



HAL
open science

Altérations de composition des ribosomes dans les cancers du sein : analyses de cohortes humaines et modèles cellulaires

Flora Nguyen van Long

► To cite this version:

Flora Nguyen van Long. Altérations de composition des ribosomes dans les cancers du sein : analyses de cohortes humaines et modèles cellulaires. Cancer. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1095 . tel-02277093

HAL Id: tel-02277093

<https://theses.hal.science/tel-02277093>

Submitted on 3 Sep 2019

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 :

2019LYSE1095

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED340

(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Oncologie

Discipline : Biologie Cellulaire & Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le, par :

Flora NGUYEN VAN LONG

**Altérations de composition des ribosomes dans les cancers
du sein : analyses de cohortes humaines et modèles
cellulaires**

Devant le jury composé de :

Moyret-Lalle, Caroline	Professeure/Université Lyon 1/CRCL	Présidente
Ginestier, Christophe	Chargé de recherche/CRCM	Rapporteur
Pyronnet, Stéphane	Directeur de recherche/Université Toulouse 3	Rapporteur
Mechta-Grigoriou, Fatima	Directrice de recherche/Institut Curie	Examinatrice
Moyret-Lalle, Caroline	Professeure/Université Lyon 1/CRCL	Examinatrice
Diaz, Jean-Jacques	Directeur de recherche/Université Lyon 1/CRCL	Directeur de thèse
Marcel, Virginie	Chargé de recherche/Université Lyon 1/CRCL	Co-directrice de thèse

A ma très chère famille,

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. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

- Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury :

A Messieurs Christophe Ginestier et Stéphane Pyronnet, je suis touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteurs de ma thèse. Je souhaite exprimer ma gratitude pour le temps consacré à l'évaluation de mon manuscrit.

A Mesdames Caroline Moyret-Lalle et Fatima Mechta-Grigoriou, je vous suis énormément reconnaissante d'avoir accepté à la fois d'être examinatrices de ma thèse mais également en tant que membres de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils et commentaires constructifs ont beaucoup contribué au bon déroulement de ma thèse. Je tiens également à vous remercier pour vos conseils concernant mon appréhension sur l'après-thèse.

- Je souhaite bien sûr, exprimer ma gratitude à mes directeurs de thèse Virginie Marcel et Jean-Jacques Diaz.

Chère Virginie, je n'ai pas de mots pour témoigner toute ma gratitude. Tu es et j'en suis sûre, tu resteras la meilleure des chefs que je puisse avoir dans ma future carrière. Tu as toujours su trouver les bons mots pour m'encourager et me réconforter durant ces cinq années. Tu as toujours été disponible pour m'aider au niveau professionnel et personnel. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta patience, ta pédagogie.... J'ai tellement de choses à te remercier qu'il me faudrait une dizaine de pages en plus ! Vraiment, du plus profond de mon cœur, merci pour tout. Tu seras pour toujours mon modèle !

Cher Jean-Jacques, je tiens à vous remercier pour votre pédagogie, votre patience et votre écoute. A vos côtés j'ai pu apprendre tellement de choses ! Cela peut paraître encore étrange que je continue à vous vouvoyer durant toutes ces années, mais ceci est pour vous transmettre tout mon respect que je témoigne envers vous. Merci également votre bonne humeur et surtout votre humour... ! J'espère que mon livre des blagues et mon super stylo à plume rose/violet, vous seront encore utiles pendant des années !

- Je remercie La Ligue Contre Le Cancer et la Fondation pour la Recherche Médicale pour avoir financé respectivement, mes trois années et six mois de thèse.
- Je tiens à exprimer ma gratitude envers les différents collaborateurs qui ont énormément contribué à ces travaux. Un grand merci pour votre travail, votre aide et vos réponses à mes différentes questions !!!

- Un grand merci à l'ensemble de l'équipe « Domaines Nucléaires et Pathologies » :

Hichem, merci de m'avoir récupéré des caniveaux d'Hô-Chi-Minh-Ville, sans toi je n'aurais pas effectué mon M2 et ma thèse et je serais encore au Vietnam à vendre des brochettes de crevettes ... ! Merci pour tes conseils concernant mon futur, ta bonne humeur et bien tant de choses. Je savais que je pouvais toujours venir te voir en cas de doutes ou d'inquiétudes. Et aussi merci d'avoir contribué à ma survie à Lyon (de m'avoir amené de la nourriture ou de m'emmener acheter du riz...)

Frédéric, merci d'avoir été le chef adjoint lorsque Virginie était absente ! Tu étais toujours disponible dès que j'avais des questions concernant les manip (même s'il fallait que je te paye en PiM's de temps en temps). Aussi merci pour les gâteaux !

Je voudrais également remercier les différents membres de l'équipe : Nicole, Anne, Hélène, Fabien, Karine, Philippe, Déborah, Valentin, Angéline et toutes les autres personnes que je n'ai pas nommées et j'en suis vraiment désolée, vous êtes tellement nombreux ! En tout cas merci à tous pour votre accueil, votre bonne humeur, sans vous, l'atmosphère de l'équipe ne serait pas aussi humaine et chaleureuse. Merci aux doctorants et anciens de l'équipe : Piero, Elizabeth, Sophie, Lucie Samaneh, Elise, Elsa, Wannapa, Maggy et Florian. Grâce à vous, j'ai pu travailler dans une atmosphère amicale, merci de m'avoir aidé, guidé pour les différentes expériences que je ne maîtrisais pas. Un grand, grand merci à Nathalie, tu m'as appris tellement de techniques ! Merci de m'avoir guidé pour les différentes expériences durant ma thèse, et pour aussi pour m'avoir accompagnée pendant les longues heures au microscope à lire les TMA ! Merci aux stagiaires que j'ai encadrés : Paul et Akari qui ont effectué un excellent travail. Je remercie également les différents stagiaires qui ont travaillé sur le projet : Agathe, Marjorie et Stéphanie.

- Un grand merci à nos voisins du 4^{ème} étage, l'équipe de Mathieu Gabut qui joue un grand rôle dans l'agréable atmosphère qui règne à cet étage. Je tiens surtout à remercier Marion, Fleur, Sébastien, Caroline et Mathieu, sans vous l'étage serait bien moins amusant, merci aussi pour vos conseils et pour les séances de boosting concernant l'après-thèse.
- Merci aux différents doctorants et que j'ai pu rencontrer durant ma thèse, vous avez beaucoup contribué à la bonne ambiance qui règne au CRCL (Mme Ultracentri, Stéphanie ; Mr Useless, Giacomo ; notre fantôme du Cheney A, Duygu ; Mme Australie-Ecosse, Ahlima ; Karam ; Justine ; Alexandra ; Elodie et bien d'autres...)

- Un énorme merci aux « best of the best » :

Mounira aka Moumou (ou Momo parce qu'apparemment Moumou c'est moins beau) : tu as toujours été à l'écoute et prête à nous aider dès qu'on avait un problème. Tu es l'une des personnes les plus brillantes que je connaisse. Grâce à toi on avait notre petit quota de blédards dans l'équipe ! Tu es gentille, drôle et attentionnée, restes toujours comme tu es !

Thomas aka Tomtom (ils sont originaux les surnoms) : merci pour tous les moments qu'on a passés ensemble au labo ou en dehors du labo. Merci de m'avoir fait découvrir pleins de nouveaux restaurants, je sais que je peux toujours compter sur toi si j'ai envie d'en tester un ! Je n'oublierai jamais ta phrase culte : « je suis arrivée avec beaucoup de connaissances et je repars avec beaucoup d'amis ».

Marine : tu es une personne tellement forte, je t'admire beaucoup. Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble du M2 à la fin de ma thèse, pour les balades durant le week-end, les séances de sport ratées qui ont été suivies par un restaurant, nos échanges de musiques, nos voyages à Disney et à Londres... Bref, merci pour tout !!

Nabila aka Nabilouche : ma chère collègue de bureau, sans toi mes années aux CRCL seraient complètement différentes. Merci à Willy Denzey, Leslie, les Tragédies et Justin Bieber qui ont permis de nous rapprocher ! Tu es une personne formidable, tu as toujours été présente pour me soutenir, pour me faire rire. Je sais que toutes les deux on a cette mentalité : « pas de nouvelles, bonnes nouvelles » et « loin des yeux, loin du cœur », mais j'espère qu'on arrivera à dépasser cette mentalité ! Merci également à ta famille pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, vous êtes les meilleurs ! Voilà, la conversation est terminée (si si la famille 19976).

- Enfin un grand merci à mes êtres chers :

Olivier (mon lardon préféré) : merci d'avoir été à mes côtés pendant les moments difficiles, pour ton soutien et tes encouragements. Tu es une personne exceptionnelle et j'espère pouvoir être à mon tour, ton pilier pendant les moments durs.

A ma famille : je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à mes parents et à mes frères adorés. Merci pour votre soutien sans faille (et de céder à tous mes caprices de petite fille gâtée). Néanmoins, le point le plus important dans ma vie est de vous rendre heureux et fiers de moi. Ainsi cette thèse vous est entièrement dédiée. Je vous aime.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX	1
LISTE DES ABREVIATIONS	2
PREAMBULE	6
INTRODUCTION	8
CHAPITRE 1 : LA TRADUCTION	9
I. LES ETAPES DE LSA TRADUCTION	9
1. L'initiation de la traduction	9
2. L'élongation de la traduction	12
3. La terminaison de la traduction	12
II. LA REGULATION DE LA TRADUCTION	13
1. Régulation de la traduction globale	13
2. Régulation de la traduction spécifique	14
a. Région 5'UTR	15
i. Les structures secondaires	15
ii. Les structures IRES	15
iii. Les motifs 5'TOP	16
iv. Les uORFs	16
v. Méthylations de base	16
b. Région 3'UTR	17
i. Les microARNs	17
ii. Les protéines de liaison à l'ARN	17
III. TRADUCTION ET CANCER	18
1. Rôle du contrôle traductionnel dans la tumorigenèse	18
a. Rôle de la régulation traductionnelle globale des ARNm dans la tumorigenèse	19
b. Rôle de la régulation traductionnelle spécifique des ARNm dans la tumorigenèse	20
i. Rôle des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction	20
ii. Rôle des uORFs	20
iii. Rôle des structures IRES	21
iv. Rôle des microARNs	21
v. Rôle des protéines de liaison à l'ARN	21
2. Utilisation de la traduction en clinique	22
a. Les inhibiteurs directs du complexe eIF4F	22
i. Ciblage d'eIF4E	22

ii. Ciblage de l'interaction eIF4E-eIF4G	23
iii. Ciblage d'eIF4A	23
b. Les inhibiteurs indirects du complexe eIF4F	24
i. Inhibiteurs de la voie mTOR	24
ii. Inhibiteurs de la voie MNK	26
IV. REVUE SCIENTIFIQUE	29
CHAPITRE 2 : LES RIBOSOMES	47
I. LA BIOGENESE DES RIBOSOMES	47
1. La synthèse des ARNr	49
a. Transcription des ARNr	49
b. Régulation de la transcription des ADNr	50
i. Régulations de l'activité de l'ARN Pol I	50
ii. Régulations épigénétiques	50
iii. Rôles de la protéine nucléoline dans la biogenèse des ribosomes	51
2. Maturation des ARNr	52
a. Clivages des pré-ARNr	52
b. Modifications post-transcriptionnelles des ARNr	52
i. Les pseudouridylations des ARNr	53
ii. Les 2'-O-Me des ARNr	53
iii. Autres activités de fibrillarine dans la biogenèse des ribosomes	54
3. Assemblage des ribosomes	55
II. RIBOSOMES ET TRADUCTION	55
1. Structure des ribosomes et traduction	56
a. La petite sous-unité 40S du ribosome	56
b. La grande sous-unité 60S du ribosome	56
2. Hétérogénéité des ribosomes et traduction	57
a. Hétérogénéité au niveau des protéines ribosomiques et impact sur la régulation traductionnelle	58
i. Mise en évidence des altérations de composition des ribosomes au niveau des RP	58
ii. Effet des variations de composition des ribosomes au niveau des RP dans la régulation traductionnelle	59
b. Hétérogénéité au niveau des ARNr et impact sur la régulation traductionnelle	60
i. Mise en évidence des altérations de composition des ribosomes impliquant des variations de modifications post-transcriptionnelles des ARNr	60
ii. Effet des variations de composition des ribosomes au niveau des ARNr sur la régulation traductionnelle	61
III. RIBOSOMES ET CANCER	63
1. Rôle des altérations des ribosomes dans les cancers	64
a. Altérations quantitatives des ribosomes et cancer	64
b. Altérations qualitatives des ribosomes et cancer	65
i. Variation de composition des ribosomes au niveau des protéines ribosomiques et cancer	65
ii. Variation de composition des ribosomes au niveau des ARNr	66
2. Ciblage des ribosomes en clinique	66

a.	Ciblage des ribosomes par des molécules chimiothérapeutiques	67
b.	Ciblage des ribosomes par des thérapies ciblées	68
i.	Molécule BMH-21	68
ii.	Molécule CX-3543	68
iii.	Molécule CX-5461	68
CHAPITRE 3 : LES CANCERS DU SEIN		71
I.	EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DU CANCER DU SEIN	71
1.	Le cancer du sein en quelques chiffres	71
2.	L'anatomie du sein	72
3.	Les facteurs de risque du cancer du sein	73
a.	L'âge	74
b.	L'histoire familiale	74
c.	Les facteurs liés à la reproduction	74
II.	LES CLASSIFICATIONS DES CANCERS DU SEIN	75
1.	Classification anatomopathologique des cancers du sein	75
a.	Classification histologique basée sur la morphologie des cancers du sein	75
b.	Classification basée sur le système TNM	77
c.	Classification basée sur le grade	78
2.	Classification moléculaire des cancers du sein	78
a.	Classification selon le profil d'expression génique	79
i.	Sous-type Luminal	79
ii.	Sous-type Basal-like	79
iii.	Sous-type HER2+	79
iv.	Sous-type Normal-like	80
v.	Sous-type Moléculaire Apocrine	80
vi.	Sous-type Claudin-low	80
b.	Classification selon le statut de récepteurs en immunohistochimie	81
i.	Sous-type Luminal	82
ii.	Sous-type HER2+	82
iii.	Sous-type Triple Négatif	82
c.	Classification des cancers Triple Négatifs	83
i.	Sous-type Basal-like 1	83
ii.	Sous-type Basal-like 2	84
iii.	Sous-type Immunomodulateur	84
iv.	Sous-type Mésenchymateux	84
v.	Mesenchymal stem-like	84
vi.	Sous-type Luminal récepteur androgène	84
III.	LES TRAITEMENTS DES CANCERS DU SEIN	85
1.	Les traitements localisés du cancer du sein	85
a.	La chirurgie	85

i.	La chirurgie conservatrice	85
ii.	La chirurgie non conservatrice	86
b.	La radiothérapie	86
i.	La curiethérapie	87
ii.	La radiothérapie externe	87
2.	Les traitements systémiques	87
a.	La chimiothérapie	87
b.	L'hormonothérapie	88
i.	L'hormonothérapie non médicamenteuse	88
ii.	L'hormonothérapie médicamenteuse	88
c.	Les thérapies ciblées	89
i.	Les inhibiteurs de HER2	89
ii.	Inhibiteur de VEGF	89
iii.	Inhibiteur de mTORC1	90
IV.	LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE	91
1.	Les changements cellulaires liés à la transition épithélio-mésenchymateuse	92
a.	Structure des cellules épithéliales	92
b.	Les étapes de l'EMT	93
i.	Perte des jonctions épithéliales	93
ii.	Réorganisation architecturale du cytosquelette	93
iii.	Reprogrammation de l'expression génique	94
2.	Rôle de l'EMT dans les cancers du sein	95
a.	Rôle de l'EMT dans l'initiation tumorale mammaire	96
i.	Echappement aux mécanismes de sauvegarde de la cellule	96
ii.	Initiation tumorale indépendante d'une instabilité génomique	97
b.	Rôle de l'EMT dans la progression tumorale mammaire	97
i.	Rôle de l'EMT dans le développement et la dissémination des métastases	97
ii.	Rôle de l'EMT dans la résistance aux thérapies	98
c.	Rôle de l'EMT dans l'acquisition de propriétés souches	99
i.	EMT et propriétés souches dans l'initiation tumorale mammaire	99
ii.	EMT et propriétés souches dans la progression tumorale mammaire	100
3.	Mécanismes moléculaires à l'origine de la reprogrammation génique au cours de l'EMT	101
a.	Les voies de signalisation activatrices de l'EMT	101
i.	La voie TGFβ	101
ii.	La voie WNT	102
iii.	La voie NOTCH	102
b.	Induction d'une reprogrammation génique par une régulation transcriptionnelle et épigénétique.	102
i.	Régulation transcriptionnelle au cours de l'EMT	102
ii.	Régulation épigénétique au cours de l'EMT	103
c.	Induction d'une reprogrammation génique par une régulation traductionnelle au cours de l'EMT	104

i. Régulation traductionnelle par les miARNs	104
ii. Régulation traductionnelle par des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction	105
iii. Régulation traductionnelle par des RBP	106

HYPOTHESES & OBJECTIFS **109**

RESULTATS **110**

I. ARTICLE 1 : DUAL ASSOCIATION OF THE 2'-O-RIBOSE METHYLTRANSFERASE FBL EXPRESSION WITH POOR PROGNOSIS IN EARLY BREAST CANCERS REVEALS THAT REDUCTION OF FBL CONTRIBUTES TO SPONTANEOUS TUMORIGENESIS	111
1. Contexte	111
2. Manuscrit en préparation	112
II. ARTICLE 2 : DRUGGABLE NUCLEOLIN IDENTIFIES BREAST TUMOURS ASSOCIATED WITH POOR PROGNOSIS THAT EXHIBIT DIFFERENT BIOLOGICAL PROCESSES	180
1. Contexte	180
2. Version PDF de l'article publié	181
III. ARTICLE 3 : TRANSLATIONAL REPROGRAMMING DURING EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IS ASSOCIATED WITH FINE-OPTIMIZATION OF RIBOSOME COMPOSITION	202
1. Contexte	202
2. Manuscrit en préparation	203

DISCUSSION **250**

I. ALTERATIONS DE COMPOSITION DES RIBOSOMES DANS LES CANCERS DU SEIN	251
1. Altérations de la composition des ribosomes au niveau des protéines ribosomiques dans les cancers du sein	252
a. Visualisation des altérations de la composition des ribosomes au niveau protéique dans les cellules transformées hMEC-mZeb1-Kras ^{V12}	253
b. Altération de la composition dans les tumeurs mammaires	255
2. Altérations de la composition des ribosomes au niveau des ARNr dans les cancers du sein	255
a. Identification des altérations de 2'-O-Me des ARNr par l'expression de <i>FBL</i> dans les cancers du sein	256
b. Identification des altérations de 2'-O-Me des ARNr par RiboMethSeq dans les cancers du sein	257
II. UTILISATION DES RIBOSOMES EN CLINIQUE DANS LES CANCERS DU SEIN	259
1. Utilisation de NCL en clinique dans les cancers du sein	260
2. Utilisation de FBL en clinique dans les cancers du sein	261
III. REDUCTION DE L'EXPRESSION DE <i>FBL</i> DANS LES CANCERS DU SEIN : UN NOUVEAU MECANISME DE TUMORIGENESE MAMMAIRE ?	262
1. Mise en évidence des tumeurs mammaires qui sous-expriment <i>FBL</i>	263
2. Rôle de la sous-expression de <i>FBL</i> dans la tumorigenèse mammaire	263

a. Altération de la 2'-O-Me des ARNr et de la traduction	264
b. Diminution de la biogenèse des ribosomes	264
c. Emergence des caractéristiques souches	265
IV. CONCLUSION GENERALE	269

ANNEXES **270**

I. LISTE DES PUBLICATIONS	271
1. Diversity of rRNA 2'-O-methylation profiles in breast tumours reveals two classes of sites	273
2. Analysis of the rRNA methylation complex components in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia – a pilot study	303
3. Iron and hepcidin mediate human colorectal growth	317
II. LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS	362
1. Communication orale	362
a. Exemples des posters	362

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **365**

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

FIGURE 1. VUE D'ENSEMBLE DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION COIFFE DEPENDANTE.....	11
FIGURE 2. LES MECANISMES DE REGULATION DE LA TRADUCTION SPECIFIQUE ET LEURS IMPLICATIONS DANS LA TUMORIGENESE.	18
FIGURE 3. VUE D'ENSEMBLE DE LA BIOGENESE DES RIBOSOMES.	48
FIGURE 4. ORGANISATION DU SNORNP A BOITE C/D CHEZ LES EUCARYOTES.	54
FIGURE 5. LES SITES FONCTIONNELS DU RIBOSOME.	57
FIGURE 6. ALTERATIONS DES RIBOSOMES DANS LES CANCERS.	63
FIGURE 7. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DU SEIN.	73
FIGURE 8. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE ET HETEROGENEITE DES CANCERS DU SEIN.	76
FIGURE 9. LES TRAITEMENTS DES CANCERS DU SEIN.	90
FIGURE 10. SCHEMA SIMPLIFIE DE L'EMT.	95
FIGURE 11. LE CONTROLE TRADUCTIONNEL AU COURS DE L'EMT.	107
FIGURE 12. CONTRASTE NEGATIF DES RIBOSOMES PURIFIES.	254
FIGURE 13. VARIATION DU PROFIL DE 2'-O-ME DANS LES TUMEURS MAMMAIRES.	258
FIGURE 14. IMPACT D'UNE DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE <i>FBL</i> SUR L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE PLURIPOTENCE.	266
FIGURE 15. LES POTENTIELS MECANISMES DE TUMORIGENESE MAMMAIRE PAR L'EXPRESSION DE <i>FBL</i>	268
TABLEAU 1. LES INHIBITEURS DE LA TRADUCTION ACTUELLEMENT UTILISES EN CLINIQUE OU EN ESSAI CLINIQUE.....	27
TABLEAU 2. CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DU SYSTEME TNM D'APRES (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, BREAST STAGING, 8TH EDITION, 2018)	77
TABLEAU 3. TABLEAU DE SCORING SELON LES TROIS CRITERES DU NOTTINGHAM GRADE SYSTEM SELON (ELSTON AND ELLIS, 1991).	78
TABLEAU 4. CLASSIFICATION DES SOUS-TYPES DE CANCERZ DU SEIN PAR L'UTILISATION DE MARQUEURS DE SUBSTITUTION EN IMMUNOHISTOCHEMIE D'APRES (GOLDHIRSCH ET AL., 2013; SENKUS ET AL., 2015). 83	

