.* The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Functional Diversity and Heterogeneity. *Cell* **169**, 1051–1057.e18 (2017).
318. Baudin-baillieu, A. *et al.* Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7665–7677 (2009).
319. Belin, S. *et al.* Dysregulation of Ribosome Biogenesis and Translational Capacity Is Associated

- with Tumor Progression of Human Breast Cancer Cells. *PLoS One* **4**, e7147 (2009).
320. Birkedal, U. *et al.* Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 451–455 (2015).
321. Krogh, N. *et al.* Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7884–7895 (2016).
322. Lovejoy, A. F., Riordan, D. P. & Brown, P. O. Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: Pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One* **9**, (2014).
323. Hassouna, N., Michot, B. & Bachellerie, J.-P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **12**, 2489–2497 (1984).
324. 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.* **9**, 1351–1366 (2010).
325. Sugihara, Y. *et al.* Identification and expression of an autosomal paralogue of ribosomal protein S4, X-linked, in mice: Potential involvement of testis-specific ribosomal proteins in translation and spermatogenesis. *Gene* **521**, 91–99 (2013).
326. Bortoluzzi, S., d'Alessi, F., Romualdi, C. & Danieli, G. A. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics* **17**, 1152–1157 (2001).
327. Sahin, F. *et al.* RPL38, FOSL1, and UPP1 Are Predominantly Expressed in the Pancreatic Ductal Epithelium. *Pancreas* **30**, 158–167 (2005).
328. Terzian, T. *et al.* Rpl27a mutation in the sooty foot ataxia mouse phenocopies high p53 mouse models. *J. Pathol.* **70**, 646–656 (2011).
329. Perucho, L. *et al.* RPLP1, a crucial ribosomal protein for embryonic development of the nervous system. *PLoS One* **9**, (2014).
330. Xue, S. *et al.* RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* **517**, 33–38 (2014).
331. Slavov, N., Semrau, S., Airoidi, E., Budnik, B. & van Oudenaarden, A. Differential Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins. *Cell Rep.* **13**, 865–873 (2015).
332. 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.* **22**, 249–258 (2003).
333. Zeidan, Q., Wang, Z., Maio, A. De & Hart, G. W. O -GlcNAc Cycling Enzymes Associate with the Translational Machinery and Modify Core Ribosomal Proteins. **21**, 1922–1936 (2010).
334. Yu, Y., Ji, H. & Doudna, J. A. Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit : Native and HCV IRES-bound complexes. 1438–1446 (2005).

335. Hutchinson, J. A., Shanware, N. P., Chang, H. & Tibbetts, R. S. Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 8688–8696 (2011).
336. Ruvinsky, I. *et al.* Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 2199–2211 (2005).
337. Khalaileh, A. *et al.* Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 Attenuates DNA Damage and Tumor Suppression during Development of Pancreatic Cancer. 1811–1821 (2014).
338. Ruvinsky, I., Katz, M., Dreazen, A., Gielchinsky, Y. & Saada, A. Mice Deficient in Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Suffer from Muscle Weakness that Reflects a Growth Defect and Energy Deficit. **4**, (2009).
339. Mukhopadhyay, R. *et al.* DAPK-ZIPK-L13a Axis Constitutes a Negative-Feedback Module Regulating Inflammatory Gene Expression. *Mol. Cell* **32**, 371–382 (2009).
340. Martin, I. *et al.* Ribosomal Protein s15 Phosphorylation Mediates LRRK2 Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Cell* **157**, 472–485 (2014).
341. Higgins, R. *et al.* The Unfolded Protein Response Triggers Site-Specific Regulatory Ubiquitylation of 40S Ribosomal Proteins. *Mol. Cell* **59**, 35–49 (2015).
342. Walter, P. & Ron, D. The Unfolded Protein Response : PERK. **334**, 1081–1087 (2011).
343. Tatsumi, K. *et al.* The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. *Nat. Commun.* **2**, 181 (2011).
344. Zhang, M. *et al.* RCAD/Ufl1, a Ufm1 E3 ligase, is essential for hematopoietic stem cell function and murine hematopoiesis. *Cell Death Differ.* **22**, 1922–1934 (2015).
345. Link, A. J. *et al.* Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **17**, 676–682 (1999).
346. Majzoub, K. *et al.* RACK1 Controls IRES-Mediated Translation of Viruses. *Cell* **159**, 1086–1095 (2014).
347. Ceci, M. *et al.* Release of eIF6 (p27). **8**, 579–584 (2003).
348. Jannot, G. *et al.* The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep.* **12**, 581–586 (2011).
349. Cho, J. *et al.* LIN28A is a suppressor of ER-associated translation in embryonic stem cells. *Cell* **151**, 765–777 (2012).
350. Parisi, S. *et al.* Lin28 is induced in primed embryonic stem cells & regulates let-7-independent events. *FASEB J.* **31**, 1046–1058 (2017).
351. Brown, V. *et al.* Microarray Identification of FMRP-Associated Brain mRNAs and Altered mRNA Translational Profiles in Fragile X Syndrome. **107**, 477–487 (2001).