LISTE DES ABREVIATIONS

#

Ψ : pseudouridylations des ARNr

2'-O-Me : méthylations 2'-O-ribose des ARNr

4EASO : eIF4E Antisense Oligonucleotide

4E-BP : 4E-Binding Protein

5-FU : 5-Fluorouracile

5'TOP : 5' terminal oligopyrimidine tract

A

aa-ARNt : amino-acyl ARN de transfert

ABCE1 : ATP-Binding Cassette sub-family E member 1

ABCP : ATP-Binding Cassette

ALDH1 : Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

B

BAT : Transforming Growth Factor β Activated Translation

BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

BRCA : BReast Cancer

BTG1 : B-cell Translocation Gene 1

C

CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

CPE : Core Promoter Element

D

DAB2 : Disabled Homologue 2

DC : Decoding Center

DCIS : Ductal Carcinoma In Situ

DKC1 : Dyskérine

DMDAPatA : Des-Methyl DesAmino Pateamine A

E

E-Cadhérine : Epithélial-Cadhérine

eEF : eukaryotic elongation factor

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

eIF : eukaryotic initiation factor

EMA : European Medicines Agency

EMT : Epithelio-Mesenchymal Transition

EMT-TF : Epithelio-Mesenchymal Transition Transcription Factor

ER : Estrogen Receptor α

eRF : eukaryotic release factor

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ESMO : European Society for Medical Oncology

ETS : External Transcribed Spacer

EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

F

FBL : Fibrillarine

FDA : Food and Drug Administration

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

FOXC2 : Forkhead box C 2

FRB : FKBP and rapamycin- binding

FTH1 : Ferritin Heavy Chain 1

G

GAIT : Gamma Interferon Inhibitor of Translation

GCLC : Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit

GDP : Guanosine Diphosphate

GRE : Guanine-Rich Element GTP : Guanosine Triphosphate

Gy : Gray

H

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HDAC : Histone Deacetylase

HMEC : Human Mammary Epithelial Cell

hnRNP E1 : heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein E1

HOXD10 : Homeobox D10

I

IDC : Invasive Ductal Carcinoma

IFN- γ : Interferon gamma

IGF1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

IHC : Immunohistochimie

ILEI : Interleukin Like EMT inducer

INCa : Institut National du Cancer

IRES : Internal Ribosome Entry Sites

ITAF : IRES Trans Acting Factors

ITS : Internal Transcribed Spacer

K

KLF8 : Kruppel Like Factor 8

L

LamB1 : Laminine B1

LEF : Lymphoid enhancer-binding factor

LH-RH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone

LLA : Leucémie Lymphoblastique Aigüe

LSD1 : Lysine Specific Demethylase

M

m⁶A : N6-methyladenosine

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

mESC : murine Embryonic Stem Cells

Met : Méthylation 2'- O ribose

miARN : microARN

MKI67 : Marker of proliferation KI-67

MMP : Matrix Metallopeptidase

MSRB3 : Methionine Sulfoxide Reductase B3

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

mTORC1 : mammalian Target of Rapamycin Complex 1

N

N-Cadhérine : Neural Cadhérine
NCL : Nucléoline
NGS : Nottingham Grading System
NIH : National Institute of Health
NuRD : Mi-2-Nucleosome Remodeling and Deacetylase

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PABP : Poly(A) Binding Protein
PDCD4 : Programmed Cell Death 4
PI3K : Phosphoinositide 3-kinases
PIC : Pre-initiation complex
PLA : Proximity Ligatin Assay
PR : Progesterone Receptor
pRB : Retinoblastoma protein
pré-ARNr 47S : ARNr précurseur 47S
PRC2 : multisubunit Polycomb Repressive Complex 2
PRTF : Pol I Transcript-Release Factor
PTC : Peptidyl Transferase Center

R

RAMBAR : Retinoic Acid Metabolism Blocking Agent Retinamide
RAPTOR : Regulatory-Associated Protein of TOR
Rb : Retinoblastoma
RBP : RNA Binding Protein
RH : Récepteurs Hormonaux

RHOC : Ras Homolog Family Member C

RP : Ribosomal Protein

RPS : Ribosomal Protein of the Small sub-unit

RPL : Ribosomal Protein of the Large sub-unit

S

S6K : S6 Kinase

SAM : S-adenosyl méthionine

SBR : Scarff Bloom and Richardson

SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results

Site A : Amino-acyl tRNA binding site

Site E : tRNA Exit site

Site P : Peptidyl tRNA binding site

SL1 : Selectivity Factor 1

snoARN : Small nucleolar ARN

snoRNP : small nucleolar RiboNucleoProtein

SUZ12 : Suppressor of Zeste 12

T

TAF : TBP Associated Factors

TBP : TATA Binding Protein

TCF : T-cell-specific transcription factor

TGFβ : Transforming Growth Factor β

TGFβR : Transforming Growth Factor β Receptor

TMA : Tissue MicroArray

TN : Triple Négatif

TNM : Tumor, Node, Metastasis

TTF1 : Transcription Terminaison Factor

U

UBF : Upstream Binding Factor

uORF : upstream Open Reading Frame

UPC : Upstream Control Element

UTR : Untranslated Region

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

X

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis
Protein

X-DC : X-linked dyskeratosis congenita

Y

YB-1 : Y-box binding protein-1

Z

ZEB : Zinc-finger E-box Binding
Homeobox

ZO : Zonula Occludens

PREAMBULE

La traduction est une étape indispensable de l'expression génique. Celle-ci est effectuée par les ribosomes qui permettent la traduction d'ARN messagers (ARNm) en protéines. Il est maintenant connu qu'une régulation traductionnelle favorise le développement de diverses pathologies, dont le cancer. En effet, les cellules cancéreuses présentent une biogenèse des ribosomes augmentée, qui accroît le taux de synthèse protéique permettant ainsi aux cellules tumorales de maintenir leur état hyperprolifératif. Différentes études ont montré que l'inhibition de la traduction éliminait spécifiquement les cellules cancéreuses, ainsi les cellules cancéreuses sont dites « dépendantes » de cette augmentation de la synthèse protéique. De plus, la régulation de la traduction de certains ARNm par des éléments régulateurs présents sur l'ARNm lui-même, est également impliquée dans la tumorigenèse, notamment en induisant une variation de traductionnelle d'ARNm codant des oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeurs.

Le rôle des ribosomes dans la régulation de la traduction spécifique de certains d'ARNm a été longtemps négligé. En effet, les ribosomes qui sont des complexes macromoléculaires composés d'ARN ribosomiques (ARNr) et protéines ribosomiques (RP), ont toujours été considérés comme de simples effecteurs de la traduction. Or, depuis une dizaine d'années, le concept de « ribosomes spécialisés » a émergé. En effet, il s'avère que les ribosomes peuvent présenter une variation de composition au niveau des ARNr et/ou des RP qui altérerait leur activité de traduction pour mettre en place différents phénotypes. Notre équipe a montré pour la première fois qu'une variation de la méthylation en 2'-O des riboses (2'-O-Me) des ARNr par surexpression de la protéine fibrillarine (FBL), la 2'-O ribose méthyltransférase des ARNr, modifie l'activité de traduction du ribosome. Cette variation de la 2'-O-Me des ARNr favorise la traduction d'ARNm contenant des structures de type Internal Ribosome Entry Sites (IRES) et qui codent pour des oncogènes.

En oncologie clinique, le cancer du sein reste un des problèmes majeurs de santé publique. En effet, cette pathologie représente le cancer le plus fréquent et le plus mortel chez la femme. Cette mortalité est causée par l'existence d'une forte hétérogénéité du cancer du sein. Il n'existe pas un cancer du sein, mais plusieurs maladies distinctes avec des caractéristiques biologiques et cliniques différentes. Ainsi la classification des tumeurs mammaires selon des caractéristiques spécifiques est très importante pour déterminer le pronostic et la prise en charge

des patientes atteintes de cancers du sein. Parmi les tumeurs mammaires les plus agressives, on compte les cancers « Triples Négatifs » dont la chimiothérapie reste le seul traitement disponible, malgré les nombreux effets secondaires et l'apparition quasi-systématique de résistances. L'amélioration de la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein passe par l'identification de voies de signalisation innovantes impliquées dans la tumorigenèse mammaire, qui permettront d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques anticancers.

Un nouveau sous-type des cancers du sein a été récemment identifié, les Claudin-Low, qui sont des cancers agressifs. Ces tumeurs dérivent de la transdifférenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, un processus biologique appelé Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT). Ce processus contribue directement d'une part, à l'initiation tumorale et d'autre part, à la progression tumorale. L'EMT est induite par une reprogrammation transcriptionnelle suite à l'expression de facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TFs) qui favorise l'expression des marqueurs mésenchymateux et inhibe celle des marqueurs épithéliaux. En plus de cette régulation transcriptionnelle, il apparaît qu'une reprogrammation traductionnelle jouerait un rôle clé dans la mise en place et le maintien de l'EMT, notamment grâce à une augmentation de la traduction dépendante des IRES de certains ARNm codant des EMT-TFs et des marqueurs mésenchymateux. En revanche, le rôle du ribosome dans la reprogrammation traductionnelle survenant dans l'EMT n'a jamais été exploré.

La traduction et plus spécifiquement les ribosomes n'ont encore été jamais étudiés dans les cancers du sein. Or l'altération de la composition du ribosome et son impact sur le contrôle traductionnel pourrait s'avérer être un nouveau mécanisme de tumorigenèse, mais aussi une nouvelle source de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques dans les cancers du sein. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est de démontrer l'existence d'altérations de composition des ribosomes dans les cancers du sein. Pour atteindre cet objectif, deux axes ont été développés (1) identifier les altérations d'expression des facteurs de la biogenèse des ribosomes induisant des altérations de la production et de la composition des ribosomes dans les tumeurs mammaires et déterminer leurs valeurs pronostiques ; et (2) identifier les altérations de composition des ribosomes, de même que les altérations de traduction survenant dans un modèle cellulaire de l'EMT.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : La Traduction

La traduction est la dernière étape de l'expression génique, qui permet la synthèse de protéines à partir d'ARNm. Aujourd'hui, il émerge que la régulation de cette étape joue un rôle crucial dans la tumorigenèse au même titre que la régulation transcriptionnelle et épigénétique, ouvrant ainsi de nouvelles opportunités thérapeutiques en oncologie. Dans ce chapitre, les différentes étapes de la traduction, les principaux éléments du processus de la traduction qui jouent un rôle direct ou indirect dans le cancer et enfin l'utilisation de la traduction en clinique seront mis en lumière. Le contenu de ce chapitre a permis d'écrire une partie d'une revue scientifique qui est présente à la fin de ce chapitre (Marcel et al., 2018).

I. Les étapes de la traduction

La traduction est un processus composé de trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

1. L'initiation de la traduction

L'étape d'initiation correspond principalement au recrutement de ribosomes matures 80S sur l'ARNm et la reconnaissance du codon initiateur. Il existe plusieurs modalités d'initiation de la traduction selon la structure présente sur l'ARNm. Cependant chez les eucaryotes, la plus fréquente est celle connue sous l'appellation, initiation de la traduction coiffe dépendante. La grande majorité des ARNm contiennent une structure m^7GpppN , appelée coiffe. Lorsque le complexe d'initiation formé par la sous-unité 40S du ribosome et des facteurs d'initiation de la traduction reconnaissent la coiffe pour débiter la traduction, on parle d'initiation coiffe dépendante. Des modalités alternatives peuvent prendre place dans des conditions particulières. Ces modalités alternatives requièrent des éléments spécifiques contenus dans les ARNm comme des séquences IRES (cf. partie « Régulation de la traduction »). Les étapes majeures de l'initiation de la traduction canonique sont résumées dans la figure 1.

L'initiation débute avec la formation du complexe de pré-initiation : 43S-PIC, qui correspond au complexe permettant d'identifier le codon d'initiation AUG de l'ARNm à traduire (Hinnebusch, 2014; Hinnebusch and Lorsch, 2012; Jackson et al., 2010; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Cette machinerie est composée d'un complexe ternaire comprenant un ARN de transfert méthionine initiateur (Met-ARN_{ti}), le facteur canonique eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) lié à un GTP, la petite sous-unité du ribosome (40S) et 4 facteurs d'initiation (eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5). Le complexe 43S-PIC est ensuite recruté au niveau de la coiffe de

l'ARNm à l'aide de différents facteurs : PABP (Poly(A) Binding Protein) et des facteurs d'initiation (eIF4B, eIF4H et eIF4F) pour former le complexe 48S-PIC. eIF4F est un complexe composé de trois protéines : eIF4E, la protéine qui fixe la coiffe ; eIF4A, l'hélicase à ARN ; et eIF4G, la protéine de liaison entre eIF4E et PABP et qui permet le recrutement de la sous-unité 40S à l'ARNm via le complexe eIF3. Les protéines eIF4B et eIF4H augmentent l'activité hélicase de eIF4A permettant ainsi d'éliminer toutes structures secondaires se trouvant au niveau de la région 5' non traduite (5'UTR) située juste en amont du codon initiateur de l'ARNm. Ces facteurs facilitent donc la fixation de la petite sous-unité du ribosome à la coiffe (Rogers et al., 1999, 2001). PABP permet de rapprocher les deux extrémités de l'ARNm (aussi appelée conformation « closed loop ») en se fixant à la queue poly(A) située en région 3' de l'ARNm. PABP favorise le recrutement d'eIF4E à la coiffe de l'ARNm (Kahvejian et al., 2005). Une fois que le complexe 48S-PIC est attaché à la coiffe de l'ARNm, celui-ci va scanner la séquence 5'UTR de la coiffe jusqu'au codon initiateur. Pour avoir une bonne reconnaissance du codon initiateur, il est nécessaire que la sous-unité 40S garde une conformation « ouverte » au niveau du site d'entrée de l'ARNm et du site de passage de l'ARNm. La sous-unité 40S garde cette conformation via l'action synergique de eIF1 et eIF1A (Passmore et al., 2007). La reconnaissance du codon initiateur par le complexe 48S-PIC induit l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 permettant le relargage de plusieurs facteurs du complexe 48S-PIC : eIF2-GDP, eIF5, le complexe eIF3 et eIF1 (Jackson et al., 2010). Le relargage d'eIF1 induit un changement de conformation de la sous-unité 40S qui passe d'une conformation ouverte à une conformation fermée pour empêcher le scanning de l'ARNm. La grande sous-unité du ribosome (60S) est ensuite recrutée pour assembler le ribosome mature et fonctionnel 80S. L'assemblage du ribosome 80S est catalysé par l'hydrolyse de eIF5-GTP qui est suivi par la sortie de eIF5B et eIF1A du ribosome 80S. L'assemblage du ribosome 80S signale le démarrage de l'élongation de l'ARNm.

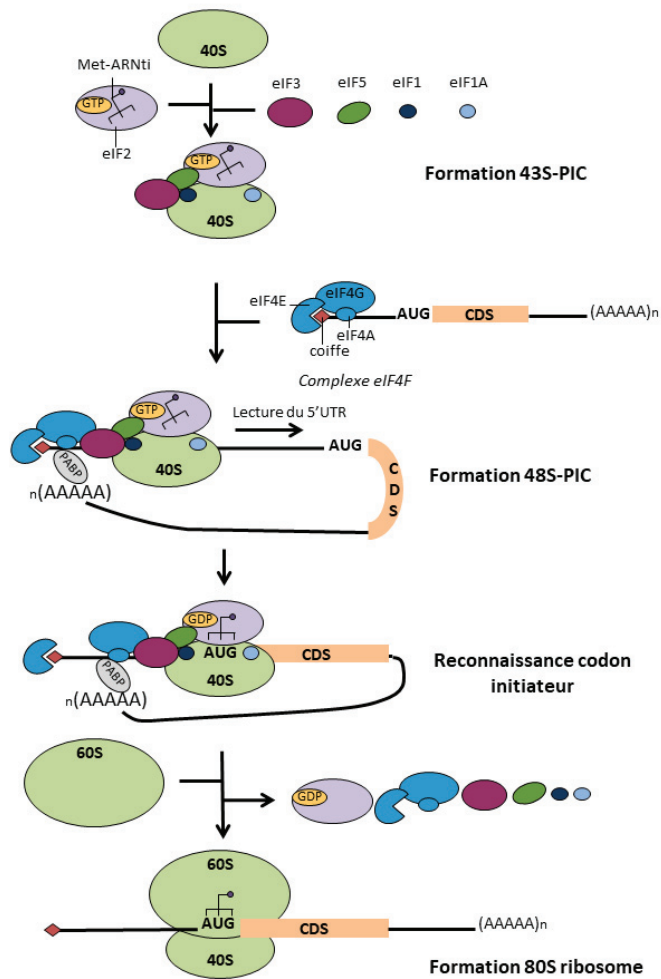


Figure 1. Vue d'ensemble de l'initiation de la traduction coiffe dépendante

La traduction coiffe dépendante peut être divisée en quatre étapes principales : la formation du 43S-PIC, l'assemblage du 48S-PIC, la reconnaissance du codon initiateur et la formation du ribosome fonctionnel 80S. Le complexe 43S-PIC est formé par le recrutement de différents eIFs (eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5) et du complexe ternaire eIF2-Met-ARNti-ribosome 40S. Le complexe 43S-PIC est ensuite recruté à la coiffe de l'ARNm via l'interaction avec le complexe eIF4F pour former le complexe 48S-PIC. Le complexe eIF4F est composé de plusieurs protéines : eIF4E, la protéine qui interagit avec la coiffe ; eIF4A, l'hélicase à ARN ; et eIF4G, la protéine qui permet de lier eIF4E, PABP et eIF3, favorisant donc le recrutement du complexe 43S-PIC à la coiffe de l'ARNm. PABP permet de former une boucle, entre la coiffe et queue poly(A) de l'ARNm pour favoriser l'interaction entre eIF4E et la coiffe, et augmenter l'efficacité d'initiation de la traduction. Le complexe 48S-PIC va ensuite scanner la séquence 5'UTR de l'ARNm jusqu'au codon initiateur. La reconnaissance du codon initiateur induit l'hydrolyse de eIF2-GTP et la libération des différents facteurs d'initiation de la traduction (eIF2-GDP, eIF1, eIF3, eIF5 et eIF4F). La grande sous unité du ribosome (60S) va rejoindre le 40S pour former un ribosome mature 80S, et démarrer l'élongation de la traduction. Figure issue de (Marcel et al., 2018).

2. L'élongation de la traduction

L'étape d'élongation correspond au décodage des codons de l'ARNm par les anticodons des ARNt en acide aminés pour former une protéine.

Lorsque le 80S est formé, l'ARN initiateur transportant une méthionine (Met-ARNti) se fixe au site P (peptidyl tRNA binding site) de la petite sous-unité du ribosome permettant ainsi le démarrage de l'élongation (Figure 5). Trois principaux facteurs sont impliqués, les facteurs d'élongation : eEF1A (eukaryotic Elongation Factor 1A) et eEF2 et le facteur d'initiation : eIF5A (Dever et al., 2018; Richter and Coller, 2015). eEF1A-GTP et un des amino-acyl ARNt (aa-ARNt) disponibles dans la cellule forment un complexe qui va rentrer dans le site A (amino-acyl tRNA binding site) de la petite sous-unité 40S. L'aa-ARNt présente un anticode complémentaire au deuxième codon de l'ARNm permettant ainsi l'appariement ARNt-ARNm. Cet appariement induit l'hydrolyse du GTP permettant le relargage de eEF1A-GDP qui sera recyclé par eEF1B. Cet appariement modifie la conformation du ribosome pour favoriser le contact entre la terminaison 3' de l'aa-ARNt du site A et le Met-ARNti du site P au niveau de la grande sous-unité du ribosome. La sous-unité 60S permet ensuite la formation de la liaison amide entre la méthionine porté par l'ARNti du site P et l'acide aminé porté par l'aa-ARNt du site A. La formation de la liaison amide permet d'ajouter un acide aminé supplémentaire à la protéine en cours de synthèse. La chaîne polypeptidique de la protéine en cours de synthèse est ensuite transférée à l'aa-ARNt du site A. Par l'intermédiaire du facteur eIF5A qui s'insère dans le site E (tRNA exit site) du ribosome, les deux ARNt changent de position qu'on appelle également « translocation ». La translocation correspond aux déplacements de l'aa-ARNt du site A au site P et l'ARNt initiateur désacétylé du site P au site E. Le site A étant libéré, le facteur eEF2-GTP s'insère dans le site A induisant une hydrolyse du GTP et le relargage d'eEF2-GDP et une modification de conformation du ribosome pour le rendre compétent à la réception du prochain aa-ARNt dans le site A. Ce cycle se répétera ainsi jusqu'au codon-stop de l'ARNm.

3. La terminaison de la traduction

L'étape de terminaison correspond à l'arrêt de la traduction et la libération de la protéine synthétisée.

La terminaison a lieu à la fin de la séquence codante de l'ARNm, au niveau d'un codon-stop. Deux principaux facteurs interviennent à cette étape : eRF1 et eRF3 (eukaryotic Release Factors) (Dever and Green, 2012). Lorsque le codon-stop de l'ARNm se trouve au niveau du

site A du ribosome, le complexe eRF1-eRF3-GTP se fixe au site A, induisant une hydrolyse du GTP. eRF3-GDP est ainsi libéré du complexe, et la protéine ABCE1 (ATP-binding cassette sub-family E member 1) se fixe ensuite au facteur eRF1 pour l'activer. L'activité peptidyl ARNt hydrolase d'eRF1 permet l'hydrolyse de la liaison entre l'ARNt et la chaîne polypeptidique de la protéine permettant ainsi la libération de la protéine synthétisée.

Le ribosome 80S, ainsi que les différents facteurs associés sont ensuite dissociés via l'action de divers facteurs d'initiations : eIF3, eIF1 et eIF1A et de ABCE1. Après dissociation des ribosomes en deux sous-unités (60S et 40S), ceux-ci seront recyclés pour redémarrer la traduction (Jackson et al., 2010).

II. La régulation de la traduction

Dans cette partie, la régulation de la traduction au niveau de l'initiation sera traitée. L'initiation est considérée comme l'étape « limitante » de la traduction et de nombreuses études ont été effectuées pour déchiffrer les différents mécanismes de régulation de cette étape. Néanmoins, il est important de savoir que l'initiation n'est pas la seule étape régulée. Il émerge par exemple que l'élongation peut également être régulée et importante pour différents contextes biologiques (Richter and Coller, 2015). Deux types de régulations de l'initiation seront décrites, la régulation qui impacte la traduction « coiffe dépendante » et qui affecte donc la synthèse protéique globale ; et la régulation qui impacte seulement certains ARNm affectant donc la traduction d'ARNm spécifiques.

1. Régulation de la traduction globale

La régulation de la synthèse protéique globale passe souvent par la régulation de l'activité des eIFs. Les mécanismes de régulation de la traduction coiffe dépendante les plus décrits et connus aujourd'hui, sont ceux qui impliquent les voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR, Ras/ERK/mTOR et p38/MAPK (Nandagopal and Roux, 2015; Roux and Topisirovic, 2012, 2018). En réponse à des facteurs de croissance comme l'insuline ou les hormones, la protéine kinase mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) phosphoryle différents facteurs comme 4E-BPs (4E-Binding Protein) ou S6K (S6 kinase) qui vont à leurs tours, réguler l'activité de plusieurs facteurs ayant un rôle dans l'initiation de la traduction.

Les protéines 4E-BPs agissent comme répresseurs de la traduction en bloquant la formation du complexe de reconnaissance de la coiffe, eIF4F. En effet, les protéines 4E-BP partagent avec eIF4G le même site de fixation à eIF4E. Ainsi, les protéines 4E-BPs rentrent en compétition

avec eIF4G pour se fixer à eIF4E (Marcotrigiano et al., 1999; Pause et al., 1994). La phosphorylation des 4E-BPs par mTOR induit leurs dissociations à eIF4E. La dissociation des 4E-BPs favorise la formation et le recrutement du complexe eIF4F sur la coiffe.

La protéine S6K est une protéine kinase impliquée dans le contrôle traductionnel et régulée par mTOR. Les différentes protéines cibles connues de cette kinases sont RPS6 (Ribosomal Protein of the Small subunit 6), eIF4B et PDCD4 (Roux and Topisirovic, 2018). La phosphorylation de la protéine ribosomique RPS6 induit une diminution de la synthèse protéique globale (Ruvinsky et al., 2005). En revanche le mécanisme de régulation de l'initiation par RPS6 reste encore obscur. Etant donné que RPS6 se trouve dans l'interface entre la grande et la petite sous-unité du ribosome (Nygård and Nika, 1982), nous pouvons supposer que la phosphorylation de RPS6 pourrait avoir un rôle dans la formation du ribosome 80S. eIF4B est important pour la stimulation de l'activité hélicase de eIF4A. Une phosphorylation de eIF4B par S6K permet son activation, et donc une augmentation de l'activité eIF4A induisant une augmentation de la traduction coiffe dépendante. PDCD4 (Programmed Cell Death 4) est également un facteur qui régule l'activité d'eIF4A (Yang et al., 2003). En effet, une phosphorylation par S6K permet la fixation de PDCD4 à eIF4A. PDC4 rentre en compétition avec eIF4G et induit donc une inhibition de l'activité d'eIF4A, et la formation d'eIF4F, et donc la répression de l'initiation coiffe dépendante. La voie p38/MAPK régule également la traduction globale via les MNKs (MAPK interacting kinases) qui par une interaction avec eIF4G, phosphorylent eIF4E et altèrent ainsi l'activité de reconnaissance de la coiffe (Roux and Topisirovic, 2012).

Un autre mécanisme de régulation de la traduction coiffe dépendante implique eIF2 α , une des trois sous-unité d'eIF2. Une phosphorylation sur la sérine 51 d'eIF2 α par 4 kinases (EIF2AK1 à EIF2AKI4), inhibe l'activité d'eIF2B (Jackson et al., 2010). eIF2B est responsable du recyclage d'eIF2 car il permet la conversion du eIF2-GDP en eIF2-GTP. Ainsi une inhibition du facteur eIF2B bloque le recyclage d'eIF2 ce qui diminue ainsi la quantité du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNti et donc une diminution de la traduction.

2. Régulation de la traduction spécifique

La régulation de la traduction spécifique de certains ARNm repose généralement sur des éléments régulateurs présents dans les séquences UTR des ARNm (Figure 2). En effet, il existe au niveau des 5'UTR et 3'UTR de l'ARNm des éléments séquences spécifiques et des éléments structuraux qui contrôlent la traduction spécifique d'ARNm (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Truitt and Ruggero, 2016).

a. Région 5'UTR

Au niveau 5'UTR de l'ARNm, divers éléments pouvant réguler la traduction sont connus : la présence de structures secondaires, les structures IRES (Internal Ribosome Entry Sites), les motifs 5'TOP (5' terminal oligopyrimidine tract), les uORFs (upstream Open Reading Frame), ou des méthylations de base.

i. Les structures secondaires

Les ARNm contenant des structures secondaires complexes comme les structures en tige-boucle dans leur 5'UTR sont décrites comme étant dépendantes de l'expression et/ou de l'activité d'eIF4E. Ces ARNm par leur complexité en 5'UTR sont en temps normal discriminés et donc moins traduits (Nandagopal and Roux, 2015; Roux and Topisirovic, 2012, 2018). Néanmoins une surexpression d'*eIF4E* est suffisante pour surmonter les limites traductionnelles imposées par ces structures secondaires (Koromilas et al., 1992). En effet, une surexpression d'*eIF4E* augmente le recrutement d'eIF4A dans le complexe eIF4F et stimule ainsi l'activité d'eIF4A pour dérouler efficacement les structures secondaires. Ainsi les ribosomes sont recrutés plus facilement pour favoriser la traduction de ces ARNm (Feoktistova et al., 2013; Svitkin et al., 2001). D'autres facteurs canoniques de la traduction sont sensibles aux structures secondaires des ARNm. Une étude de Lee et collègues, a montré pour la première fois que le complexe eIF3 pouvait réguler la traduction spécifique d'ARNm (Lee et al., 2016, 2015). Ces ARNm ont la particularité de présenter une structure tige-boucle au niveau 5'UTR qui permet la liaison d'eIF3 à l'ARNm. De manière intéressante, eIF3 peut agir à la fois comme activateur ou inhibiteur de la traduction de certains ARNm.

ii. Les structures IRES

La structure IRES est un des éléments les plus étudiés dans la régulation spécifique d'ARNm. Les IRES ont été initialement découvertes dans le virus et permettent la traduction d'ARNm non coiffés ou lorsque la traduction coiffe dépendante est réprimée (Jackson et al., 2010; Pelletier and Sonenberg, 1988). Chez les virus, les structures IRES sont classées en quatre groupes selon leurs structures secondaires et des facteurs d'initiation de la traduction qui sont requis pour leur activité (Jackson et al., 2010; Komar and Hatzoglou, 2011). Cette structure permet, via l'implication de protéines de liaison à l'ARN qu'on appelle ITAF (IRES Trans Acting Factors), le recrutement du ribosome avec ou sans eIFs à l'ARNm sans utiliser la coiffe (King et al., 2010). Les structures IRES permettent donc une initiation de la traduction qui est indépendante de la coiffe. Plusieurs études ont montré qu'en condition de divers stress

cellulaires où la synthèse protéique est réduite, une traduction dépendante des structures IRES est mise en place afin de favoriser la traduction de certains ARNm en réponse à ces stimuli (Godet et al., 2019; Komar and Hatzoglou, 2011; Spriggs et al., 2008).

iii. Les motifs 5'TOP

Le motif 5'TOP est majoritairement contenu dans les ARNm codant pour les différents facteurs de la machinerie traductionnelle, en particulier des RP (Ribosomal Proteins). Durant l'arrêt du cycle cellulaire ou la privation de nutriments, le motif 5'TOP est nécessaire pour la répression spécifique de la traduction (Damgaard and Lykke-Andersen, 2011). Notamment, ce motif serait important pour l'inhibition de la biogenèse des ribosomes lorsque les conditions de croissances cellulaires sont limitées. Par exemple, lorsque la croissance cellulaire est réduite, le motif 5'TOP est nécessaire pour la répression de la traduction des ARNm codant pour les RP comme RPL32 ou RPS16 (Levy et al., 1991). En revanche le mécanisme de régulation par ce motif n'est pas encore bien défini mais il nécessite la fixation d'une RBP (RNA Binding Protein) au motif 5'TOP (Damgaard and Lykke-Andersen, 2011).

iv. Les uORFs

Les uORFs sont connus comme étant des répresseurs de la traduction de l'ORF, et se trouvant en aval de l'ORF (Hinnebusch et al., 2016; Jackson et al., 2010; Young and Wek, 2016). Selon le nombre et la longueur d'uORFs présents avant l'ORF, ces uORFs peuvent avoir différents impacts, notamment la ré-initiation de la traduction ou la dissociation du 80S après lecture du premier uORF, le retardement de l'élongation ou le contournement d'uORFs. Ces différents événements peuvent avoir lieu individuellement ou en combinaison dans un même ARNm, induisant une variation de sa traduction.

v. Méthylations de base

Un nouveau mécanisme de régulation de la traduction indépendante de la coiffe, en cas de stress cellulaire, a été récemment identifié. En effet, Meyer et collègues ont déterminé que la présence d'une méthylation de base, le N6-méthyladenosine (m^6A) sur le 5'UTR des ARNm était suffisante pour induire la traduction indépendamment d'eIF4E, mais qui implique la fixation d'eIF3 et le recrutement direct du complexe 43S-PIC sur l'ARNm (Meyer et al., 2015). Ce type de régulation fait partie du domaine de l'épitranscriptomique, un champ émergent dans la régulation de l'expression génique (Frye et al., 2016).

b. Région 3'UTR

Au niveau 3'UTR des ARNm, la présence de sites de fixation de microARN (miARN) et de protéines de liaison à l'ARN ou RBP peut réguler la traduction spécifique de certains ARNm.

i. *Les microARNs*

Les miARNs sont des petits ARN non codants qui altèrent l'expression génique en se liant de manière séquence-spécifique à l'ARNm cible par dégradation et/ou répression de la traduction. Le mécanisme de réduction de la traduction de l'ARNm cible par le miARN n'est pas encore complètement élucidé. Plusieurs hypothèses ont été proposées : le déplacement de PABP de la queue poly(A) brisant ainsi la conformation « closed loop » de l'ARNm ; le recrutement d'inhibiteur de la traduction via la protéine GW182 (une protéine de liaison comme les protéines Argonautes qui est importante pour le rôle de « silencing » des miARN ou PABP) ; et la dissociation du complexe eIF4F par le déplacement d'eIF4A des ARNm cibles par les miARNs (Iwakawa and Tomari, 2015).

ii. *Les protéines de liaison à l'ARN*

Les RBP présentent plusieurs fonctions y compris la régulation de l'initiation de la traduction des ARNm présentant des motifs de liaison à ces RBP. Ces motifs de liaison aux RBP (qui peuvent être situés également en 5'UTR) peuvent être séquence-spécifiques ou des éléments structuraux. Parmi les éléments structuraux, nous avons par exemple le complexe GAIT (Gamma Interferon Inhibitor of Translation) au niveau 3'UTR. Une étude a montré qu'en réponse à un signal induit par les IFN- γ , le complexe GAIT se fixe au niveau 3'UTR de l'ARNm pour réprimer la traduction de gènes pro-inflammatoires par inhibition du recrutement du complexe 48S-PIC (Mukhopadhyay et al., 2009).

En plus des éléments présents dans les régions UTR des ARNm, la machinerie traductionnelle peut affecter la traduction spécifique d'ARNm, comme par exemple eIF3, décrit précédemment. Enfin, il émerge que les ribosomes et les ARNt en plus d'être des « effecteurs » de la traduction, sont des « régulateurs » de la traduction. En effet, le concept de « ribosomes spécialisés » est récemment apparu et suggère que selon la composition du ribosome, son activité de traduction serait différente (Xue and Barna, 2012). Ce concept novateur sera décrit dans le chapitre 2.

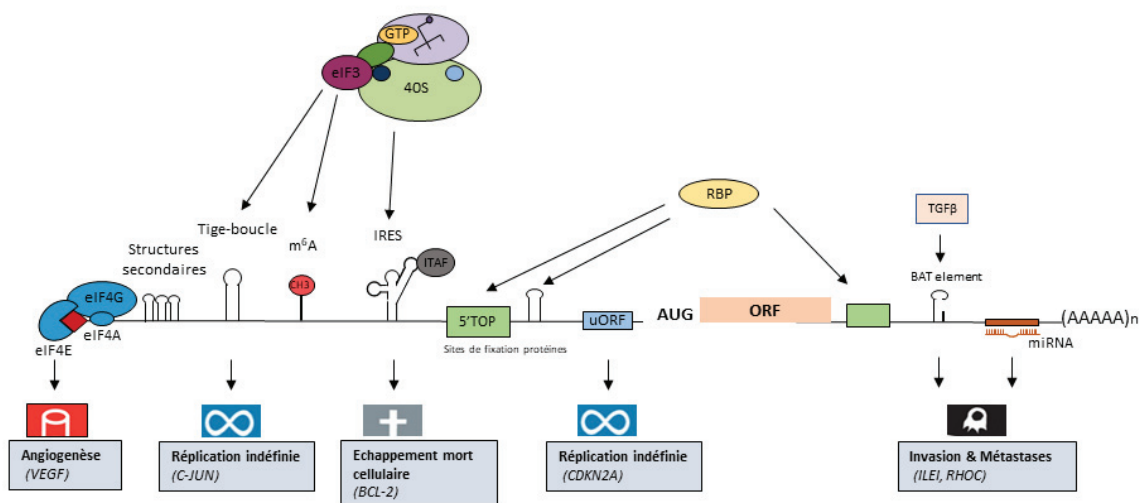


Figure 2. Les mécanismes de régulation de la traduction spécifique et leurs implications dans la tumorigenèse.

Il existe différents mécanismes pour réguler la traduction des ARNm de manière spécifique. Au niveau 5'UTR, la présence de structures (secondaires complexes, de tige-boucles ou d'IRES) et de séquences (uORFs, sites de liaison au RBP et sites de fixation aux miARNs) dans les ARNm permettent de réguler leur traduction. Cette sélectivité de traduction de certains ARNm favorise la tumorigenèse. En effet les cellules cancéreuses peuvent acquérir diverses caractéristiques « pro-tumorales » comme la capacité de multiplication infinie, d'invasion, d'échappement à la mort cellulaire ou de stimuler le développement de vaisseaux sanguins. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

III. Traduction et cancer

Dans le domaine de la biologie du cancer, le rôle de la régulation traductionnelle a été relativement sous-estimé. Différentes études ont montré qu'il n'existait pas de corrélation parfaite entre la quantité des ARNm et la quantité de protéines synthétisées, permettant ainsi de mettre en avant l'importance de la régulation traductionnelle notamment dans la tumorigenèse (Dalla Venezia et al., 2019; Orringer et al., 2003; De Sousa Abreu et al., 2009).

Dans un premier temps, je décrirai comment la régulation de la traduction à la fois globale et spécifique peut être impliquée dans le développement tumoral et, dans un deuxième temps, les nouvelles opportunités cliniques qui s'ouvrent aujourd'hui en cancérologie grâce au domaine de la traduction.

1. Rôle du contrôle traductionnel dans la tumorigenèse

Il émerge aujourd'hui qu'une régulation de la traduction globale et spécifique des ARNm procure différents avantages à la cellule cancéreuse lors du processus de transformation et de progression tumoral.

a. Rôle de la régulation traductionnelle globale des ARNm dans la tumorigenèse

En 1896, une augmentation de la taille et du nombre des nucléoles a été observée pour la première fois dans les cellules cancéreuses (Penzo et al., 2019; Silvera et al., 2010). Depuis, une hypertrophie des nucléoles a été observée et utilisée comme signe distinctif des cellules cancéreuses dans différents types de tumeurs (Ceccarelli et al., 2000; Derenzini, 2000; Derenzini et al., 2009; Penzo et al., 2019; Pich et al., 2000). Les nucléoles étant les lieux de synthèse des ribosomes, la taille des nucléoles peut être un indicateur du taux de synthèse des ribosomes. Les cellules cancéreuses sont hyperprolifératives et donc requièrent une grande quantité de protéines pour soutenir cet état. Les nucléoles doivent fournir un grand nombre de ribosomes pour permettre une synthèse protéique efficace (Stępiński, 2018). Ainsi, des nucléoles hypertrophiques dans des cellules cancéreuses reflèteraient une augmentation de la biogenèse des ribosomes et donc une augmentation de la synthèse protéique nécessaire pour soutenir la croissance et la prolifération de ces cellules tumorales (Derenzini et al., 2009; Montanaro et al., 2008). Une des plus claires démonstration de la relation directe entre synthèse protéique, biogenèse des ribosomes et tumorigenèse a été apportée par Barna et collègues (Barna et al., 2008). Pour cette étude ils ont utilisé des souris développant des tumeurs spontanées induites par l'oncogène *Myc*. Ces souris présentent des mutations dans le gène codant pour une protéine ribosomique afin de réduire l'augmentation de la synthèse protéique. La diminution de la quantité des ribosomes diminue la synthèse protéique, et induit une inhibition de la croissance et de la prolifération cellulaire, bloquant ainsi le potentiel tumorigénique de *Myc*. Cette étude montre donc l'importance d'une augmentation de la synthèse protéique dans la tumorigenèse et particulièrement dans celle induite par *Myc*.

De plus dans les cancers, les voies de signalisation comme PI3K/AKT/mTOR, Ras/ERK et MAPKs sont souvent activées. Cette activation induit une augmentation de l'initiation de la traduction globale qui passe par une stimulation des facteurs eIF4F principalement (Truitt and Ruggero, 2016). Par ailleurs l'expression de différents facteurs d'initiation de la traduction (eIFs) est altérée dans divers cancers (Bhat et al., 2015; Ruggero, 2013; Silvera et al., 2010). La plupart de ces facteurs sont sur-exprimés, ce qui pourrait soutenir la nécessité des cellules cancéreuses à augmenter la synthèse protéique globale. On parle « d'addiction » des cellules cancéreuses à une augmentation de la synthèse protéique globale (Bruno et al., 2017). Néanmoins, différentes études ont montré qu'une variation de l'expression des eIFs, et particulièrement *eIF4E*, présente un très faible impact, voire aucun impact, sur la traduction globale mais plutôt une variation de la traduction d'ARNm spécifiques (Aza-Blanc et al., 2012; Truitt et al., 2015).

b. Rôle de la régulation traductionnelle spécifique des ARNm dans la tumorigenèse

Différentes données permettent aujourd'hui de soutenir qu'un contrôle traductionnel n'est pas seulement impliqué dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses mais permet aussi une reprogrammation spécifique de l'expression génique qui favorise l'établissement de différents phénotypes cancéreux. Quelques exemples pour chaque mécanisme de régulation traductionnelle spécifique d'ARNm (cf. partie « Régulation de la traduction spécifique ») et impliqués dans la tumorigenèse seront décrits dans cette partie (Figure 2).

i. Rôle des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction

Parmi les facteurs de l'initiation de la traduction, eIF4E est aujourd'hui l'un des facteurs le mieux décrit et le plus étudié dans le développement tumoral (De Benedetti and Graff, 2004; Piserà et al., 2018; Siddiqui and Sonenberg, 2015). Une variation d'expression et d'activité d'eIF4E régule la traduction de différents ARNm via des 5'UTR complexes. Une surexpression d'*eIF4E* augmente la traduction de gènes impliqués dans l'angiogenèse tels que *VEGF* et *FGF2* (De Benedetti and Graff, 2004; FS. et al., 1996). En revanche, une diminution de l'expression d'*eIF4E* réprime la traduction de facteurs neutralisant les ROS (Reactive Oxygen Species), comme *FTH1* et *GCLC*, permettant d'induire la mort cellulaire (Truitt et al., 2015). Une augmentation de l'activité d'eIF4E par phosphorylation via la voie MAPK favorise la traduction de différents ARNm comme *MMP3* et *MMP9* qui sont impliqués dans l'invasion cellulaire et le développement de métastases (Furic et al., 2010). Parmi les ARNm qui présentent un site de liaison à eIF3, un enrichissement d'ARNm qui sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire a été identifié (Lee et al., 2015). Par exemple, il a été montré qu'eIF3 module différenciellement la traduction de régulateurs mitotiques, en augmentant la traduction de *c-Jun* (régulateur positif de la mitose) et en diminuant la traduction de *BTGI* (régulateur négatif). Ainsi dans un contexte tumoral, eIF3 pourrait soutenir, par une reprogrammation traductionnelle, une hyperprolifération des cellules cancéreuses. Une autre étude a montré que certaines sous-unités d'eIF3 modulent la traduction de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ce qui pourrait apporter un avantage aux cellules cancéreuses (Shah et al., 2016). En revanche le mécanisme moléculaire de régulation traductionnelle impliquant eIF3 est encore inconnu.

ii. Rôle des uORFs

Liu et collègues ont mis en évidence pour la première fois que, dans des patients prédisposés à développer des mélanomes, une seule mutation localisée dans la région 5'UTR du gène

suppresseur de tumeurs *CDKN2A* qui introduit une uORF conduit à une diminution de la traduction de ce gène (Liu et al., 1999).

iii. Rôle des structures IRES

Le rôle de la traduction IRES dépendante en réponse à des stress cellulaires comme l'hypoxie dans le cancer est aujourd'hui bien étudié. Par exemple, une étude a mis en évidence que dans le cancer du sein en réponse à l'hypoxie, une alternance de la traduction coiffe dépendante vers la traduction IRES dépendante se produit. Cet échange induit une résistance à la mort cellulaire et favorise l'angiogenèse par activation de la traduction IRES dépendante du gène anti-apoptotique *BCL-2* et pro-angiogénique *VEGF-A* (Braunstein et al., 2007). D'autres études ont montré que des gènes clés dans l'initiation tumorale présentent des séquences IRES et dont la traduction peut être contrôlée, comme le gène suppresseur de tumeur *TP53* et l'oncogène *MYC* (Nanbry et al., 1997; Yang et al., 2006).

iv. Rôle des microARNs

Les miARNs peuvent agir soit comme des miARNs suppresseurs de tumeurs soit comme des miARNs oncogènes selon leur habilité à inhiber l'expression d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs (Oliveto et al., 2017). Une étude conduite par Ma et collègues, a démontré que dans les cancers du sein, l'expression du miARN10-b (miR10b) est augmentée (Ma et al., 2007). Cette augmentation induit la réduction de la traduction d'une des cibles de miR10b, le gène *HOXD10* (Homeobox D10). Une diminution d'*HOXD10* inhibe son effet suppresseur sur le gène *RHOC* (Ras Homolog Family Member C), une protéine importante dans l'invasion et le développement de métastases. Ainsi la traduction d'*HOXD10* par le biais de miR10b module le pouvoir invasif et de développement de métastases dans les cancers du sein.

v. Rôle des protéines de liaison à l'ARN

Les motifs de liaison des RBP peuvent être également impliqués dans la tumorigenèse comme par exemple dans l'EMT (Epithelio-Mesenchymal Transition). L'EMT est un processus impliqué à la fois au niveau de l'initiation et de la progression tumorale (Brabletz et al., 2018; Nieto et al., 2016). Les ARNm qui présentent l'élément BAT (Transforming growth factor Beta Activated Translation) au niveau de leur 3'UTR, voient leur traduction augmenter en réponse au TGF β notamment les facteurs *DAB2* et *ILEI* qui sont impliqués dans l'induction de l'EMT dépendant de TGF β (Chaudhury et al., 2010).