352. Schaeffer, Â., Bardoni, B., Mandel, J., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. **20**, (2001).
353. Che, E., Sharma, M. R., Agrawal, R. K. & Joseph, S. Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Translation by Binding Directly to the Ribosome. *Mol. Cell* **54**, 407–417 (2015).
354. Tcherkezian, J., Brittis, P. A., Thomas, F., Roux, P. P. & Flanagan, J. G. Transmembrane Receptor DCC Associates with Protein Synthesis Machinery and Regulates Translation. *Cell* **141**, 632–644 (2010).
355. Armistead, J. & Triggs-raine, B. Diverse diseases from a ubiquitous process: The ribosomopathy paradox. *FEBS Lett.* **588**, 1491–1500 (2014).
356. LERNER, R. S. *et al.* Partitioning and translation of mRNAs encoding soluble proteins on membrane-bound ribosomes. *Rna* **9**, 1123–1137 (2003).
357. Stephens, S. B. & Nicchitta, C. V. Divergent Regulation of Protein Synthesis in the Cytosol and Endoplasmic Reticulum Compartments of Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 623–632 (2008).
358. Graber, T. E. *et al.* Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16205–16210 (2013).
359. Narla, A., Ebert, B. L., Dc, W., Narla, A. & Ebert, B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction Review article Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. **115**, 3196–3205 (2013).
360. Boria, I. *et al.* The ribosomal basis of diamond-blackfan anemia: Mutation and database update. *Hum. Mutat.* **31**, 1269–1279 (2010).
361. Vlachos, A., Rosenberg, P. S., Atsidaftos, E., Alter, B. P. & Lipton, J. M. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: A report from the Diamond Blackfan anemia registry. *Blood* **119**, 3815–3819 (2012).
362. Ebert, B. L. *et al.* Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* **451**, 335–339 (2008).
363. Raiser, D. M. *et al.* The emerging importance of ribosomal dysfunction in the pathogenesis of hematologic disorders The emerging importance of ribosomal dysfunction in the pathogenesis of hematologic disorders. *Leuk. Lymphoma* **8194**, (2014).
364. Alter, B. P. *et al.* Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br. J. Haematol.* **150**, 179–188 (2010).
365. Majeed, F., Jadko, S., Freedman, M. H. & Dror, Y. Mutation analysis of SBDS in pediatric acute myeloblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **45**, 920–924 (2005).
366. Zambetti, N. A. *et al.* Deficiency of the ribosome biogenesis gene Sbds in hematopoietic stem and progenitor cells causes neutropenia in mice by attenuating lineage progression in

- myelocytes. *Haematologica* (2015).
367. Ma, C. *et al.* Structural dynamics of the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) on the ribosome and its implication in the 60S subunit maturation. *Protein Cell* **7**, 187–200 (2016).
368. Finch, A. J. *et al.* Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes shwachman-diamond syndrome. *Genes Dev.* **25**, 917–929 (2011).
369. Zambetti, N. A. *et al.* Deficiency of the ribosome biogenesis gene Sbds in hematopoietic stem and progenitor cells causes neutropenia in mice by attenuating lineage progression in myelocytes. *Haematologica* **100**, 1285–1293 (2015).
370. Ruest, M.-È. *LES PARTENAIRES D ' INTERACTIONS DE CIRHIN , LA PROTÉINE PORTANT LA MUTATION RESPONSABLE DE LA CIRRHOSE AMÉRINDIENNE INFANTILE.* (2012).
371. Freed, E. F. & Baserga, S. J. The C-terminus of Utp4, mutated in childhood cirrhosis, is essential for ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4798–4806 (2010).
372. Chagnon, P. *et al.* A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1443–9 (2002).
373. Wilkins, B. J., Lorent, K., Matthews, R. P. & Pack, M. p53-Mediated Biliary Defects Caused by Knockdown of cirh1a, the Zebrafish Homolog of the Gene Responsible for North American Indian Childhood Cirrhosis. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
374. Heiss, N. S. *et al.* X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.* **19**, 32–38 (1998).
375. Jack, K. *et al.* RRNA Pseudouridylation Defects Affect Ribosomal Ligand Binding and Translational Fidelity from Yeast to Human Cells. *Mol. Cell* **44**, 660–666 (2011).
376. Ruggero, D. & Pandolfi, P. P. Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* **3**, 179–192 (2003).
377. Montanaro, L. *et al.* Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. *J. Pathol.* **220**, 114–125 (2006).
378. Yoon, A. *et al.* Impaired Control of IRES-Mediated Translation in X-Linked Dyskeratosis Congenita. *Science (80-)*. **312**, 902–907 (2006).
379. Penzo, M. *et al.* Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. *FASEB J.* **29**, 3472–3482 (2015).
380. Bellodi, C. *et al.* H/ACA Small RNA Dysfunctions in Disease Reveal Key Roles for Noncoding RNA Modifications in Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Cell Rep.* **3**, 1493–1502 (2013).
381. Quin, J. E. *et al.* Targeting the nucleolus for cancer intervention. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1842**, 802–816 (2014).

382. Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J. Ribosomes: the future of targeted therapies? *Oncotarget* **4**, 1554–5 (2013).
383. Truitt, M. L. & Ruggero, D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nature* **16**, 288–305 (2017).
384. Burger, K. *et al.* Chemotherapeutic Drugs Inhibit Ribosome Biogenesis at Various Levels * □. **285**, 12416–12425 (2010).
385. Bash-imam, Z. *et al.* Translational reprogramming of colorectal cancer cells induced by 5-fluorouracil through a miRNA-dependent mechanism. *Oncotarget* **8**, 46219–46233 (2017).
386. Wang, W. *et al.* Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Med. Res. Rev.* **35**, 225–85 (2015).
387. Wang, H. *et al.* Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer* **6**, 91 (2006).
388. Vaarala, M. H. *et al.* Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: Confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int. J. Cancer* **78**, 27–32 (1998).
389. Goudarzi, K. M. & Lindström, M. S. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int. J. Oncol.* **48**, 1313–1324 (2016).
390. Amsterdam, A. *et al.* Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol.* **2**, (2004).
391. De Las Heras-Rubio, A., Perucho, L., Paciucci, R., Vilardell, J. & Lleonart, M. E. Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 115–141 (2014).
392. Keersmaecker, K. De, Sulima, S. O. & Dinman, J. D. Perspectives Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. **125**, 1377–1383 (2017).
393. Lindström, M. S. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 167–170 (2009).
394. Barkić, M. *et al.* The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24-deficient mice and promotes their survival. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2489–504 (2009).
395. Ferreira, A. M. *et al.* High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors. *Hum. Mutat.* **35**, 1442–1445 (2014).
396. Su, H. *et al.* Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* **33**, 1348–58 (2014).
397. Martens-Uzunova, E. S. *et al.* Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* **31**, 978–991 (2012).
398. Mei, Y. *et al.* Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* **22**, 121–123 (2012).