2. Utilisation de la traduction en clinique

Les efforts mis en œuvre pour décrypter les différents mécanismes de reprogrammation traductionnelle lors de la tumorigenèse ont permis d'initier des études dans le développement de nouvelles thérapies impliquant les différents facteurs impliqués dans cette reprogrammation. Pour cette partie, seules les stratégies qui ciblent directement la traduction et donc, les facteurs canoniques de l'initiation de la traduction seront décrits. Je ferai notamment un focus sur le complexe eIF4F. En effet, les membres du complexe eIF4F sont surexprimés dans de nombreux cancers. Cette surexpression est souvent associée à l'agressivité tumorale et à la survie des patients, justifiant ainsi leur intérêt en tant que cibles thérapeutiques (Bhat et al., 2015). Il existe deux types de stratégies pour cibler eIF4F : le ciblage direct des différents facteurs du complexe ; et le ciblage indirect qui passe par l'inhibition des voies de signalisation en amont. Les différents agents qui ciblent la traduction et qui sont aujourd'hui soit en essais cliniques soit acceptés par la FDA (Food and Drug Administration) ou EMA (European Medicines Agency) sont présentés dans le tableau 1.

a. Les inhibiteurs directs du complexe eIF4F

Dans les inhibiteurs ciblant directement le complexe eIF4F sont inclus : les inhibiteurs ciblant eIF4E et son activité ; les inhibiteurs empêchant la formation du complexe eIF4F ; et enfin les inhibiteurs d'eIF4A.

i. Ciblage d'eIF4E

La stratégie développée pour réduire l'expression d'*eIF4E* est l'utilisation des oligonucléotides antisens (4EASO pour « eIF4E Antisense Oligonucleotide » ou LY2275796) qui consiste à utiliser une séquence d'ADN simple brin ou d'ARN complémentaire à la séquence de l'ARNm d'*eIF4E* pour induire sa dégradation. Des études conduites par Graff et collègues ont montré pour la première fois qu'une utilisation de 4EASO dans des cellules cancéreuses du sein et de la prostate induisait une apoptose (Graff et al., 2007, 2009). De plus, dans des modèles de xénogreffes de cancer du sein et de prostate, la présence d'une seconde génération de 4EASO réduit la croissance tumorale et présente un pouvoir anti-angiogénique (Graff et al., 2007). L'administration de 4EASO à des modèles murins ne présente pas de toxicité significative. Une étude clinique en Phase I a montré, dans patients avec des tumeurs solides de stade avancé, que le 4EASO était tolérable mais sans activité antitumorale significative (Hong et al., 2011). Aujourd'hui, des essais cliniques effectués en combinaison avec des chimiothérapies sont en cours dans divers cancers.

Une autre stratégie pour cibler eIF4E est d'inhiber son activité d'interaction avec la coiffe des ARNm en utilisant des analogues de la coiffe. La ribavirine est considérée comme un analogue de la coiffe, or ce fait est controversé car différentes études ont échoué à mettre en évidence une interaction entre eIF4E et la ribavirine (Kentsis et al., 2004, 2005; Westman et al., 2005; Yan et al., 2005). Une étude de Phase I a été effectuée sur des leucémies myéloïdes aigües montrant que cibler une surexpression d'*eIF4E* via la rivabarine pouvait être bénéfique pour les patients (Assouline et al., 2009). Un autre analogue de la coiffe est la molécule 4Ei-1 (N-7 benzyl guanosine monophosphate tryptamine phosphoramidate pronucleotide) dont une étude a démontré qu'elle induisait la sensibilisation à la molécule chimiothérapeutique, la gemcitabine, dans les cellules cancéreuses du poumon par la dégradation d'eIF4E par le protéasome (Li et al., 2013).

ii. Ciblage de l'interaction eIF4E-eIF4G

Aujourd'hui, une nouvelle stratégie très prometteuse consiste à inhiber l'interaction entre eIF4E et eIF4G pour empêcher la formation du complexe eIF4F. Il existe deux types de molécules : les inhibiteurs d'interactions eIF4E/eIF4G comme 4EGI-1 ; et les inhibiteurs des interactions eIF4E/eIF4G et eIF4E/4E-BP comme 4E1RCat. 4EGI-1 présente une activité antitumorale à la fois *in vitro*, par induction d'apoptose dans diverses lignées de myélomes, et *in vivo*, par inhibition de la croissance tumorale dans des modèles de xéno greffes de mélanome et de cancer du sein (Chen et al., 2012; Descamps et al., 2012). Dans un modèle de lymphome induit par c-Myc, 4E1RCat annule la résistance au traitement chimiothérapeutique contenant la doxorubicine (Cencic et al., 2011).

iii. Ciblage d'eIF4A

Trois inhibiteurs d'eIF4A sont aujourd'hui connus, l'hippuristanol, la patéamine A et le silvestrol, tous ayant une activité antitumorale *in vitro* and *in vivo*.

L'hippuristanol est une molécule qui de par sa fixation à eIF4A inhibe l'activité hélicase en bloquant eIF4A dans une conformation fermée (Bordeleau et al., 2006; Sun et al., 2014). Le passage d'une conformation fermée à ouverte est importante pour l'activité hélicase du facteur eIF4A, cette conformation fermée indique une fixation d'eIF4A à l'ARNm. Ainsi l'hippuristanol bloque l'activité hélicase ainsi que la liaison d'eIF4A libres ou en complexe dans eIF4F aux ARNm. Quelques données ont montré que l'hippuristanol, *in vitro*, induit l'apoptose dans diverses lignées cellulaires de leucémies et lymphomes et *in vivo*, inhibe la croissance tumorale dans des modèles de souris de leucémie à cellules T de l'adulte (Cencic et al., 2013; Senba et al., 2011).

De façon contraire, la patéamine A et le silvestrol semblent être des inducteurs de dimérisation. Ils augmentent l'affinité de fixation d'eIF4A à la coiffe d'ARNm de manière séquence indépendante inhibant ainsi le recrutement d'eIF4A au complexe eIF4F (Bordeleau et al., 2008; Cencic et al., 2009; Low et al., 2005).

La patéamine A est une molécule qui induit l'apoptose dans différentes lignées tumorales (Hood et al., 2001). Mais aujourd'hui, les études se concentrent dans le développement d'analogues de la patéamine A plus stables et plus simples à synthétiser. On peut citer la DMDAPatA (Des-Methyl DesAmino Pateamine A) qui présente une activité anticancer à la fois *in vitro*, avec une activité antiproliférative dans 32 différentes lignées cancéreuses, et *in vivo*, avec une diminution de la croissance tumorale dans des modèles xéno greffes de mélanomes (Kuznetsov et al., 2009). Le silvestrol est la molécule la plus étudiée parmi les inhibiteurs d'eIF4A (Cencic et al., 2009). Des études ont montré que le silvestrol diminue la croissance tumorale dans des modèles de xéno greffes de cancer du sein et de la prostate. Il améliore également la sensibilité à la doxorubicine dans des modèles de lymphomes induites par *PTEN* ou une surexpression d'*eIF4E* (Bordeleau et al., 2008; Cencic et al., 2009). Malgré ces résultats prometteurs, il est encore difficile aujourd'hui de développer des médicaments anticancers dérivés du silvestrol, notamment à cause de résistance induite par la surexpression des protéines de transport de la superfamille des ATP-Binding Cassette (ABC) (Gupta et al., 2011). La surexpression de ces protéines de transport favorise l'exclusion du silvestrol. Des efforts sont maintenant investis pour développer des analogues afin d'améliorer le potentiel anticancer du silvestrol et surmonter ces limitations (Hawkins et al., 2014; Liu et al., 2012).

b. Les inhibiteurs indirects du complexe eIF4F

Ces inhibiteurs indirects consistent à cibler les voies de signalisation qui régulent en amont le complexe eIF4F, comme les voies mTOR ou MNK. Il faut savoir que le complexe eIF4F n'est pas la seule cible en aval de ces voies, et donc une inhibition de ces voies n'affectent pas seulement la traduction mais aussi d'autres processus cellulaires.

i. *Inhibiteurs de la voie mTOR*

La protéine mTOR est une kinase qui est formée de deux complexes moléculaires distincts, le complexe mTORC1 et le complexe mTORC2. Il existe trois types d'inhibiteurs de la voie mTOR : les inhibiteurs de mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin Complex 1) ; les inhibiteurs qui ciblent à la fois les deux complexes contenant mTOR et PI3K ; et les inhibiteurs qui ciblent les deux complexes contenant mTOR.

La rapamycin (ou sirolimus) est un inhibiteur de mTORC1. La rapamycin forme un complexe avec la protéine FKBP12 pour se lier au domaine FRB (FKBP and rapamycin-binding) de mTOR (Chen et al., 2006). Cette interaction induirait un changement de conformation affaiblissant l'interaction entre Raptor (Regulatory-Associated Protein of TOR) et mTOR pour inhiber le complexe mTORC1 (Oshiro et al., 2004; Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, 2010). Le complexe mTORC2 diffère de mTORC1 par la présence de la protéine Rictor (Rapamycin-Insensitive Companion of TOR), ce qui le rend donc insensible à la rapamycin (Sarbasov et al., 2004). Des analogues de la rapamycin (ou rapalogues) ont été développés pour améliorer leurs caractéristiques pharmacocinétiques. Les analogues les plus connus sont l'everolimus, temsirolimus et ridaforolimus, les deux premiers étant approuvés par la FDA et l'EMA et le dernier actuellement en essai clinique de Phase III (Tableau 1). En revanche, l'efficacité des rapalogues dans le traitement des cancers est encore limitée et pour plusieurs raisons. Une inhibition de mTORC1 n'inhibe pas complètement 4E-BP1 tandis qu'une autre voie est activée (PI3K/mTORC2/AKT) pour compenser cette inhibition. Cette activation de la voie AKT pourrait favoriser la croissance et la survie des cellules cancéreuses (Bhat et al., 2015; Kim et al., 2017; Martineau et al., 2014).

Pour contrecarrer ces limitations, une deuxième génération d'inhibiteurs de mTOR a été développée. En effet, l'apparition d'inhibiteurs spécifiques des kinases mTOR, en utilisant des antagonistes-ATP et de molécules qui inhibent à la fois les kinases mTOR et PI3K (qui est la principale kinase pour activer AKT), permettent d'empêcher la réactivation de la voie AKT induite indépendamment par mTORC2 (Fan et al., 2006; Feldman et al., 2009). Ces deux types d'inhibiteurs sont aujourd'hui en essai clinique de Phase I/II, utilisés en monothérapie ou en combinaison avec différents traitements.

Concernant les inhibiteurs de mTOR (les inhibiteurs qui ciblent les mTOR présentes à la fois dans le complexe mTORC1 et mTORC2), plusieurs études semblent montrer que l'activité anticancer est encore faible mais la toxicité et la tolérance sont assez satisfaisantes (Bendell et al., 2015; Ghobrial et al., 2016; Naing et al., 2012; Powles et al., 2016a). Pour les inhibiteurs de mTOR et PI3K, quelques études cliniques en Phase I/II ont montré que la toxicité de ces molécules, surtout XL-765 (ou voxalisib) est tolérable (Awan et al., 2016; Blackwell et al., 2015; Dolly et al., 2016; Papadopoulos et al., 2014; Wen et al., 2015). En revanche d'autres études ont montré qu'en combinaison avec le rapalogue, l'everolimus, ou seul, l'activité antitumorale de ces inhibiteurs est très limitée (Carlo et al., 2016; Makker et al., 2016; Markman et al., 2012; N. et al., 2016; Powles et al., 2016b; Salazar et al., 2018; Wise-Draper et al., 2017).

ii. *Inhibiteurs de la voie MNK*

Une étude princeps a montré dans un modèle de xéno greffe de gliome dans lequel MNK1 est inactivé, qu'une réduction de la quantité d'eIF4E phosphorylée est couplée à une diminution de la croissance tumorale (Ueda et al., 2010). Cette étude a permis d'envisager le ciblage des MNKs comme approche thérapeutique. Aujourd'hui, parmi les inhibiteurs de MNKs qui bloquent la phosphorylation d'eIF4E, CGP5730 et la cercosporamide sont les plus connus et présentent une activité anticancer. Dans un panel de lignées cellulaires de cancers du sein, CGP57380 a montré un pouvoir antiprolifératif par une diminution de la synthèse de la protéine Cyclin D1 (Wheater et al., 2010). La cercosporamide présente des effets à la fois *in vitro*, par une diminution de la prolifération, de la capacité de migration et d'invasion dans des cellules cancéreuses colorectales et de mélanomes ; et *in vivo*, par une diminution de la croissance tumorale dans des modèles de xéno greffes de mélanomes, de leucémies myéloïdes aiguës et de cancers colorectaux (Altman et al., 2013; Konicek et al., 2011).

Néanmoins ces molécules présentent des limitations, notamment le manque de spécificité. En effet, la cercosporamide et CGP57380 ciblent d'autres kinases comme Janus Kinase 3 et Casein Kinase 1, respectivement (Diab et al., 2014; Konicek et al., 2011). Pour pallier ce problème, le développement de nouveaux inhibiteurs pour augmenter leur sélectivité sont en cours (Diab et al., 2014). Une autre stratégie est l'utilisation de molécules RAMBAR (Retinoic Acid Metabolism Blocking Agent Retinamide) qui inhibent la phosphorylation d'eIF4E par dégradation de MNK1 (Ramalingam et al., 2014). Ce nouvel inhibiteur de MNK induit une diminution des capacités de migration et d'invasion, de la croissance cellulaire et une augmentation d'apoptose dans des cellules de cancer du sein.

La traduction est donc une étape majeure dans l'expression génique. Les mécanismes de régulation de la traduction globale et ceux qui régulent une traduction spécifique sont de mieux en mieux caractérisés. Cette meilleure caractérisation des mécanismes de régulation a permis de mettre en évidence le rôle émergent de la traduction dans la tumorigenèse. L'initiation de la traduction est un domaine novateur dans le développement de traitements anticancers, dont il reste encore beaucoup à explorer. Beaucoup d'efforts sont actuellement réalisés pour cibler les acteurs directs de la traduction comme le complexe eIF4F. En effet, aujourd'hui d'autres inhibiteurs pourraient être très prometteurs comme ceux qui permettraient de cibler le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARN^ti ou la synthèse des ribosomes par inhibition de l'ARN polymérase I (Aktas et al., 2013; Bhat et al., 2015; Bywater et al., 2012; Drygin et al., 2011).

Tableau 1. Les inhibiteurs de la traduction actuellement utilisés en clinique ou en essai clinique

Mécanisme	Drogue	Etat d'avancement	Types de cancers	Références
Inhibiteurs directs du complexe eIF4F				
<i>Réduction expression eIF4E</i>	LY2275796 (4EASO)	Phase I	<ul style="list-style-type: none"> Cancers avancés 	(Hong et al., 2011)
<i>Analogue de la coiffe</i>	Ribavarin	Phase I	<ul style="list-style-type: none"> Leucémies Myéloïdes Aigües 	(Assouline et al., 2009)
Inhibiteurs indirects du complexe eIF4F				
<i>Inhibiteurs mTORC1</i>	Rapamycin (Sirolimus)	Phase I (En combinaison)	<ul style="list-style-type: none"> Cancers avancés Leucémies Myéloïdes Aigües Cancers du Poumon non à Petites Cellules 	(Abu-Khalaf et al., 2015; Cohen et al., 2012) (Perl et al., 2009) (Sarkaria et al., 2007) (Yao et al., 2011)
	Everolimus (Afinitor)	Approuvé par FDA et EMA (Monothérapie ou en combinaison)	<ul style="list-style-type: none"> Tumeurs neuroendocrines pancréatiques Tumeurs neuroendocrines gastriques/pulmonaires Cancers du sein métastatiques HR+ HER2- 	(Yao et al., 2015) (Baselga et al., 2012; Piccart et al., 2014; Yardley et al., 2013) (Motzer et al., 2008)
		Approuvé par la FDA	<ul style="list-style-type: none"> Carcinomes à Cellules Rénales Astrocytomes Sous-Ependymaire à Cellules géantes 	(Franz et al., 2013)
		Phase II	<ul style="list-style-type: none"> Cancers Gastriques avancés 	(Doi et al., 2010; Ohtsu et al., 2013)
	Temsirolimus (Torisel)	Approuvé par FDA et EMA Approuvé par EMA	<ul style="list-style-type: none"> Carcinomes à Cellules Rénales avancés Lymphomes des cellules du manteau 	(Hudes et al., 2007) (Hess et al., 2009)
	Ridaforolimus	Phase III Non approuvé par FDA en 2012	<ul style="list-style-type: none"> Sarcomes métastatiques 	(Demetri et al., 2013)
<i>Inhibiteurs mTOR et PI3K</i>	XL-765 (Voxtalib)	Phase I/II (En combinaison)	<ul style="list-style-type: none"> Cancers avancés Lymphomes Cancers du sein métastatiques HR+ HER2- 	(Papadopoulos et al., 2014) (Awan et al., 2016; Papadopoulos et al., 2015) (Blackwell et al., 2015)
	NVP-BEZ235 (Dactolisib)	Phase Ib/II (En combinaison)	<ul style="list-style-type: none"> Gliomes stades avancés Tumeurs neuroendocrines pancréatiques avancés 	(Wen et al., 2015) (Salazar et al., 2018)(N. et al., 2016)
		Phase Ib	<ul style="list-style-type: none"> Tumeurs solides métastatiques Carcinomes à Cellules Rénales Carcinomes urothéliales 	(Wise-Draper et al., 2017) (Carlo et al., 2016) (Seront et al., 2016)
	NVP-BGT226	Phase I	<ul style="list-style-type: none"> Tumeurs solides avancées 	(Markman et al., 2012)

	GDC-0980 (Apatolisib)	Phase I Phase II (En combinaison)	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs solides avancées • Cancers Endomètres avancés • Carcinomes à Cellules Rénales métastatiques 	(Dolly et al., 2016) (Makker et al., 2016) (Powles et al., 2016b)
<i>Inhibiteurs mTOR</i>	AZD-8055	Phase I	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs solides stade avancé 	(Naing et al., 2012)
	AZD2014 Victusertib	Phase I Phase II (En combinaison)	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphomes • Tumeurs solides • Carcinomes à Cellules Rénales Claires métastatiques 	(Basu et al., 2015) (Powles et al., 2016a)
	TAKK228	Phase I	<ul style="list-style-type: none"> • Cancers Hématologiques 	(Ghobrial et al., 2016)
	CC-223	Phase I	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs solides stade avancé • Myélomes Multiples 	(Bendell et al., 2015)

EMA : European Medicines Agency ; FDA : Food and Drug Administrations ; HR+ : Hormone-Receptor Positive ; HER2- : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Negative

IV. Revue scientifique

Review

40 Years of Research Put p53 in Translation

Virginie Marcel *, Flora Nguyen Van Long and Jean-Jacques Diaz

Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France; floranvl@gmail.com (F.N.V.L.); jeanjacques.diaz@lyon.unicancer.fr (J.-J.D.)

* Correspondence: virginie.marcel@lyon.unicancer.fr; Tel.: +33-(0)426-556-745

Received: 18 April 2018; Accepted: 18 May 2018; Published: 21 May 2018



Abstract: Since its discovery in 1979, p53 has shown multiple facets. Initially the tumor suppressor p53 protein was considered as a stress sensor able to maintain the genome integrity by regulating transcription of genes involved in cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair. However, it rapidly came into light that p53 regulates gene expression to control a wider range of biological processes allowing rapid cell adaptation to environmental context. Among them, those related to cancer have been extensively documented. In addition to its role as transcription factor, scattered studies reported that p53 regulates miRNA processing, modulates protein activity by direct interaction or exhibits RNA-binding activity, thus suggesting a role of p53 in regulating several layers of gene expression not restricted to transcription. After 40 years of research, it appears more and more clearly that p53 is strongly implicated in translational regulation as well as in the control of the production and activity of the translational machinery. Translation control of specific mRNAs could provide yet unsuspected capabilities to this well-known guardian of the genome.