399. Lafontaine, D. L. J. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 11–19 (2015).
400. Krastev, D. B. *et al.* A systematic RNAi synthetic interaction screen reveals a link between p53 and snoRNP assembly. *Nat Cell Biol* **13**, 809–818 (2011).
401. Drygin, D. *et al.* Targeting RNA Polymerase I with an Oral Small Molecule CX-5461 Inhibits Ribosomal RNA Synthesis and Solid Tumor Growth. **71**, (2011).
402. Xu, H. *et al.* CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat. Commun.* (2017).
403. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
404. Pettersen, H. S. *et al.* UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8430–8444 (2011).
405. Loreni, F., Mancino, M. & Biffo, S. Translation factors and ribosomal proteins control tumor onset and progression: how? *Oncogene* **33**, 2145–56 (2014).
406. Kawashima, S. A. *et al.* Potent , Reversible , and Specific Chemical Inhibitors Potent , Reversible , and Specific Chemical Inhibitors of Eukaryotic Ribosome Biogenesis. *Cell* **167**, 512–518.e13 (2016).
407. Sloan, K. E., Bohnsack, M. T. & Watkins, N. J. The 5S RNP Couples p53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress. *Cell Rep.* **5**, 237–247 (2013).
408. Nishimura, K. *et al.* Perturbation of Ribosome Biogenesis Drives Cells into Senescence through 5S RNP-Mediated p53 Activation. *Cell Rep.* **10**, 1310–1323 (2015).
409. Danilova, N. & Gazda, H. T. Ribosomopathies : how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis. Model. Mech.* **8**, 1013–1026 (2015).
410. Fumagalli, S. *et al.* Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* **11**, 501–508 (2009).
411. Holmberg Olausson, K., Nistér, M. & Lindström, M. p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells* **1**, 774–798 (2012).
412. Deisenroth, C. & Zhang, Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* **29**, 4253–4260 (2010).
413. Golomb, L., Volarevic, S. & Oren, M. P53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Lett.* **588**, 2571–2579 (2012).
414. Meng, X., Carlson, N. R., Dong, J. & Zhang, Y. Oncogenic c-Myc-induced lymphomagenesis is inhibited non-redundantly by the p19Arf-Mdm2-p53 and RP-Mdm2-p53 pathways. *Oncogene*

- 1–9 (2015).
415. Lindström, M. S. & Nistér, M. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. *PLoS One* **5**, (2010).
 416. Janas, M. M. *et al.* Reduced Expression of Ribosomal Proteins Relieves MicroRNA-Mediated Repression. *Mol. Cell* **46**, 171–186 (2012).
 417. Donati, G. *et al.* Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation. *J. Cell Sci.* **124**, 3017–3028 (2011).
 418. Iadevaia, V. *et al.* PIM1 kinase is destabilized by ribosomal stress causing inhibition of cell cycle progression. *Oncogene* **29**, 5490–5499 (2010).
 419. Singh, S. a. *et al.* p53-independent cell cycle and erythroid differentiation defects in murine embryonic stem cells haploinsufficient for Diamond Blackfan anemia-proteins: RPS19 versus RPL5. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
 420. Challagundla, K. B. *et al.* Ribosomal Protein L11 Recruits miR-24/miRISC To Repress c-Myc Expression in Response to Ribosomal Stress. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4007–4021 (2011).
 421. Dai, M. S., Sun, X. X. & Lu, H. Ribosomal protein L11 associates with c-Myc at 5 S rRNA and tRNA genes and regulates their expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 12587–12594 (2010).
 422. Xue, S. & Barna, M. Cis-regulatory RNA elements that regulate specialized ribosome activity. **6286**, (2015).
 423. Cormier, S. *et al.* The murine ortholog of notchless, a direct regulator of the notch pathway in *Drosophila melanogaster*, is essential for survival of inner cell mass cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3541–9 (2006).
 424. Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D. & Cáceres, J. F. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8519–27 (2003).
 425. Dihazi, H. *et al.* Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells functional proteomics revealed an important role of eukaryotic initiation factor 5A (Eif5a) in stem cell differentiation. *J. Proteome Res.* **10**, 1962–73 (2011).
 426. Noack Watt, K. E., Achilleos, A., Neben, C. L., Merrill, A. E. & Trainor, P. A. The Roles of RNA Polymerase I and III Subunits Polr1c and Polr1d in Craniofacial Development and in Zebrafish Models of Treacher Collins Syndrome. *PLoS Genet.* **12**, 1–26 (2016).
 427. Stedman, A. *et al.* Ribosome biogenesis dysfunction leads to p53-mediated apoptosis and goblet cell differentiation of mouse intestinal stem/progenitor cells. *Cell Death Differ.* (2015).
 428. Wan, Y. *et al.* Transcriptome analysis reveals a ribosome constituents disorder involved in the

- RPL5 downregulated zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *BMC Med. Genomics* **9**, 13 (2016).
429. Ross, A. P. & Zarbalis, K. S. The emerging roles of ribosome biogenesis in craniofacial development. *Front. Physiol.* **5 FEB**, 1–10 (2014).
430. Quarello, P. *et al.* Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica* **95**, 206–13 (2010).
431. Le Bouteiller, M. *et al.* Notchless-dependent ribosome synthesis is required for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2351–69 (2013).
432. Wang, Y., Luo, Y., Hong, Y., Peng, J. & Lo, L. Ribosome Biogenesis Factor Bms1-like Is Essential for Liver Development in Zebrafish. *J. Genet. Genomics* **39**, 451–462 (2012).
433. Azuma, M., Toyama, R., Laver, E. & Dawid, I. B. Perturbation of rRNA synthesis in the *bap28* mutation leads to apoptosis mediated by p53 in the zebrafish central nervous system. *J. Biol. Chem.* **281**, 13309–13316 (2006).
434. Provost, E. *et al.* Ribosomal biogenesis genes play an essential and p53-independent role in zebrafish pancreas development. *Development* **139**, 3232–3241 (2012).
435. Zentner, G. E., Balow, S. A. & Scacheri, P. C. Genomic Characterization of the Mouse Ribosomal DNA Locus. *Genes/Genomes/Genetics* **4**, 243–254 (2014).
436. Ali, S. A. *et al.* Phenotypic transcription factors epigenetically mediate cell growth control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6632–6637 (2008).
437. Zhang, Q., Shalaby, N. a & Buszczak, M. Changes in rRNA transcription influence proliferation and cell fate within a stem cell lineage. *Sci. (New York, NY)* **343**, 298–301 (2014).
438. Hayashi, Y. *et al.* Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation. *PLoS One* **9**, (2014).
439. Sanchez, C. G. *et al.* Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* **18**, 276–290 (2016).
440. Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
441. Signer, R. a J., Magee, J. a, Salic, A. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* **509**, 49–54 (2014).
442. Buszczak, M., Signer, R. A. J. & Morrison, S. J. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. *Cell* **159**, 242–251 (2014).
443. Barna, M. & Ruggero, D. Tailor made protein synthesis for HSCs. *Cell Stem Cell* **14**, 423–424 (2014).
444. Blanco, S. *et al.* Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis.