Keywords: p53; translational control; ribosome; cancer

1. Introduction

The *TP53* gene codes the canonical p53 protein, which had been discovered as a cellular protein of 53 kDa co-immunoprecipitating with the large T antigen of SV40 virus in 1979 [1,2]. Using biochemical and molecular approaches, p53 protein was defined as a transcription factor in the early 1990s [3]. This protein is composed of a N-terminal transactivation domain (TAD) involved in the recruitment of transcriptional co-factors, a central DNA-binding domain (DBD) directly interacting with DNA in a sequence-dependent manner through specific p53-response elements, and a C-terminal domain of oligomerisation (OD), the p53 transcription factor being active as tetramer [4]. Historically, p53 was first described as an oncogene until it was discovered that the cloned version of p53 corresponds to a mutant form [3]. Since then, its function was tied up to its activity in stress response (radiation, carcinogen, ribonucleotide privation, oncogenic activation . . .). From its discovery, it was indeed known that p53 is stabilized and activated in response to stress in order to regulate transcription of numerous genes promoting cell cycle arrest, apoptosis, senescence or DNA repair, p53 being rapidly known as the “guardian of the genome” [5]. Addition of post-translational modifications inhibits interaction of p53 with the E3-ubiquitin ligase Hdm2 that promotes proteasome-dependent degradation in basal condition thus ensuring the maintenance of low p53 protein level in most of human cells. Based on the role of p53 in maintaining genome integrity in response to genotoxic and oncogenic stresses, p53 has been defined as a tumor suppressor [6]. This was supported by additional observations. First, more than 50% of human tumors carry a *TP53* mutation [7,8]. Second, all p53-null mice develop spontaneous tumors within their first year of life [9]. Finally, germline *TP53* mutation is associated with a familial syndrome, the Li-Fraumeni Syndrome, which is characterized by development of multiple tumors at

early onset [10,11]. Intriguingly, recent studies performed in mice suggest that p53 tumor suppressor activity is not strictly dependent upon major p53 effector pathways, such as cell cycle arrest and apoptosis, as expected [12–14]. However, it is still not clear whether its tumor suppressor activity could result from the additional biological cellular functions that have been recently linked to p53, including for example metabolism, maintenance of stem characteristics, reproduction or aging, to cite only some of them [15]. Moreover, it has to be said that depending on the nature of the *TP53* mutation, mutant p53 can exhibit opposite biological effects thus increasing the difficulty to draw a clear view of p53 activities [16]. Altogether, the view of p53-related biological functions has largely evolved since the discovery of p53 and there is no doubt it will continue.

One of the remaining questions in the field is how a single protein is able to integrate the myriad of internal and external stimuli to finely regulate cell-fate by selecting the appropriate genes within the repertoire of its target genes? Several mechanisms have been proposed. Most, if not all, rely on the high diversity of p53-responsive elements present in promoters of p53-target genes that differentially interact with distinct p53-containing complexes [16]. Indeed, p53 protein is subjected to numerous post-translational modifications (phosphorylation, acetylation, ubiquitination, sumoylation, neddylation, methylation . . .) that not only promote p53 stabilization but also confer p53 specificity to some target genes. Moreover, specificity of p53 binding to some target genes can also result from interaction with several proteins, including p53 isoforms or viral proteins [17,18]. However, in addition to directly regulate transcription, it appears that p53 alters the translational regulation of some mRNAs, thus adding a novel layer by which p53 can finely modulate gene expression [19–22].

While only few studies have been dedicated to understanding the role of p53-mediated translational regulation in the fine modulation of gene expression driven by p53, the relationship between p53 and translation has been largely reviewed to illustrate different facets of p53 biology since: (i) an increase in p53 mRNA translation contributes to p53 activation in response to stress [23]; (ii) alteration of ribosome biogenesis corresponds to one of the stresses able to activate a p53-dependent response (i.e., nucleolar or ribosomal stress) [24,25]; (iii) usage of alternative translation start sites allow expression of different p53 isoforms modulating p53 transcriptional activity [23,26,27]; and (iv) antibiotics targeting the translational machinery could restore wild-type p53 transcriptional activity from nonsense p53 mutant [28–30]. In a previous review, we discussed how translation contributes to tumor suppressive of p53 [31]. In the present review, we will focus on the molecular mechanisms by which p53 regulates translation of specific mRNAs. Following a brief overview of the basics of translational regulation and its involvement in cancer, we will discuss the role of p53 in translational reprogramming, either through direct or indirect intervention, to attempt discerning whether p53-dependent translation of some specific mRNAs could contribute to the p53-mediated regulation of gene expression.

2. Translation and Cancer

2.1. Regulation of Global Protein Synthesis and Cancer

Translation is one of the last steps of gene expression as it allows protein synthesis from mRNA. One of the major control of protein synthesis occurs during the initiation step of translation, which corresponds to formation of the mature human 80S ribosomes and binding of the initiator-methionyl non-coding transfer RNA (Met-tRNA_i) to the mRNA start codons (Figure 1). Since translation of the vast majority of cellular mRNAs requires presence of a chemical modification at their 5'-end (i.e., m⁷GpppN, also called the cap structure) that is bound by eukaryotic initiation factors (eIFs) to recruit ribosome, cap-dependent initiation is generally considered as the main mechanism regulating translation of all mRNAs at once (for reviews see [32,33]). Cap-dependent translation is finely regulated in response to stress (irradiation, heat-shock, nutrient privation . . .) by several signaling pathways, including PI3K/AKT/mTOR and RAS/MAPK for example, that modulate eIFs activity [34]. For example, mTOR (mammalian target of rapamycin) activates the eIFs binding

to cap structure thus promoting cap-dependent translation through the phosphorylation of several downstream effectors including 4E-BP1 (4E-binding proteins) [35,36]. Indeed, the non-phosphorylated 4E-BP1 form binds to eIF4E, directly competing with eIF4G for eIF4E binding, and thus inhibits the formation of eIF4F complex. In addition to these classical signaling pathways regulating the eIFs, quantitative variation of ribosomes and tRNAs can directly impact global protein synthesis. Indeed, ribosome biogenesis and global protein synthesis are closely and dynamically regulated to accommodate cell growth and proliferation [37,38]. For instance, MYC, a protein exhibiting proliferative and pro-survival activities, promotes protein synthesis of cancer cells by favoring synthesis of all the components of the intrinsic translational machinery, ribosomal RNA (rRNA), ribosomal proteins and tRNAs [39].

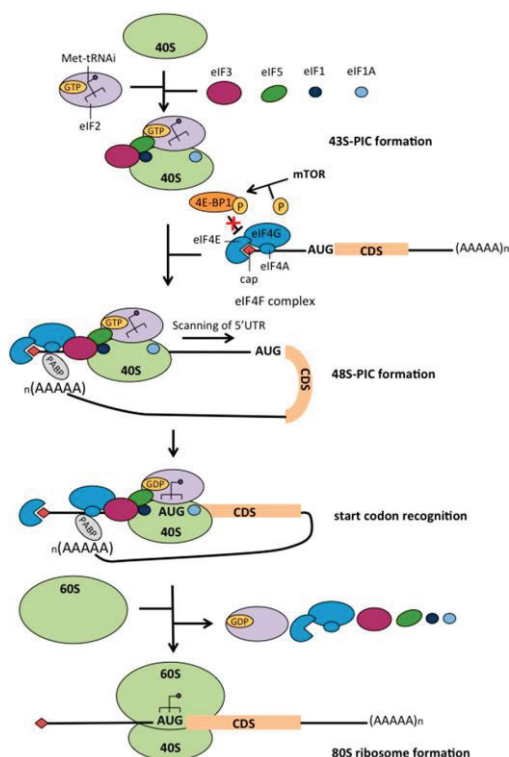


Figure 1. Overview of the cap-dependent translation initiation. Cap-dependent translation initiation can be divided in four main steps: (1) 43S-PIC formation, (2) 48S-PIC assembly, (3) start codon recognition and (4) formation of the 80S mature ribosome. The Met-tRNAⁱ bound to eIF2 and several eIFs (1, 1A, 3 and 5) are recruited to the 40S small sub-unit ribosome to form the 43S-PIC (1). The 43S-PIC is recruited to the cap of the mRNA through the interaction with the eIF4F complex in order to form the 48S-PIC (2). The eIF4F complex is composed of three proteins: the cap-binding protein eIF4E, the RNA helicase eIF4A and the scaffolding protein eIF4G that allows 43S-PIC binding to the mRNA cap through eIF3. Formation of eIF4F complex is mainly regulated by mTOR signaling pathway, mTOR phosphorylating the translation repressor 4E-BP1 that inhibits eIF4F complex formation through the binding of eIF4E. Moreover, a «closed loop» structure of the mRNA is formed through the interaction of the PABP to the mRNA poly (A) tail to increase translation initiation efficiency by favoring the binding of eIF4E to the cap. Then, the 48S-PIC scans through the mRNA 5'UTR until the start codon (3). The start codon is recognized by the Met-tRNAⁱ that induce the hydrolysis of eIF2-GTP bound and release of eIF2-GDP and the other eIFs (1, 3, 5 and eIF4F). The large subunit 60S of the ribosome will then join the 40S ribosome to form the 80S ribosome and start translation (4). (AAAAA)_n: poly (A) tail; CDS: mRNA coding sequence; eIF: eukaryotic initiation factor; Met-tRNAⁱ: initiator-methionyl non-coding transfer RNA; PABP: poly (A) binding protein; PIC: pre-initiation complex; 4E-BP: 4E-binding protein. Figure adapted from [32].

Expression and activity of many eIFs are increased in various cancers suggesting that cap-dependent translation initiation is increased in cancer [40,41]. Interestingly, several studies showed that targeting of the cap-recognition complex with direct inhibitors of eIFs or inhibitors of upstream signaling pathways decreases tumor growth and overall exhibit anti-cancer activity [42]. In addition to eIFs, the role of global protein synthesis resulting from increase in ribosome biogenesis has been well documented in cancer. Nucleoli are the sites of ribosome production located within the nucleus and, as early as 1896, increase of nucleoli size and number has been observed in cancer cells [40]. It has been rapidly proposed that hypertrophic nucleoli reflect an increase in ribosome biogenesis and protein synthesis rate that would be necessary to sustain cancer cell growth and proliferation [43]. High protein synthesis rate in cancer cells as a cause or consequence of cell transformation was equivocal for a long time, until a pioneering study reported the direct role of increased ribosome biogenesis coupled with a high protein synthesis rate in tumorigenesis [44]. In this elegant study, the elevated global protein synthesis rate driven by *Myc* oncogene observed in *Eμ-Myc* lymphomagenesis mice was reduced by introducing a mutation in the ribosomal protein L24 (*RPL24*) gene. Reduction of protein synthesis rate blocked cell growth, cell proliferation and tumorigenic potential, demonstrating the important role of protein synthesis hyperactivation in tumorigenesis. This observation was supported by recent studies showing that inhibiting ribosome biogenesis using RNA polymerase I inhibitors (responsible of rRNA transcription) or platinum-based drugs such as oxaliplatin, whose—unexpectedly—main mechanism involves defect in ribosome production, specifically kill cancer cells [45–47]. Overall, these data suggest that cancer cells are «addicted» to elevated protein synthesis rate. These discoveries not only offer novel therapeutic strategies for cancer treatment but also demonstrate the role of increased global translation in cancer. The role of p53 in regulating global protein synthesis has been previously reviewed, including one in the present issue [48]. Several studies indeed reported the role of p53 in inhibiting global protein synthesis, either by inhibiting ribosome biogenesis or cap-dependent translation through inhibition of eIF4E transcription, formation of eIF4E: eIF4G complex via its target gene TRIM22, or phosphorylation of 4E-BP1 [31,49–52].

2.2. Regulation of Specific mRNA Translation and Cancer

It is now admitted that in addition to alteration of global protein synthesis, alteration of specific mRNA translation corresponds to one of the strategies allowing cancer cells to rapidly adapt and survive in unfavourable conditions. Regulation of specific mRNA translation involves regulatory elements located within the mRNA itself, termed *cis*-regulatory elements [53]. In the 5′UTR of mRNAs, upstream open reading frames (uORFs) can be found that correspond to small open reading frames located upstream the main ORF. The exact function of uORFs is not yet totally deciphered however it appears very often that uORFs are translated by ribosomes whose release avoid initiation at the downstream start codon of the main ORF thus repressing its translation [54]. Interestingly, uORFs are often located in genes coding growth factors and oncogenes and overcoming uORF inhibitory effects gives advantage to cancer cells to favour their growth and proliferation by molecular mechanisms involving an interplay between several regulatory elements of the mRNA and of the translational machinery [55]. For example, binding of HuR (Hu antigen R) and hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) proteins to the 3′UTR mRNA of the proto-oncogene *HER2* in cancer cells overcome the inhibition of the repressive uORF located in the 5′UTR of *HER2* mRNA, thus contributing in *HER2* over-expression in some breast tumors [56]. In addition to uORFs, sequence-specific RNA elements are found in the 3′UTR of the mRNAs that are bound by microRNAs (miRNAs). miRNAs are 20 bp-long non-coding RNAs (ncRNAs) that bind to their complementary target within mRNAs in a sequence-specific manner to promote their translational repression followed by their degradation [57]. Several mechanisms have been proposed by which miRNAs reduce translation of their target mRNAs, including decreased ribosome recruitment to mRNA, blockage of translation elongation or increase in ribosome release [58]. In cancer, miRNA can act either as oncogenic miRNAs (oncomiRs) that

are up-regulated to repress tumor suppressor expression, or as tumor suppressor miRNAs that are downregulated to favour expression of oncogenes [59].

Other trans-regulatory factors have been identified including RNA-binding proteins (RBPs) that bind sequence or structural motifs located in the UTR of targeted mRNAs. Up to date, about 400 RBPs have been described that present diverse functions including regulation of translation initiation [60]. Among the structural motifs bound by RBPs, the Internal Ribosome Entry Sites (IRES) is the most studied. Around 10% of cellular mRNAs are predicted to contain IRES that require protein binding for regulating translation, including the mRNA encoding p53 [61,62]. These particular RBPs are termed ITAFs (IRES Trans-Acting Factors) and allow the recruitment of eIFs or ribosomes to the mRNAs [63,64]. Not only expression of ITAFs is altered in cancers but a switch from cap-dependent translation to IRES-dependent translation has been observed, altogether favouring expression of oncogenes promoting tumorigenesis and progression [40].

Exciting studies have recently showed that ribosomes and tRNAs are not “housekeeping complexes” that are passively involved in translation, but are direct regulators of specific mRNA translation favouring tumorigenesis. Indeed, ribosomes can present different compositions that are associated with distinct translational activity, this concept being known as the “specialized ribosome” concept [65]. The source of ribosome diversity results from the 80 ribosomal proteins (RPs) (stoichiometry, post-translational modifications, paralog incorporation . . .) or the 4 rRNAs (post-transcriptional modifications such as 2'-O-ribose methylations, pseudo-uridylation or base modifications). For example, RPS25-containing ribosome has been shown to coordinate translation of mRNA subset encoding proteins involved in vitamin B12 signaling [66]. Moreover, it has been reported that depending on the abundance of particular tRNA, translation of specific mRNAs enriched with the corresponding cognate codon can be selectively increased to participate in metastasis formation for example [53,67,68]. Altogether, it appears that like transcriptional or epigenetic regulation of gene expression, selective translation plays a key role in tumor initiation and progression.

3. Evidences from “Omic” Data for a Role of p53 in Regulating Translation

3.1. Genome-Wide Approaches Dedicated to Analysis of Translation

The emergence of genome-wide approaches dedicated to the analysis of translational regulation has allowed increasing interest of translational control in different physio-pathological contexts, including cancer [53]. Two main approaches have been developed [69]. First, polysome profiling coupled either to microarray or RNA-seq compares the distribution of each individual mRNA between cytoplasm and polysomal fractions (i.e., ribosome-bound mRNAs that are actively translated), in two biological conditions [70,71]. Second, the most recent approach termed ribosome profiling (or Ribo-seq) compares the protection by ribosomes of each individual cytoplasmic mRNAs quantified by RNA-seq [72]. These two approaches allow quantification of change in translational efficiency for each individual mRNA. Moreover, they are always coupled to classical analysis of cytoplasmic mRNA steady-state levels that is not only used as genome of reference to take into account expression of particular isoforms for example, but also to compare transcriptional and translational rate. However, in contrast to polysome profiling, Ribo-seq also gives qualitative information regarding precise location of ribosomes along mRNAs thus allowing the identification of novel translational initiation sites, regulatory elements in non-coding sequences or open-reading frames induced by frameshift events. Altogether, these approaches had opened up novel roads in the understanding of translational regulation in particular biological conditions, including those in response to p53 activation.

3.2. p53 Activation Affects Translation Efficiency of Some Specific mRNAs

Up to now, only four studies investigated the role of p53 in translational regulation using “omic” approaches (Table 1). Most of these studies used the same strategy. Endogenous wild-type p53 is activated using Nutlin-3a, a small molecule inhibiting p53/Hdm2 interaction by specific binding

to Hdm2 that inhibits p53-dependent proteasome degradation and activates p53 transcriptional activities [73]. However, each study used different cell lines as well as different concentrations and time-points (Table1). Despite these different experimental conditions, it appears that p53 activation was always associated with a change in translational efficiency of numerous mRNAs that were not associated with changes in transcription and/or stability [19–22]. In addition, Zaccara and colleagues showed that Nutlin-3a treatment did not affect gene expression at transcriptional or translational levels in MCF7-shp53 cells, thus clearly demonstrating that change in translation in response to Nutlin-3a treatment is dependent upon p53 [21].

Table 1. Genome-wide studies supporting role of p53 in translation regulation.

Study	“Omic” Approach	Experimental Conditions	Observations	Reference
Loayza-Puch et al. (2013)	Ribo-seq	Immortalized human primary BJ/MCF7 cells + Nutlin-3a (8 mM, 6 and 19 h)	Focus on time-dependent decrease in ribosomal genes	[22]
Zaccara et al. (2014)	Polysome profiling using microarray	MCF7 cells + Nutlin-3a (10 μ M, 16h)/Doxorubicin (1.5 μ M, 16 h)	About 350 genes altered at translational but not at transcriptional levels (23% of altered genes)	[21]
Andrysik et al. (2017)	Polysome profiling using RNA-seq	HCT-116/MCF7/SJSA cells + Nutlin-3a (10 μ M, 12 h)	About 1000 genes altered at translational but not at transcriptional levels (36% of altered genes)	[20]
Liang et al. (2018)	Polysome profiling using RNA-seq	HCT-116 cells + serum starvation (0.1% SVF, 16 h)	About 700 genes altered at translational but not at transcriptional levels (46% of altered genes)	[19]

When compared to cytoplasmic mRNA steady-state levels, the significant alteration in translational efficiency accounted for about 25 to 50% of the p53-associated change in gene expression, with an equivalent increase and decrease in translation efficiency (Table1). Overall, these studies indicate that, as expected, p53 activation is associated with a massive transcriptional reprogramming, accounting for 75–50% of p53-induced change in gene expression. However, in response to p53 activation, they showed an unexpected translational reprogramming of 25–50% of genes whose transcription and mRNA steady-state level are not altered by p53 activation.

The highest change in translation efficiency has been observed by comparing wild-type p53 and p53-null HCT-116 cells in response to serum starvation [19]. Translation is a high-consuming energy task, which is finely tuned to adapt the pool of translational machinery to the cell needs depending on the environment [74]. In response to nutrient deprivation as serum starvation, it is well established that global protein synthesis is reduced. However, repression of global protein synthesis in response to stress often co-occurs with an increase in translation of some specific mRNAs encoding proteins that are essential for cell survival. As expected, in the study of Liang and colleagues, the percentage of polysome-associated mRNAs was decreased in response to serum starvation in both wild-type p53 and p53-null cells [19]. This decrease in polysome-associated mRNAs was however more important in wild-type p53 HCT-116 cells than in p53-null ones suggesting that p53 contributes in the global reduction of protein in response to serum starvation. Although the molecular mechanism by which p53 regulates global protein synthesis has not been deciphered in this work, several studies reported that p53 directly or indirectly inhibits protein synthesis in response to stress by repressing the eIFs node or the ribosome biogenesis [31]. In parallel to this global reduction in protein synthesis, serum starvation in wild-type p53 cells was associated with an increase in translation efficiency without change in transcription and a buffering effect (i.e., no alteration of translation efficiency while their transcription was drastically decreased). Interestingly, these mRNAs were enriched in mRNAs coding proteins involved in several biological processes including cell-cycle progression and regulation of

cell proliferation, similarly to what observed in response to stress. These data illustrate the role of p53 in inhibiting global translation in response to stress condition that was paralleled with increased translation of pro-survival mRNAs.

In addition to affect the global protein synthesis, p53 also contributes in regulating specific mRNA translation. Interestingly, depending on the cell type, the activation of p53 by Nutlin-3a alters translation efficiency of mRNAs coding proteins involved in different biological processes. In MCF7 cells, both Nutlin-3a and doxorubicin-induced activation of p53 after 16h treatment exposure were associated with an increased translation of the mRNAs showing an uncoupled transcription/translation rate that code proteins with pro-apoptotic functions [21]. In contrast, p53 activation in immortalized human primary BJ cells was associated with a decreased translation in ribosomal genes, such as *RPL34* and *RPL23* that code ribosomal proteins [22]. Moreover, when comparing gene lists whose translation is altered without change in transcription in response to 12 h of Nutlin-3a treatment, only 0.2% was commonly altered in HCT-116, MCF7 and SJSA cell lines [20]. While no gene ontology was shown in this latter study, the mRNAs whose translation increases in treated cells are enriched in mRNAs coding proteins with zinc-finger related properties (HCT-116) or involved in histone/chromatin modeling (SJSA) (data not shown). These observations suggest that p53-associated change in translation could induce transcriptional reprogramming. One simple hypothesis can be that p53 activation quickly regulates translation of transcription-related genes to contribute in a profound but stable transcriptional reprogramming. This sequential translation/transcription regulatory mechanism would help cell in maintaining the change in transcriptional landscape induces by p53. To test this hypothesis, time-course studies based on an integrative “omic” approach will be required.

Altogether available “omic” data confirm that p53 regulates not only the global protein synthesis but also specific mRNA translation efficiency, making the proof-of-concept that p53 is a regulator of translation. However, one question is still open: is p53 regulating translation of some specific mRNAs directly or indirectly? In multiple genomic data sets generated to analyze the p53 signaling cascade, it has been shown that increase of p53-target genes at protein level starts from 6h [20]. Since a decrease in translation of mRNAs coding ribosomal proteins without change in transcription was observed from 6h post Nutlin-3a treatment [22], it remains difficult to answer this question using “omic” studies. Nevertheless, scattered pieces of evidence could be provided to try answering this question.

4. p53 as Direct Regulator of Translation

4.1. RNA-Binding and RNA-Related Properties of p53

Since the identification of p53, numerous studies have been conducted to characterize the biochemical activity of p53 protein. In parallel with accumulating evidences showing that p53 interacts with DNA, it rapidly appeared that p53 has also the capability to interact with RNA (for review see [75]). In 1991, it has been first suggested that p53 covalently binds to 5.8S rRNA through the C-terminal Ser389 residue, using murine p53-derived peptides corresponding to the last 15 C-terminal residues known to interact with DNA in a non-specific manner [76–78]. Later on, it has been reported using radio-labeling RNA retention assays on nitrocellulose filters that recombinant wild-type p53 purified from insect cells, binds RNA in a dose-dependent manner [79]. In contrast, recombinant p53 carrying the mutation Ala143 in the DNA-binding domain (DBD) failed to interact with RNA, suggesting that the p53 DBD is also involved in RNA-binding. Moreover, competition assays performed in presence of DNA or cytoplasmic RNA purified from the human HeLa cells revealed that p53 has a better affinity for RNA than DNA. It has also been shown using biophysical approaches and transmission electronic microscopy that addition of RNA drastically reduced the propensity of p53 DBD peptides to aggregate in vitro thus supporting the higher affinity of p53 for RNA compared to DNA [80]. Finally, yeast three-hybrid system-based screening detected p53 interactions with several different RNAs, demonstrating for the first time that p53 interacts with RNA in vivo [81]. In this study, the p53:RNA

interaction was dependent upon the C-terminal domain of p53. Moreover, no specific RNA sequences or secondary RNA structures involved in p53:RNA interaction have been identified, suggesting a non-specific interaction. However, while p53 interacted with only some specific RNAs in vivo, p53 was found to bind to all of the RNAs in vitro, suggesting the specificity of p53:RNA binding occurs in vivo but not in vitro. Although technical problems have been highlighted in these different studies and exact implications of p53 DBD and OD remain to be clearly deciphered [75], altogether these studies suggested that p53 presents unspecific and specific RNA-binding properties in vitro and in vivo, respectively.

Several studies reported that p53:RNA interaction promotes RNA base pairing of complementary sequence [79,82,83]. Recombinant p53 has indeed been shown to promote a 1600-fold increase of RNA:RNA annealing [82]. Moreover, p53: RNA interaction has been shown to contribute in the 3' to 5' exonuclease activity of p53 in cytoplasm that favors degradation of AU-Rich Elements (ARE)-containing mRNAs, which are usually protected by the RBP HuR [84]. Furthermore, a fraction of the cytoplasmic p53 protein has been reported to be associated with polysomes [77]. In cells, protein:RNA interaction, formation of RNA:RNA duplex but also 3' to 5' exonuclease activity are essential for RNA metabolism and regulation of gene expression, not only regarding mRNA splicing, mRNA stability but also mRNA translation. Thus, these biochemical studies that have been largely eclipsed at that time by the emerging DNA-related p53 properties fitting with its transcriptional activities, were only the starting point for some groups, which reported that p53 specifically interacts with some mRNAs to regulate their translation.

4.2. More Than a Simple RNA-Binding Protein: An IRES-TransActivating Factor?

Only few studies demonstrated the direct role of p53 in translational regulation based on the RNA-binding and RNA-properties of p53 (Figure 2). The first demonstration that p53 directly regulates mRNA translation has been done on its own mRNA. In 1995, binding assays using in vitro translated and radio-labeled p53 protein and in vitro transcribed and biotinylated p53 mRNA showed that p53 protein binds to the p53 mRNA 5'UTR, which forms a stable stem-loop structure, but not with the p53 mRNA coding sequences [85]. It has to be noted that later on, the 5'UTR of p53 mRNA has been shown to form an IRES structure [86,87]. Moreover, in vitro translation assays showed that wild-type p53 protein decreased translation of p53 mRNA while introduction of mutant p53 protein or antibody-induced inhibition of p53 did not alter p53 mRNA translation [85]. Mosner and colleagues suggest that p53 binding to its own mRNA regulate its translation most likely through its RNA annealing activity. Since then, it has been reported using in vitro assays that p53 binds directly but unspecifically with four different regions of the 5'UTR of FGF-2 mRNA and inhibits FGF-2 mRNA translation [88,89]. Interestingly, p53 was able to modify the secondary structure of the 5'UTR FGF-2 mRNA that has been identified later on as an IRES [90]. It has been proposed that p53 inhibits FGF-2 translation by impairing formation of 80S ribosome. Using gel shift assays and in vitro translation, p53 has also been shown to directly bind to the 5'UTR of CDK4 mRNA through a nucleotide sequence of 36 bp to inhibit its translation [91,92]. The first demonstration that p53 can bind RNA in cell to modulate translation has been recently published [93]. Using Proximity-Ligation Assay (PLA), p53 has been shown to bind 5'UTR of MDMX mRNA. In parallel, biochemical approaches based on in vitro translation assays demonstrate that p53 binds MDMX mRNA and inhibits its translation.

Usage of biochemical approaches allowed to clearly demonstrate the direct role of p53 in inhibiting translation. Most of these in vitro approaches were completed by the demonstration that reduction of endogenous protein level was associated with no alteration of endogenous mRNA levels. However, in these single gene-based approaches, demonstration that p53-dependent inhibition in translation occurs in cell using for example polysome profiling coupled to RT-qPCR is still lacking and remains a critical issue. Nevertheless, these data support a role for p53 in regulating translation through direct RNA-binding. In particular, a consensual molecular mechanism seems to emerge. It indeed appears that p53 specifically binds 5'UTR of mRNAs, which can form secondary structures known as IRES.

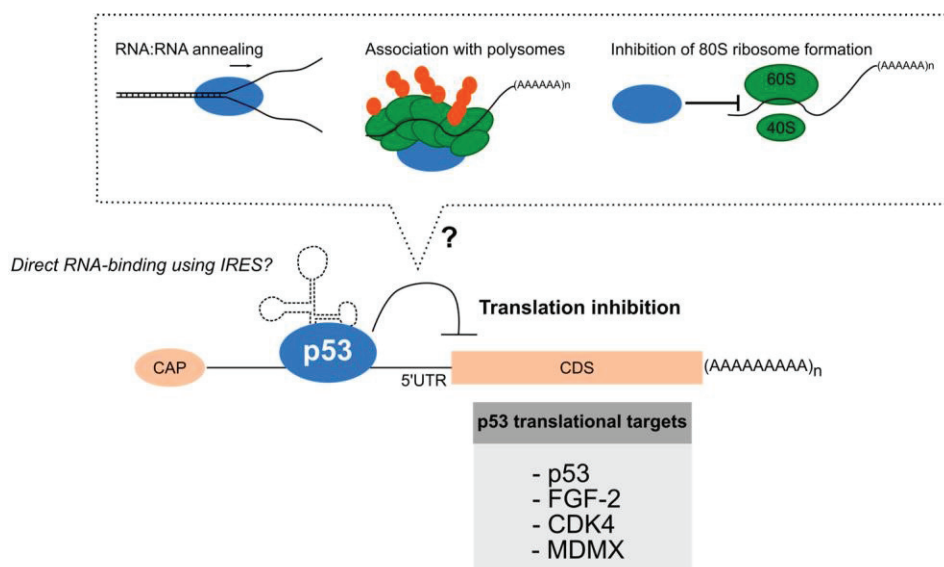


Figure 2. p53 interacts with the 5'UTR of some mRNAs to inhibit their translation. Direct interaction between p53 and 5'UTR of different cellular mRNAs has been identified using in vitro approaches, the p53: RNA interaction occurring in regions known to form IRES (Internal Ribosome Entry Sites). Binding of p53 on 5'UTR has been shown to inhibit translation of the related mRNAs although the molecular mechanism remains to be clarified (dotted box). It can either result from inhibition of 80S ribosome formation, presence of p53 into polysome or p53-dependent RNA:RNA annealing to favor formation of particular mRNA structures such as IRES. (AAAAA) n: poly-A tail protecting mRNA against degradation; CAP: chemical modification of 5' mRNA end involved in binding to canonical translation factors; CDS: coding sequence of mRNA; 5'UTR: 5'-UnTranslated Region; 40S: small ribosome subunit; 60S: large ribosome subunit; blue circle: p53 protein; orange dots: amino acids of neo-synthesized proteins.

As exposed earlier in this review, it appears that some cellular mRNAs contain IRES that regulate their translation through direct binding of RBPs termed ITAFs [94]. Based on the previous data, p53 can thus be viewed as an ITAF. Interestingly, IRES-dependent translation is intimately link to stress response since it favors translation of some specific mRNAs involved in cell survival when the global protein synthesis is decreased in response to stress [95]. By repressing IRES-dependent translation in response to stress, we can make the hypothesis that p53 could avoid translation of mRNA involved in cell survival. However, the studies detailed above have been performed using in vitro assays in normal condition and the role of p53 in inhibiting their translation in stress response has never been investigated. In addition, how does p53 directly regulate translation remains to be deciphered as well as whether the RNA-related properties of p53 contribute to it.

5. Indirect Regulation of Translation by p53

5.1. p53-Target Genes Acting as Regulator of Translation

Forty years of research in the p53 field have identified a myriad of genes whose transcription is regulated by the transcription factor p53. Among them, a large set of genes is dedicated and/or involved in the regulation of translation that cannot be exhaustively cited here (for review see [31]). Several p53-target genes code proteins regulating the global protein synthesis. It has been shown for example that p53 regulates transcription of several genes to inhibit the eIFs node, including *eIF4E* the main component of the eIFs node or *TRIM22* [49,52,96]. Moreover, p53 inhibits the activity of the three RNA polymerases, including RNA pol I and III that synthesize rRNA and tRNA [97–101]. Thus, by modulating transcription, p53 can reduce global protein synthesis to maintain a low protein

synthesis and thus represses tumorigenesis. It has indeed recently been demonstrating for the first time that increased rRNA synthesis is required for lung tumorigenesis driven by *KRAS-TP53* defects [102].

In addition to modulate global protein synthesis, several p53-target genes have been shown to regulate specific mRNA translation. First, p53 regulates transcription of ncRNAs involved in translational regulation, such as miRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs) that contribute in translation inhibition. In addition to regulate miRNA transcription, p53 has been shown to facilitate miRNA processing and their accessibility to DICER complex thus promoting their activity [103,104]. Among the p53-regulating miRNAs, the miR-34 family has been the first miRNAs identified as p53-target genes [105–107]. miR-34a has been shown to repress translation of several mRNAs, including for example C-Myc, Bcl-2 or Zeb [103,104]. In contrast to miRNAs, the role of lncRNAs in p53 biological activity is just beginning to emerge, although lncRNA-p21 has been shown to repress translation of JUNB and CNTNB1 [108,109]. Second, genome-wide analysis showed that p53 regulates the transcription of genes encoding RBPs, which modulate ribosome recruitment and elongation on particular mRNA [110–112]. For example, the p53-target gene RBM8 directly binds the HIF1 α mRNA to repress its translation by decreasing the eIFs:mRNA interaction [113]. It appears today that RBPs can form different protein complexes that co-regulate distinct specific subsets of mRNAs depending on the physiological conditions thus determining cell fate [112]. From this point of view, we can hypothesise that p53 coordinates transcription of RBP sets to regulate translation of some specific mRNA subsets thus refining the p53-induced transcriptome to promote definite cell fate program.

5.2. p53 and the “Specialized Ribosome” Concept

In the translation field, it has recently emerged that, in contrast to what expected, the components of the translational machinery (ribosome and tRNA) act as direct regulator of translation [114–116]. In addition to regulate expression and activity of classical factors involved in translational control, p53 has also been involved in the ribosome-modulated translation. Among the p53-target genes, several ones correspond to factors that directly catalyze rRNA chemical modifications involved in translational regulation, including small nucleolar RNAs (snoRNAs) or enzymes such as *FBL* or *DKCI* [115,117,118]. For example, it has been reported that inactivation of p53 transcriptional activity using expression of large T SV40 protein or shRNA strategies increases expression of *FBL*, the 2ⁱ-O-ribose methyl-transferase of rRNA [115]. Moreover, p53 inactivation was associated with alteration of 2ⁱ-O-ribose methylation levels at some particular rRNA regions and increased in IRES-dependent translation of oncogenic-coding mRNAs, such as *IGF-1R*, *FGF-2* and *VEGF-A* [115]. Recent analysis performed using RiboMETH-seq approach, a RNA-seq-based technic to quantify 2ⁱ-O-ribose methylation levels at the 106 rRNA known sites in a single run, confirm this finding [119–121]. Sharma and colleagues indeed reported that levels of rRNA 2ⁱ-O-ribose methylation were altered at some given sites in p53-null HCT-116 cells compared to wild-type p53 ones [122]. Since then, the clear demonstration that ribosomes with distinct 2ⁱ-O-ribose methylation profiles directly affect both viral and cellular IRES-dependent translation has been made using purified ribosomes and in vitro translation assays [116]. In addition to the 2ⁱ-O-ribose methylation of rRNA, alteration of rRNA pseudo-uridylation catalyzed by the p53-target gene *DKCI* also modulates IRES-dependent translation of some specific mRNAs such as XIAP or Bcl-XL [123]. Recently, it has been reported that mutant p53R172H, the murine counterpart of the human p53R175H, drastically increase snoRNA expression through direct binding with the co-factor of transcription Ets2 to promote metastasis in osteosarcoma in mice models [124]. Interestingly, most of the up-regulated snoRNA correspond to SNORD and SNORA, the two classes of snoRNAs required respectively for 2ⁱ-O-ribose methylation and pseudo-uridylation of rRNA. However, the role of ribosome-modulated translation has not been investigated in this study. Altogether, these data suggest that, in addition to regulate transcription of classical translational factors, p53 also contributes in shaping the ribosome composition to modulate translation of some mRNA subsets. Interestingly, it has been shown that p53 regulates expression levels of ribosomal proteins, either through transcriptional and translational

control [22,125–127]. However, although the impact of p53-induced change in ribosomal protein expression on ribosome composition has not been deeply investigated, we can expect to discover in the near future that p53 may also affect ribosome composition at ribosomal protein levels to regulate translation.

6. Concluding Remarks

The diverse but non-exhaustive examples presented in this review give several clues contributing to demonstrate that p53 participates in translational regulation of some specific mRNAs either through direct or indirect mechanisms, including through the emerging mechanism that involves ribosome. This additional layer of regulation driven by p53 could provide novel perspectives to understand how a single protein is able to integrate the myriad of internal and external stimuli to finely regulate cell-fate by selecting the most appropriate genes in its target genes repertoire. A simple view is that in addition to induce the most adapted transcriptome to a precise biological context, p53 could in parallel shape the most efficient translational machinery and the requested *trans*-acting factors in order to refine the transcriptome at the translational levels. Thus, subtle p53-induced modifications in the expression and/or activity of translation-related factors could be sufficient to finely adapt cell-fate without drastic change in transcription thus expanding the diversity of p53-induced proteomes. Recent findings suggest that this novel view of p53-induced modulation of gene expression could also provide a mechanistic insight of the oncogenic activities of some mutant p53. The revelation coming from genome-wide approaches showing that p53 activation resulted in 75% of change in transcription but also in 25% of change in translation opens up novel opportunity to understand the molecular mechanisms given such diversity to p53 response.

Author Contributions: V.M. supervised redaction, wrote the first draft of the review and contributed to figures/tables; F.N.V.L. wrote the first draft related to the “Translation and cancer” part and contributed to the figures/table; J.-J.D. gave critical advices to reach the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Inserm, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (n° PJA 20161204686, MARACAS), Ligue Nationale Contre le Cancer Comités Drôme, Loire et Isère (PME 2016 and PPE 2018), PAIR Sein (n°ARC_INCa_LNCC_7625) and ITMO Cancer 2017 (“non-coding RNA in oncology”). F.N.V.L. was a recipient of doctoral fellowship from the French National Ligue Contre le Cancer. V.M. and J.-J.D. are members of Inserm.