- Nature* **534**, 335–340 (2016).
445. Lafita-Navarro, M. C. *et al.* MXD1 localizes in the nucleolus, binds UBF and impairs rRNA synthesis. *Oncotarget* **7**, 69536–69548 (2016).
446. Frye, M. & Blanco, S. Post-transcriptional modifications in development and stem cells. *Development* **143**, 3871–3881 (2016).
447. Gu, B. W. *et al.* Impaired telomere maintenance and decreased canonical WNT signaling but normal ribosome biogenesis in induced pluripotent stem cells from X-linked dyskeratosis congenita patients. *PLoS One* **10**, 1–20 (2015).
448. Horn, D. M., Mason, S. L. & Karbstein, K. Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *J. Biol. Chem.* **286**, 34082–34087 (2011).
449. Hovhanyan, A., Herter, E. K., Pfannstiel, J., Gallant, P. & Raabe, T. *Drosophila* mbm is a nucleolar myc and casein kinase 2 target required for ribosome biogenesis and cell growth of central brain neuroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1878–91 (2014).
450. Heindl, K. & Martinez, J. Nol9 is a novel polynucleotide 5'-kinase involved in ribosomal RNA processing. *EMBO J.* **29**, 4161–4171 (2010).
451. Bielczyk-Maczyńska, E. *et al.* The Ribosome Biogenesis Protein Nol9 Is Essential for Definitive Hematopoiesis and Pancreas Morphogenesis in Zebrafish. *PLoS Genet.* **11**, 1–28 (2015).
452. Kathleen L. McCann and Susan J. Baserga. Mysterious Ribosomopathies. *Science (80-.).* **341**, 849–850 (2014).
453. Tuteja, R. & Tuteja, N. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 407–436 (1998).
454. Tajrishi, M. M., Tuteja, R. & Tuteja, N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* **4**, 267–275 (2011).
455. Ko, C. Y., Lin, C. H., Chuang, J. Y., Chang, W. C. & Hsu, T. I. MDM2 Degrades Deacetylated Nucleolin Through Ubiquitination to Promote Glioma Stem-Like Cell Enrichment for Chemotherapeutic Resistance. *Mol. Neurobiol.* 1–13 (2017).
456. Holmboe, S. *et al.* Evaluation of somatostatin and nucleolin receptors for therapeutic delivery in non-small cell lung cancer stem cells applying the somatostatin-analog DOTATATE and the nucleolin-targeting aptamer AS1411. *PLoS One* **12**, 1–12 (2017).
457. Jia, W., Yao, Z., Zhao, J., Guan, Q. & Gao, L. New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL). *Life Sci.* **186**, 1–10 (2017).
458. Chen, C.-F., Yang, H.-C. & Liu, G.-S. [Effect of nucleolin silencing on differentiation of rat neural stem cells in vitro and the molecular mechanism]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **37**, 875–882 (2017).
459. Yang, A. *et al.* Nucleolin maintains embryonic stem cell self-renewal by suppression of p53

- protein-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 43370–43382 (2011).
460. Tessarz, P. *et al.* Glutamine methylation in histone H2A is an rRNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* **505**, 564–568 (2014).
461. Lindström, M. S. NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem. Res. Int.* **2011**, (2011).
462. Pan, W. A. *et al.* The RNA recognition motif of NIFK is required for rRNA maturation during cell cycle progression. *RNA Biol.* **12**, 255–267 (2015).
463. Lebreton, A., Saveanu, C., Decourty, L., Jacquier, A. & Fromont-Racine, M. Nsa2 is an unstable, conserved factor required for the maturation of 27 SB pre-rRNAs. *J. Biol. Chem.* **281**, 27099–27108 (2006).
464. Zakalskiy, A. *et al.* Structural and enzymatic properties of the AAA protein Drglp from *Saccharomyces cerevisiae*. Decoupling of intracellular function from ATPase activity and hexamerization. *J. Biol. Chem.* **277**, 26788–26795 (2002).
465. DeLaBarre, B. & Brunger, A. T. Nucleotide dependent motion and mechanism of action of p97/VCP. *J. Mol. Biol.* **347**, 437–452 (2005).
466. Agca, C. & Agca, Y. Molecular and ultrastructural changes of rat pre-implantation embryos during two-cell developmental arrest. *J. Assist. Reprod. Genet.* **31**, 767–780 (2014).
467. Lloyd, K. L., Cree, I. A. & Savage, R. S. Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer: a systematic review. *BMC Cancer* **15**, 117 (2015).
468. Wuttke, M. *et al.* Genetic loci associated with renal function measures and chronic kidney disease in children: The Pediatric Investigation for Genetic Factors Linked with Renal Progression Consortium. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 262–269 (2016).
469. Martin, G. R. Teratocarcinomas and Mammalian Embryogenesis. **209**, (1980).
470. Takada, H. & Kurisaki, A. Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4015–4025 (2015).
471. Meshorer, E. *et al.* Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev. Cell* **10**, 105–116 (2006).
472. Meshorer, E. & Misteli, T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 540–546 (2006).
473. Miluzio, A. *et al.* Expression and activity of eIF6 trigger Malignant Pleural Mesothelioma growth in vivo. **6**,
474. Caramel, J. *et al.* A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–80 (2013).
475. Denecker, G. *et al.* Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ.* (2014).

476. Settleman Jeffrey, A. S. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **29**, 4741–4751 (2011).
477. Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* **16**, 488–94 (2014).