Acknowledgments: We apologize to those works that have not been cited in this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lane, D.P.; Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **1979**, *278*, 261–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Linzer, D.I.H.; Levine, A.J. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **1979**, *17*, 43–52. [[CrossRef](#)]
3. Levine, A.J.; Oren, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 749–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Marcel, V.; Hainaut, P. p53 isoforms—A conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 391–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lane, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **1992**, *358*, 15–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lane, D.P.; Benichimol, S. p53: Oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Baker, S.J.; Fearon, E.R.; Nigro, J.M.; Preisinger, A.C. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **1989**, *244*, 217–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bouaoun, L.; Sonkin, D.; Ardin, M.; Hollstein, M.; Byrnes, G.; Zavadil, J.; Olivier, M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 865–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Donehower, L.A.; Harvey, M.; Slagle, B.L.; McArthur, M.J.; Montgomery, C.A.; Butel, J.S.; Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **1992**, *356*, 215–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Malkin, D.; Li, F.; Strong, L.; Fraumeni, J.; Nelson, C.; Kim, D.; Kassel, J.; Gryka, M.; Bischoff, F.; Tainsky, M.; et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **1990**, *250*, 1233–1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Srivastava, S.; Zou, Z.; Pirolo, K.; Blattner, W.; Chang, E.H. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li–Fraumeni syndrome. *Nature* **1990**, *348*, 747–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brady, C.A.; Jiang, D.; Mello, S.S.; Johnson, T.M.; Jarvis, L.A.; Kozak, M.M.; Broz, D.K.; Basak, S.; Park, E.J.; McLaughlin, M.E.; et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* **2011**, *145*, 571–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Valente, L.J.; Gray, D.H.D.; Michalak, E.M.; Pinon-Hofbauer, J.; Egle, A.; Scott, C.L.; Janic, A.; Strasser, A. p53 Efficiently Suppresses Tumor Development in the Complete Absence of Its Cell-Cycle Inhibitory and Proapoptotic Effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1339–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Li, T.; Kon, N.; Jiang, L.; Tan, M.; Ludwig, T.; Zhao, Y.; Baer, R.; Gu, W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* **2013**, *149*, 1269–1283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kaiser, A.M.; Attardi, L.D. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ.* **2017**, *25*, 93–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Aylon, Y.; Oren, M. The Paradox of p53: What, How, and Why? *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a026328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Terrier, O.; Diederichs, A.; Dubois, J.; Cartet, G.; Lina, B.; Bourdon, J.C.; Rosa-Calatrava, M. Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 2965–2971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Marcel, V.; Fernandes, K.; Terrier, O.; Lane, D.P.; Bourdon, J.C. Modulation of p53 β and p53 γ expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1377–1387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Liang, S.; Bellato, H.M.; Lorent, J.; Lupinacci, F.C.S.; Oertlin, C.; van Hoef, V.; Andrade, V.P.; Roffé, M.; Masvidal, L.; Hajj, G.N.M.; et al. Polysome-profiling in small tissue samples. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Andrysiak, Z.; Galbraith, M.D.; Guarnieri, A.L.; Zaccara, S.; Sullivan, K.D.; Pandey, A.; MacBeth, M.; Inga, A.; Espinosa, J.M. Identification of a core TP53 transcriptional program with highly distributed tumor suppressive activity. *Genome Res.* **2017**, *27*, 1645–1657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zaccara, S.; Tebaldi, T.; Pederiva, C.; Ciribilli, Y.; Bisio, A.; Inga, A. p53-directed translational control can shape and expand the universe of p53 target genes. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1522–1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Loayza-Puch, F.; Drost, J.; Rooijers, K.; Lopes, R.; Elkon, R.; Agami, R. p53 Induces Transcriptional and Translational programs to Suppress Cell Proliferation and Growth. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ji, B.; Harris, B.R.E.; Liu, Y.; Deng, Y.; Gradilone, S.A.; Cleary, M.P.; Liu, J.; Yang, D.Q. Targeting IRES-mediated p53 synthesis for cancer diagnosis and therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Russo, A.; Russo, G. Ribosomal proteins control or bypass p53 during nucleolar stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Golomb, L.; Volarevic, S.; Oren, M. p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 2571–2579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Swiatkowska, A.; Zydowicz, P.; Sroka, J.; Ciesiolka, J. The role of the 5' terminal region of p53 mRNA in the p53 gene expression. *Acta Biochim. Pol.* **2016**, *63*, 645–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Marcel, V.; Dichtel-Danjoy, M.L.; Sagne, C.; Hafsi, H.; Ma, D.; Ortiz-Cuaran, S.; Olivier, M.; Hall, J.; Mollereau, B.; Hainaut, P.; et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: Lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1815–1824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zhang, M.; Heldin, A.; Palomar-Siles, M.; Öhlin, S.; Bykov, V.J.N.; Wiman, K.G. Synergistic Rescue of Nonsense Mutant Tumor Suppressor p53 by Combination Treatment with Aminoglycosides and Mdm2 Inhibitors. *Front. Oncol.* **2018**, *7*, 323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Baradaran-Heravi, A.; Niesser, J.; Balgi, A.D.; Choi, K.; Zimmerman, C.; South, A.P.; Anderson, H.J.; Strynadka, N.C.; Bally, M.B.; Roberge, M. Gentamicin B1 is a minor gentamicin component with major nonsense mutation suppression activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 3479–3484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bidou, L.; Bugaud, O.; Belakhov, V.; Baasov, T.; Namy, O. Characterization of new-generation aminoglycoside promoting premature termination codon readthrough in cancer cells. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 378–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Marcel, V.; Catez, F.; Diaz, J.J. p53, a translational regulator: Contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene* **2015**, *34*, 5513–5523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. 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.* **2010**, *11*, 113–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A.G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **2009**, *136*, 731–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Roux, P.; Topisirovic, I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a012252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pause, A.; Belsham, G.J.; Gingras, A.-C.; Donzé, O.; Lin, T.-A.; Lawrence, J.C.; Sonenberg, N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5^l-cap function. *Nature* **1994**, *371*, 762–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Marcotrigiano, J.; Gingras, A.C.; Sonenberg, N.; Burley, S.K. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell* **1999**, *3*, 707–716. [[CrossRef](#)]
37. Ruggero, D. Revisiting the nucleolus: From marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, 5–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Thomas, G. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, E71–E72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Van Riggelen, J.; Yetil, A.; Felsher, D.W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 301–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ruggero, D. Translational Control in Cancer Etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Silvera, D.; Formenti, S.C.; Schneider, R.J. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 254–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bhat, M.; Robichaud, N.; Hulea, L.; Sonenberg, N.; Pelletier, J.; Topisirovic, I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 261–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Montanaro, L.; Tréré, D.; Derenzini, M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 301–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Barna, M.; Pusic, A.; Zollo, O.; Costa, M.; Kondrashov, N.; Rego, E.; Rao, P.H.; Ruggero, D. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* **2008**, *456*, 971–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bruno, P.M.; Liu, Y.; Park, G.Y.; Murai, J.; Koch, C.E.; Eisen, T.J.; Pritchard, J.R.; Pommier, Y.; Lippard, S.J.; Hemann, M.T. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 461–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bywater, M.J.; Poortinga, G.; Sanij, E.; Hein, N.; Peck, A.; Cullinane, C.; Wall, M.; Cluse, L.; Drygin, D.; Anderes, K.; et al. Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 51–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Peltonen, K.; Colis, L.; Liu, H.; Trivedi, R.; Moubarek, M.S.; Moore, H.M.; Bai, B.; Rudek, M.A.; Bieberich, C.J.; Laiho, M. A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 77–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kasteri, J.; Das, D.; Zhong, X.; Persaud, L.; Francis, A.; Muharam, H.; Sauane, M. Translation Control by p53. *Cancers* **2018**, *10*, 1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhu, N.; Gu, L.; Findley, H.W.; Zhou, M. Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *335*, 1272–1279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Horton, L.E.; Bushell, M.; Barth-Baus, D.; Tilleray, V.J.; Clemens, M.J.; Hensold, J.O. p53 activation results in rapid dephosphorylation of the eIF4E-binding protein 4E-BP1, inhibition of ribosomal protein S6 kinase and inhibition of translation initiation. *Oncogene* **2002**, *21*, 5325–5334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Constantinou, C.; Clemens, M.J. Regulation of translation factors eIF4GI and 4E-BP1 during recovery of protein synthesis from inhibition by p53. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 576–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Petersson, J.; Ageberg, M.; Sandén, C.; Olofsson, T.; Gullberg, U.; Drott, K. The p53 target gene TRIM22 directly or indirectly interacts with the translation initiation factor eIF4E and inhibits the binding of eIF4E to eIF4G. *Biol. Cell* **2012**, *104*, 462–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Truitt, M.L.; Ruggero, D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 288–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hinnebusch, A.G.; Ivanov, I.P.; Sonenberg, N. Translational control by 5′-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* **2016**, *352*, 1413–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kozak, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 887–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mehta, A.; Trotta, C.R.; Peltz, S.W. Derepression of the Her-2 uORF is mediated by a novel post-transcriptional control mechanism in cancer cells. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 939–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Meijer, H.A.; Kong, Y.W.; Lu, W.T.; Wilczynska, A.; Spriggs, R.V.; Robinson, S.W.; Godfrey, J.D.; Willis, A.E.; Bushell, M. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* **2013**, *340*, 82–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Iwakawa, H.O.; Tomari, Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 651–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Oliveto, S.; Mancino, M.; Manfrini, N.; Biffo, S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J. Biol. Chem.* **2017**, *8*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Glisovic, T.; Bachorik, J.L.; Yong, J.; Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1977–1986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Graber, T.E.; Holcik, M. Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 825–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Weingarten-Gabbay, S.; Elias-Kirma, S.; Nir, R.; Gritsenko, A.A.; Stern-Ginossar, N.; Yakhini, Z.; Weinberger, A.; Segal, E. Comparative genetics: Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **2016**, *351*, aad4939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. King, H.A.; Cobbold, L.C.; Willis, A.E. The role of IRES *trans*-acting factors in regulating translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 1581–1586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Xue, S.; Barna, M. Cis-regulatory RNA elements that regulate specialized ribosome activity. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 1083–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Xue, S.; Barna, M. Specialized ribosomes: A new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 355–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Shi, Z.; Fujii, K.; Kovary, K.M.; Genuth, N.R.; Röst, H.L.; Teruel, M.N.; Barna, M. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 71–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Chan, C.T.Y.; Pang, Y.L.J.; Deng, W.; Babu, I.R.; Dyavaiah, M.; Begley, T.J.; Dedon, P.C. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Goodarzi, H.; Nguyen, H.C.B.; Zhang, S.; Dill, B.D.; Molina, H.; Tavazoie, S.F. Modulated expression of specific tRNAs drives gene expression and cancer progression. *Cell* **2016**, *165*, 1416–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. King, H.A.; Gerber, A.P. Translatome profiling: Methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief. Funct. Genom.* **2016**, *15*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Leibold, E.A.; Munro, H.N. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5′ untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 2171–2175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Johannes, G.; Carter, M.S.; Eisen, M.B.; Brown, P.O.; Sarnow, P. Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13118–13123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ingolia, N.T.; Ghaemmaghami, S.; Newman, J.R.S.; Weissman, J.S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **2009**, *324*, 218–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Vassilev, L.T.; Vu, B.T.; Craves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; et al. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* **2004**, *303*, 844–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Liu, B.; Qian, S.B. Translational reprogramming in cellular stress response. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2014**, *5*, 301–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Riley, K.J.-L.; Maher, L.J. p53 RNA interactions: New clues in an old mystery. *RNA* **2007**, *13*, 1825–1833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Samad, A.; Carroll, R.B. The tumor suppressor p53 is bound to RNA by a stable covalent linkage. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 1598–1606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Fontoura, B.M.; Sorokina, E.A.; David, E.; Carroll, R.B. p53 is covalently linked to 5.8S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 5145–5151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Foord, O.S.; Bhattacharya, P.; Reich, Z.; Rotter, V. A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5191–5198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Oberosler, P.; Hloch, P.; Ramsperger, U.; Stahl, H. P53-Catalyzed Annealing of Complementary Single-Stranded Nucleic Acids. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2389–2396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Kovachev, P.S.; Banerjee, D.; Rangel, L.P.; Eriksson, J.; Pedrote, M.M.; Martins-Dinis, M.M.D.C.; Edwards, K.; Cordeiro, Y.; Silva, J.L.; Sanyal, S. Distinct modulatory role of RNA in the aggregation of the tumor suppressor protein p53 core domain. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 9345–9357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Riley, K.J.; Cassidy, L.A.; Kumar, A.; Iii, L.J.M. Recognition of RNA by the p53 tumor suppressor protein in the yeast three-hybrid system Recognition of RNA by the p53 tumor suppressor protein in the yeast three-hybrid system. *RNA* **2006**, *12*, 620–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Nedbal, W.; Frey, M.; Willemann, B.; Zentgraf, H.; Sczakiel, G. Mechanistic Insights into p53-promoted RNA-RNA Annealing. *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 677–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wu, L.; Bayle, J.H.; Elenbaas, B.; Pavletich, N.P.; Levine, A.J. Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 497–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Derech-Haim, S.; Teiblum, G.; Kadosh, R.; Rahav, G.; Bonda, E.; Sredni, B.; Bakhanashvili, M. Ribonuclease activity of p53 in cytoplasm in response to various stress signals. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 1400–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Mosner, J.; Mummensbrauer, T.; Bauer, C.; Sczakiel, G.; Grosse, F.; Deppert, W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* **1995**, *14*, 4442–4449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ray, P.S.; Grover, R.; Das, S. Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 404–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Yang, D.Q.; Halaby, M.J.; Zhang, Y. The identification of an internal ribosomal entry site in the 5′-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* **2006**, *25*, 4613–4619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Galy, B.; Créancier, L.; Prado-Lourenço, L.; Prats, A.C.; Prats, H. p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA. *Oncogene* **2001**, *20*, 4613–4620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Galy, B.; Créancier, L.; Zanibellato, C.; Prats, A.C.; Prats, H. Tumour suppressor p53 inhibits human fibroblast growth factor 2 expression by a post-transcriptional mechanism. *Oncogene* **2001**, *20*, 1669–1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Vagner, S.; Gensac, M.C.; Maret, A.; Bayard, F.; Amalric, F.; Prats, H.; Prats, A.C. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 35–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Ewen, M.E.; Oliver, C.J.; Sluss, H.K.; Miller, S.J.; Peeper, D.S. p53-dependant repression of cdk4 translation in TGF-β-induced G1 cell cycle arrest. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 204–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Miller, S.J.; Suthiphongchai, T.; Zambetti, G.P.; Ewen, M.E. p53 binds selectively to the 5′ untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor beta- and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8420–8431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Tournillon, A.S.; López, I.; Malbert-Colas, L.; Findakly, S.; Naski, N.; Olivares-Illana, V.; Karakostis, K.; Vojtesek, B.; Nylander, K.; Fåhræus, R. P53 binds the mdmx mRNA and controls its translation. *Oncogene* **2017**, *36*, 723–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Leppek, K.; Das, R.; Barna, M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 158–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Spriggs, K.A.; Stoneley, M.; Bushell, M.; Willis, A.E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol. Cell* **2008**, *100*, 27–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Obad, S.; Brunnström, H.; Vallon-Christersson, J.; Borg, Å.; Drott, K.; Gullberg, U. Staf50 is a novel p53 target gene conferring reduced clonogenic growth of leukemic U-937 cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 4050–4059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Budde, A.; Grummt, I. P53 Represses Ribosomal Gene Transcription. *Oncogene* **1999**, *18*, 1119–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Zhai, W.; Comai, L. Repression of RNA Polymerase I Transcription by the Tumor Suppressor p53. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 5930–5938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Cairns, C.A.; White, R.J. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J.* **1998**, *17*, 3112–3123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Chesnokov, I.; Chu, W.M.; Botchan, M.R.; Schmid, C.W. p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 7084–7088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Stein, T.; Crighton, D.; Warnock, L.J.; Milner, J.; White, R.J. Several regions of p53 are involved in repression of RNA polymerase III transcription. *Oncogene* **2002**, *21*, 5540–5547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Justilien, V.; Ali, S.A.; Jamieson, L.; Yin, N.; Cox, A.D.; Der, C.J.; Murray, N.R.; Fields, A.P. Ect2-Dependent rRNA Synthesis Is Required for KRAS-TRP53-Driven Lung Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 256–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Hermeking, H. MicroRNAs in the p53 network: Micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 613–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Goeman, F.; Strano, S.; Blandino, G. *MicroRNAs as Key Effectors in the p53 Network*, 1st ed.; Elsevier Inc.: New York, NY, USA, 2017; Volume 333, ISBN 1937-6448.
105. Bommer, G.T.; Gerin, I.; Feng, Y.; Kaczorowski, A.J.; Kuick, R.; Love, R.E.; Zhai, Y.; Giordano, T.J.; Qin, Z.S.; Moore, B.B.; et al. p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 1298–1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. He, L.; He, X.; Lim, L.P.; De Stanchina, E.; Xuan, Z.; Liang, Y.; Xue, W.; Zender, L.; Magnus, J.; Ridzon, D.; et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **2007**, *447*, 1130–1134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Raver-Shapira, N.; Marciano, E.; Meiri, E.; Spector, Y.; Rosenfeld, N.; Moskovits, N.; Bentwich, Z.; Oren, M. Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 731–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Yoon, J.H.; Abdelmohsen, K.; Srikantan, S.; Yang, X.; Martindale, J.L.; De, S.; Huarte, M.; Zhan, M.; Becker, K.G.; Gorospe, M. LincRNA-p21 Suppresses Target mRNA Translation. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 648–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Chaudhary, R.; Lal, A. Long noncoding RNAs in the p53 network. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2017**, *8*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Nikulenkov, F.; Spinnler, C.; Li, H.; Tonelli, C.; Shi, Y.; Turunen, M.; Kivioja, T.; Ignatiev, I.; Kel, A.; Taipale, J.; et al. Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 1992–2002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Menendez, D.; Nguyen, T.A.; Freudenberg, J.M.; Mathew, V.J.; Anderson, C.W.; Jothi, R.; Resnick, M.A. Diverse stresses dramatically alter genome-wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 7286–7301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Harvey, R.F.; Smith, T.S.; Mulrone, T.; Queiroz, R.M.L.; Pizzinga, M.; Dezi, V.; Villeneuve, E.; Ramakrishna, M.; Lilley, K.S.; Willis, A.E. Trans-acting translational regulatory RNA binding proteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2018**, *9*, e1465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Cho, S.; Teng, I.; Zhang, M.; Yin, T.; Jung, Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is regulated by RBM38, a RNA-binding protein and a p53 family target, via mRNA translation. *Oncotarget* **2014**, *6*, 305–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Marcel, V.; Catez, F.; Diaz, J.-J. Ribosome heterogeneity in tumorigenesis: The rRNA point of view. *Mol. Cell. Oncol.* **2015**, *2*, e983755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

115. Marcel, V.; Ghayad, S.E.; Belin, S.; Therizols, G.; Morel, A.P.; Solano-González, E.; Vendrell, J.A.; Hacot, S.; Mertani, H.C.; Albaret, M.A.; et al. P53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 318–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Erales, J.; Marchand, V.; Panthu, B.; Gillot, S.; Belin, S.; Ghayad, S.E.; Garcia, M.; Laforêts, F.; Marcel, V.; Baudin-Baillieu, A.; et al. Evidence for rRNA 2ⁱ-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12934–12939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Krastev, D.B.; Slabicki, M.; Paszkowski-Rogacz, M.; Hubner, N.C.; Junqueira, M.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Neugebauer, K.M.; Buchholz, F. A systematic RNAi synthetic interaction screen reveals a link between p53 and snoRNP assembly. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 809–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Simeonova, I.; Jaber, S.; Draskovic, I.; Bardot, B.; Fang, M.; Bouarich-Bourimi, R.; Lejour, V.; Charbonnier, L.; Soudais, C.; Bourdon, J.C.; et al. Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 2046–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Birkedal, U.; Christensen-Dalsgaard, M.; Krogh, N.; Sabarinathan, R.; Gorodkin, J.; Nielsen, H. Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 451–455. [[CrossRef](#)]
120. Krogh, N.; Jansson, M.D.; Häfner, S.J.; Tehler, D.; Birkedal, U.; Christensen-Dalsgaard, M.; Lund, A.H.; Nielsen, H. Profiling of 2ⁱ-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7884–7895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Marchand, V.; Blanloeil-Oillo, F.; Helm, M.; Motorin, Y. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2ⁱ-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Sharma, S.; Marchand, V.; Motorin, Y.; Lafontaine, D.L.J. Identification of sites of 2ⁱ-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Yoon, A.; Peng, G.; Brandenburg, Y.; Zollo, O.; Xu, W.; Rego, E.; Ruggero, D. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* **2006**, *312*, 902–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Pourebrahim, R.; Zhang, Y.; Liu, B.; Gao, R.; Xiong, S.; Lin, P.P.; McArthur, M.J.; Ostrowski, M.C.; Lozano, G. Integrative genome analysis of somatic p53 mutant osteosarcomas identifies Ets2-dependent regulation of small nucleolar RNAs by mutant p53 protein. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 1847–1857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Loging, W.T.; Reisman, D. Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **1999**, *8*, 1011–1016.
126. He, H.; Sun, Y. Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis. *Oncogene* **2007**, *26*, 2707–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Li, J.; Tan, J.; Zhuang, L.; Banerjee, B.; Yang, X.; Chau, J.F.; Lee, P.L.; Hande, M.P.; Li, B.; Yu, Q. Ribosomal protein S27-like, a p53-inducible modulator of cell fate in response to genotoxic stress. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11317–11326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



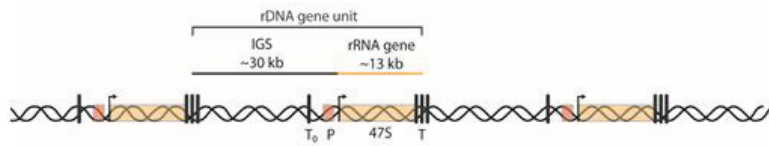
Chapitre 2 : Les Ribosomes

Les ribosomes sont les machineries cellulaires permettant la traduction des ARNm en protéines. Les ribosomes ont longtemps été considérés comme de simples effecteurs de la traduction. Or il émerge de plus en plus clairement que les ribosomes peuvent participer à la régulation de la traduction. En effet, l'efficacité de traduction dans les cellules est liée à la quantité de ribosomes. De plus, de nouvelles études ont montré que des altérations de composition des ribosomes pouvaient modifier la traduction spécifique de certains ARNm. Ces observations ont permis le développement du concept de « ribosomes spécialisés ». Ce concept suggère que des ribosomes avec des compositions particulières présentent une activité de traduction intrinsèque spécifique favorisant la traduction de certains ARNm par rapport à d'autres et permettant la mise en place de phénotypes particuliers. Les ribosomes spécialisés pourraient jouer un rôle important dans la tumorigenèse, ce qui ouvrirait de nouvelles opportunités thérapeutiques en oncologie. Dans ce chapitre, les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes permettant la production de ribosomes matures, l'importance de la structure du ribosome dans sa fonction de traduction, le rôle des ribosomes dans les cancers et son utilisation en clinique seront exposés.

I. La biogenèse des ribosomes

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques composés de 4 ARN ribosomiques (ARNr) et 80 protéines ribosomiques (RP, Ribosomal Proteins) chez l'homme. La biogenèse des ribosomes est un processus multi-étapes qui nécessite environ 300 facteurs protéiques et 200 snoARN (petits ARN nucléolaires) afin de produire des ribosomes matures (Fromont-Racine et al., 2003; Kressler et al., 2010; Thomson et al., 2013). La biogenèse des ribosomes a lieu dans les nucléoles qui sont des structures nucléaires dans lesquelles se produisent les principales étapes de la production des ribosomes: la synthèse et la maturation des ARNr et leur assemblage avec les protéines ribosomiques, et qui sont résumées dans la Figure 3 (Boisvert et al., 2007).

A



B

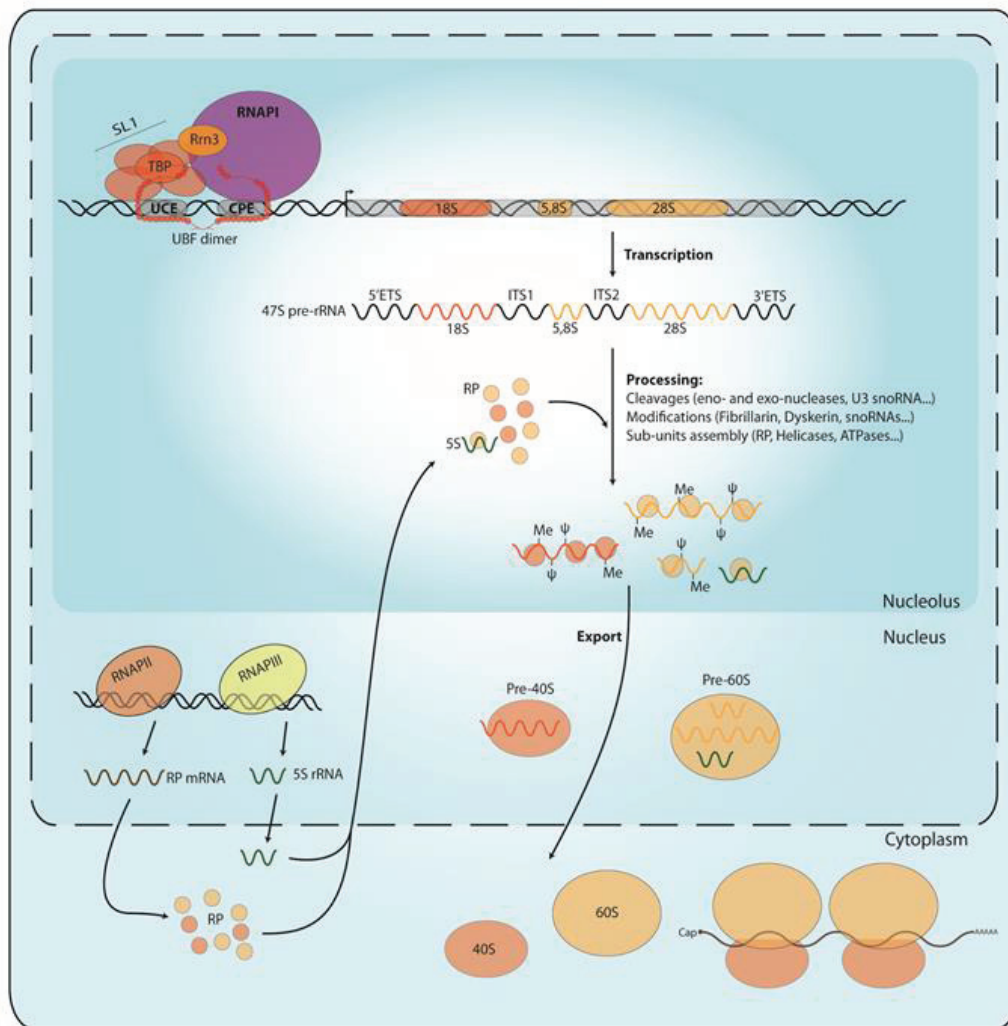


Figure 3. Vue d'ensemble de la biogenèse des ribosomes.

A. Représentation schématique de l'ADNr. L'ADNr est constitué de séquences répétées. Chaque unité contient une région codante contenant la séquence du pré-ARNr 47S (47S) avec en amont un promoteur (P). Ces unités sont séparées les unes des autres par une région intergénique (IGS). B. Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes. Dans le nucléole l'ADNr est transcrit par l'ARN Polymérase I (RNAPI) pour obtenir le pré-ARNr 47S. Celui-ci va subir des étapes de clivages et de modifications post-transcriptionnelles pour obtenir les ARNr 28S, 18S et 5.8S. En parallèle, les ARN Polymérase II et III (RNAPII et RNAPIII) transcrivent respectivement les gènes codant pour les protéines ribosomiques (RP) et le gène codant pour l'ARNr 5S. Les RP synthétisées dans le cytoplasme, sont importées dans les nucléoles pour s'assembler progressivement aux pré-ARNr et obtenir les futures sous-unités du ribosome, le pré-40S et le pré-60S. L'assemblage est finalisé dans le cytoplasme avec l'obtention de deux sous-unités matures : la petite (40S) et la grande sous-unité (60S). Ces deux sous-unités s'assemblent pour obtenir des ribosomes matures. Figure provenant de (Theizols et al., 2015).

1. La synthèse des ARNr

La synthèse des ARNr correspond à la transcription des ADN ribosomiques (ADNr). Cette transcription implique deux ARN polymérases (ARN Pol) : ARN Pol I et ARN Pol III. L'ARN Pol I permet la synthèse des ARNr 28S, 18S et 5.8S tandis que l'ARNr 5S est synthétisé par l'ARN Pol III.

a. Transcription des ADNr

Les ADNr sont organisés en séquences répétées avec environ 400 copies chez l'homme, chaque séquence répétée contient une région qui code pour l'ARNr précurseur 47S (pré-ARNr 47S) et une région intergénique (Figure 3A). Ce pré-ARNr 47S contient les séquences des ARNr 28S, 18S et 5.8S, ces ARNr sont séparés par des séquences espaceurs (ITS1 et ITS2, Internal Transcribed Spacer). La région contenant le pré-ARNr 47S est entourée par des séquences transcrites externes (5'ETS en amont 3'ETS en aval, External Transcribed Spacer). En amont de la région à l'origine de l'ARNr, la région promotrice de l'ADNr contient deux éléments : Upstream Control Element (UPC) et Core Promoter Element (CPE) (Raška et al., 2004) (Figure 3B).

L'initiation de la transcription débute par la fixation de deux facteurs à la région promotrice de l'ADNr : UBF (Upstream Binding Factor) et SL1 (Selectivity Factor 1) sur les éléments UPC et CPE. SL1 est un complexe composé de TBP (TATA Binding Protein) et de cinq facteurs protéiques TAF (TBP Associated Factors). Ce complexe interagit avec UBF et le promoteur de l'ADNr et permet la sélectivité de recrutement de l'ARN Pol I sur le promoteur de l'ADNr (Friedrich et al., 2005). L'ARN Pol I est recrutée au niveau de SL1 par le facteur Rrn3 qui interagit à la fois avec les sous-unités de SL-1 et l'ARN Pol I (Miller et al., 2001). La formation du complexe UBF-SL1-Rrn3-Pol I initie la phase d'élongation de la transcription. Lors de l'élongation, Rrn3 se dissocie du complexe, tandis que UBF et SL1 peuvent rester fixés au promoteur afin de permettre le recrutement d'une autre ARN Pol I. La phase de terminaison est induite lorsque l'ARN Pol I arrive au niveau du site de terminaison localisé en 3' du gène de l'ADNr. L'ARN Pol I se dissocie de l'ADNr par le biais des deux facteurs, TTF1 (Transcription Terminaison Factor) et PRTF (Pol I Transcript-Release Factor) (Russell and Zomerdijk, 2005).

L'ARNr 5S est synthétisé indépendamment, par l'ARN Pol III au niveau de la périphérie des nucléoles. Très brièvement, l'initiation de la transcription est induite par la fixation de quatre facteurs, TFIIIA (Transcription Factor for polymerase III A), TFIIIB, TFIIIC1 et TFIIIC2 sur

le promoteur. TFIIB permet le recrutement de l'ARN Pol III sur le promoteur afin de synthétiser l'ARNr 5S (Oettel et al., 1997).

b. Régulation de la transcription des ADNr

La transcription des ADNr est finement régulée pour permettre à la cellule de contrôler la quantité de ribosomes produits. Une régulation de la quantité de ribosomes disponibles dans la cellule est importante pour répondre aux demandes de la cellule afin de croître et de proliférer (Ruggero, 2012a; Thomas, 2000). Deux mécanismes principaux ont été décrits : le contrôle de l'activité de l'ARN Pol I et celui du nombre de copies actives des gènes ADNr par des régulations épigénétiques.

i. Régulations de l'activité de l'ARN Pol I

L'activité de l'ARN Pol I est contrôlée par les facteurs de la machinerie de la transcription comme UBF ou SL1. Une variation de l'expression des facteurs du complexe d'initiation de la transcription est corrélée au taux de transcription des ADNr. En effet, plusieurs études ont montré dans des modèles cellulaires qu'une sous-expression de *UBF* diminuait la synthèse des ARNr tandis qu'une surexpression favorisait le recrutement de l'ARN Pol I pour augmenter la transcription des ADNr (Huang et al., 2002; Russell and Zomerdiijk, 2006). De plus ces facteurs peuvent subir des modifications post-traductionnelles, qui permettent d'activer ou d'inactiver la transcription des ADNr, notamment durant le cycle cellulaire (Russell and Zomerdiijk, 2005). Par exemple, durant la mitose, la transcription des ADNr est inhibée par la phosphorylation d'une sous-unité de SL1 sur la Thréonine 852 par la CDK1/Cycline B ce qui va empêcher l'interaction de SL1 avec UBF (Heix et al., 1998). Au contraire, durant le passage de la phase G1 aux phases S et G2 où la transcription est maximale, la réactivation de la transcription de l'ARN Pol I est induite par la phosphorylation d'UBF sur les Sérines 484 par la CDK4/Cycline D1 et 488 par la CDK 2/Cycline E&A (Voit and Grummt, 2001; Voit et al., 1999).

Différentes voies de signalisation régulent la synthèse des ARNr. Par exemple la voie PI3K/AKT/mTOR augmente la transcription des ADNr par l'ARN Pol I en activant le facteur Rrn3 par phosphorylation et déphosphorylation des Sérines 44 et 199 respectivement (Mayer et al., 2004).

ii. Régulations épigénétiques

Etant donné le nombre important de gènes ADNr, il est admis que la régulation de la quantité des ribosomes produits tient au nombre de gènes transcrits. En effet, des régulations

épigénétiques permettent de contrôler la proportion de gènes qui sont actifs transcriptionnellement en régulant la condensation de la chromatine des régions de l'ADNr. Les gènes actifs sont caractérisés par une structure ouverte de la chromatine, une faible densité en nucléosomes, une hypométhylation de l'ADN, une acétylation de l'histone H4 sur la Lysine 16 et une déméthylation de l'histone H3 sur la Lysine 4 (Grummt and Längst, 2013). A l'inverse, les gènes inactifs sont caractérisés par une chromatine condensée, des nucléosomes régulièrement espacés, une hyperméthylation de l'ADN, une faible acétylation de l'histone H3 sur la Lysine 4 et une tri-méthylation de l'histone H3. Ces processus impliquent donc diverses protéines comme des histones méthyltransférases, des histones acétyltransférase, des facteurs de remodelages de la chromatine et des hélicases.

iii. Rôles de la protéine nucléoline dans la biogenèse des ribosomes

Nucléoline (NCL) est une protéine majoritaire dans les nucléoles, et est impliquée dans le remodelage de la chromatine. En effet, elle est importante pour la maintenance de l'état décondensée de la chromatine (euchromatine) permettant ainsi de favoriser l'accès du complexe d'initiation de la transcription des ADNr (Cong et al., 2012). NCL régulerait la transcription des ADNr en modulant la structure de la chromatine par interaction avec l'histone H1 ou par activation du remodelage des nucléosomes (Angelov et al., 2006; Erard et al., 1988; Rickards et al., 2007). Une autre protéine nucléolaire, B23 ou Nucléophosmine est également impliquée dans le remodelage de la chromatine. Cette protéine présente une activité de chaperon d'histones qui lui permet de s'associer à la chromatine au niveau des locus d'ADNr et de favoriser la transcription des ADNr (Murano et al., 2008).

NCL pourrait également réguler la transcription des ADNr en stabilisant les structures G-quadruplexes des ADNr permettant ainsi de bloquer la renaturation de l'ADN pour augmenter l'activité de transcription de l'ARN Pol I au niveau des ADNr (Drygin et al., 2009). En effet, les ADNr contiennent des séquences riches en GC et la transcription de ces ADNr est souvent accompagnée par la formation de structures G-quadruplexes pour augmenter l'activité de transcription de l'ARN Pol I. Plusieurs études ont montré l'importance de NCL dans la régulation de la transcription des ADNr (Rickards et al., 2007; Storck et al., 2009). De plus, NCL serait impliquée dans d'autres étapes de la biogenèse des ribosomes comme la maturation des ARNr ou l'assemblage du ribosome, montrant l'importance de NCL dans la production des ribosomes (Ginisty et al., 1998; Ugrinova et al., 2018).

2. Maturation des ARNr

Dès sa synthèse, le pré-ARNr 47S va subir une succession de clivages et de modifications post-traductionnelles afin d'obtenir les trois ARNr matures : 28S, 18S et 5.8S.

a. Clivages des pré-ARNr

Douze sites de coupures ont été recensés dans le pré-ARNr 47S (Mullineux and Lafontaine, 2012). Ces coupures sont effectuées par des endonucléases et des exonucléases. Le pré-ARNr 47S est d'abord clivé au niveau des extrémités par des exonucléases afin d'éliminer les régions 5'ETS et 3'ETS et d'obtenir le pré-ARNr 45S. A partir du pré-ARNr 45S, deux voies de succession de coupures ont été identifiées (Bowman et al., 1981; Hadjiolova et al., 1993). Ces deux voies ne génèrent pas les mêmes pré-ARNr intermédiaires mais aboutissent aux mêmes ARNr matures. En effet, si les sites de clivages semblent les mêmes, en revanche l'ordre des coupures est différent entre les deux voies (Henras et al., 2015; Mullineux and Lafontaine, 2012). L'ordre des coupures peut varier entre les espèces, les types cellulaires ou les pathologies (Henras et al., 2015).

Les endonucléases et exonucléases requièrent un grand nombre de facteurs comme les snoARNs (Small nucleolar ARN ou petit ARN nucléolaire). Les snoARNs sont des petits ARNs non codants qui, dans ce cas, guident les enzymes au niveau des sites de clivage. Certains snoARNs sont spécifiques de cette fonction de guide de sites de clivage comme les snoARNs U3, U8 et U17 (Mullineux and Lafontaine, 2012).

b. Modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Au cours de la maturation des ARNr et en parallèle des étapes de clivage, les pré-ARNr subissent plusieurs types de modifications post-transcriptionnelles qui permettent de stabiliser les structures secondaires et tertiaires des ARNr, importantes pour la structure du ribosome et donc ses activités catalytiques (Sloan et al., 2017). Les modifications post-transcriptionnelles des ARNr les plus connues et les plus étudiées sont les méthylations de bases, les méthylations en 2'-O des riboses (2'-O-Me) et les pseudouridylations (Ψ). Les méthylations de bases consistent en l'ajout d'un ou plusieurs groupes méthyles aux bases azotées qui constituent les ARN (uridine, adénosine, guanosine et cytidine). Les méthylations de bases sont les modifications chimiques les moins représentées parmi les modifications répertoriées (Sharma and Lafontaine, 2015). En effet, seulement 10 sites de méthylation de bases ont été identifiés chez l'homme. De plus quelques autres modifications de bases comme les acétylations ont

récemment été identifiées (Natchiar et al., 2017). Dans cette partie, je présenterai seulement les modifications les plus abondantes.

i. Les pseudouridylations des ARNr

Contrairement aux méthylations de bases, il existe un grand nombre de sites de pseudouridylation dans les ARNr, avec 95 sites de Ψ prédits et/ou démontrés chez l'homme (Penzo and Montanaro, 2018). La pseudouridylation consiste en l'isomérisation d'une uridine en pseudouridine. Cette réaction est catalysée par un complexe snoRNP (small nucleolar RiboNucleoProtein) à boîte H/ACA. Ce snoRNP est composé de quatre protéines : GAR1, NHP2, NOP10 et l'enzyme dyskérine (DKC1). DKC1 est la pseudouridine synthase qui catalyse la Ψ des ARNr. Le complexe comprend un snoARN à boîte H/ACA, signifiant que le snoARN présente une séquence spécifique appelée « hinge box » (ou boîte H) et une séquence de trois nucléotides ACA (boîte ACA) située au niveau 3' du snoARN (Penzo and Montanaro, 2018). Ces snoARN présentent des poches de pseudouridylation qui sont spécifiques à la séquence cible du pré-ARNr. Cette interaction par complémentarité de séquence permet de guider le complexe snoRNP H/ACA à l'uridine à modifier.

ii. Les 2'-O-Me des ARNr

Comme pour les Ψ , les 2'-O-Me des ARNr sont catalysées par un complexe snoRNP, mais cette fois à boîte C/D. Les 2'-O-Me consistent en l'ajout d'un groupe méthyle à l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle situé en 2' du ribose cible (Figure 4, boîte de gauche). Le complexe snoRNP à boîte C/D est composé de quatre protéines : NHP2L1 (ou 15.5K), NOP56, NOP58 et l'enzyme fibrillarine (FBL) (Figure 4). FBL est la méthyltransférase qui utilise le S-adenosyl méthionine (SAM) comme donneur de méthyle pour catalyser la réaction de 2'-O-Me (Monaco et al., 2018). Les snoARN à boîte C/D sont caractérisés par la présence de deux séquences spécifiques qui correspondent à la boîte C à l'extrémité 5' (RUGAUGA où R correspond à une Purine) et à la boîte D (CUGA) à l'extrémité 3'. Ces snoARN présentent une séquence complémentaire à l'ARNr au niveau du site à méthyler et servent de guide au complexe snoRNP.

La 2'-O-Me est la modification chimique des ARNr la plus abondante, aujourd'hui 106 sites de 2'-O-Me ont été identifiés (Krogh et al., 2016a). Ces 106 sites ont été validés par différentes techniques comme par la spectrométrie masse et la technique haut-débit basée sur du RNA-seq, le RiboMethSeq, et par l'identification de snoARN à boîte C/D spécifique à un site donné. Le RiboMethSeq est actuellement la seule technique qui permet de quantifier la fréquence de 2'-O-Me des 106 sites des ARNr humains et de levures (Birkedal et al., 2015; Krogh et al., 2016b).

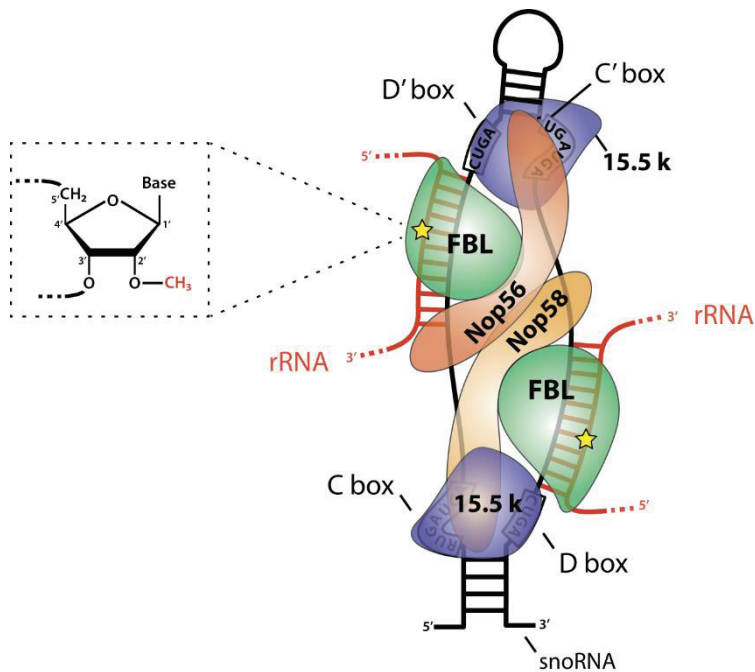


Figure 4. Organisation du snoRNP à boîte C/D chez les eucaryotes.

Le complexe snoRNP à boîte C/D est composé de quatre protéines (la méthyltransférase FBL, 15.5 K ou NHP2L1, NOP56 et NOP58) et d'un snoARN à boîte C/D qui sert de guide au complexe pour identifier les sites à méthyle via une complémentarité de séquence entre snoARN et ARNr. Les boîtes C et D du snoARN sont des séquences consensus placées aux extrémités 5' et 3' respectivement, ces boîtes sont souvent présentes en double et sont nommées les boîtes C et D'. Le site catalytique de FBL (étoile jaune) est placé face au 5ème nucléotide en amont des boîtes D et D', permettant la 2'-O-Me de manière site-spécifique. Les boîtes C et D ainsi que les boîtes C'et D' du snoARN forment une structure caractéristique appelée k-turn. Les protéines 15.5 K se fixent spécifiquement à ces structures k-turn tandis que NOP56 et NOP58 forment un hétérodimère et lient chacune une copie de FBL. La 2'-O-Me catalysée par FBL consiste à ajouter un groupe méthyle à l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle situé en 2' du ribose cible (boîte de gauche). Figure provenant de (Monaco et al., 2018)

iii. Autres activités de fibrillarine dans la biogenèse des ribosomes

L'activité principale de la protéine FBL est la méthylation des ARNr. En revanche d'autres rôles de FBL ont été décrits dans la biogenèse des ribosomes. En effet FBL est impliquée dans le clivage des ARNr et dans la régulation de la transcription des ADNr.

En effet, diverses études ont montré que chez la levure et les cellules murines qu'une inactivation de FBL (ou NOP1, homologue de FBL chez) la levure altérerait les différentes étapes de clivage des pré-ARNr (Koh et al., 2011; Tollervey et al., 1991, 1993).

Une étude de Tessarz et collègues a montré que FBL et NOP1 méthyle respectivement un résidu Glutamine de l'histone H2A, Q104 (H2AQ104) et Q105 (H2AQ105) chez l'homme et la levure (Tessarz et al., 2014). La méthylation H2AQ105 étant enrichie dans une région de l'ADNr transcrite par l'ARN Pol I, ils ont montré qu'une méthylation de l'histone H2A par FBL/NOP1 favorisait la transcription des ADNr par l'ARN Pol I via une inhibition de la fixation du

complexe chaperon d'histone FACT à l'histone H2A. Le mécanisme de régulation de la transcription des ADNr par FBL a été mieux caractérisé par une étude récente de Bierhoff et collègues (Iyer-Bierhoff et al., 2018). En effet, ils ont montré que la régulation de la transcription par l'ARN Pol I via la méthylation de H2AQ104 était dépendant de l'acétylation de FBL. L'acétylation de FBL diminue l'interaction entre de FBL et l'histone H2A, diminuant ainsi la méthylation de H2AQ104 sans affecter la 2'-O-Me et le clivage des pré-ARNr. En revanche, une désacétylation de FBL par SIRT7 augmente l'activité de transcription de l'ARN Pol I en augmentant la méthylation de H2AQ104.

FBL a donc plusieurs rôles dans la biogenèse des ribosomes et peut modifier la production des ribosomes (régulation quantitative par son activité dans la transcription des ADNr et dans le clivage des pré-ARNr) et la composition des ribosomes (régulation qualitative par son activité de méthyltransférase des ARNr).

3. Assemblage des ribosomes

L'assemblage des ribosomes s'effectue dans les différents compartiments de la cellule et fait appel à plus de 200 facteurs d'assemblage. Ces facteurs d'assemblage peuvent être des RBP (RNA Binding Proteins), des ATPase, GTPase ou des hélicases à ARN (Klinge and Woolford, 2019; Peña et al., 2017).

De manière très simplifiée, cet assemblage complexe inclut tout d'abord la transcription des gènes codant pour les protéines ribosomiques (RP) qui sont transcrites par l'ARN Pol II dans le noyau. Une partie des RP avec l'ARNr 5S sont importés dans les nucléoles pour commencer l'assemblage afin de former les particules pré-ribosomiques qui vont constituer la petite et grande sous-unités des ribosomes, le pré-40S et le pré-60S respectivement. La maturation et l'assemblage de ces deux particules se poursuivent dans le noyau pour être ensuite exportées dans le cytoplasme. La maturation et des contrôles qualités de la fonctionnalité des deux sous-unités 40S et 60S du ribosome ont lieu dans le cytoplasme pour finir par l'assemblage du ribosome mature, le 80S (Klinge and Woolford, 2019) (Figure 3).

II. Ribosomes et traduction

Les ribosomes traduisent les ARNm en protéines. Les études menées concernant l'activité catalytique des ribosomes ont permis de mettre en évidence une relation forte entre la structure et la fonction des ribosomes. Aujourd'hui, le concept émergent de « ribosomes spécialisés » permet de faire évoluer la vision des ribosomes, passant de simples effecteurs à un statut de

régulateurs de la traduction. Dans cette partie, le rôle des différents composants des ribosomes dans la traduction et le rôle d'une hétérogénéité des ribosomes sur la traduction seront présentés.

1. Structure des ribosomes et traduction

La détermination de la structure tri-dimensionnelle du ribosome avec un niveau de résolution élevé par des techniques de cristallographie aux rayons X et de cryo-électromicroscopie a permis de résoudre la structure du ribosome (Ban et al., 2000; Ben-Shem et al., 2010; Khatter et al., 2015; Yonath, 2009). La caractérisation de la structure du ribosome a permis de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'activité de traduction du ribosome. Notamment, la mise en évidence que les ARNr portaient l'activité catalytique du ribosome a été réalisée en 2000 par trois études indépendantes permettant de qualifier les ribosomes de ribozymes (Ban et al., 2000; Muth et al., 2000; Nissen et al., 2000). Les ribosomes sont composés de deux sous-unités, le 40S et le 60S, dont chacune porte un site fonctionnel du ribosome (Figure 5).

a. La petite sous-unité 40S du ribosome

La petite sous-unité du ribosome est composée de l'ARNr 18S et de 33 RP. La petite sous-unité du ribosome présente un site fonctionnel qui correspond au site de décodage (ou DC, Decoding Center) au niveau du site A. Le 40S présente trois sites de liaisons des ARNt : le site A où l'aa-ARNt vient se loger ; le site P où se loge le peptidyl-ARNt (l'ARNt avec la chaîne polypeptidique) ; et le site E où se place l'ARNt déchargé prêt à quitter le ribosome. Le site de décodage permet le contrôle de l'appariement entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. Il permet donc de contrôler le respect du code génétique. Le contrôle de l'appariement entre codon et anti-codon est en effet effectué par trois nucléotides spécifiques de l'ARNr 18S (Ogle et al., 2003). Ces trois nucléotides G530, A1492 et A1493 de l'ARNr discriminent de manière stricte les ARNt présentant des anti-codon dont les deux premières bases sont correctement appariées et ont donc un rôle direct dans la fidélité de décodage.

b. La grande sous-unité 60S du ribosome

La grande sous-unité du ribosome est composée de trois ARNr, le 28S, 5.8S et 5S et de 47 RP. Cette sous-unité contient le PTC (Peptidyl Transferase Center) ou centre de transfert de la liaison peptidique. Après l'appariement de l'anti-codon avec le codon, un changement structural du ribosome a lieu au niveau du DC permettant à l'ARNr 28S du 60S d'interagir avec les extrémités 3' des ARNt présents dans les sites A et P (Ramakrishnan, 2002). Ces interactions des ARNr avec les ARNt favorisent le bon positionnement des ARNt aux sites A et P. De plus,

elles permettent le transfert de la liaison peptidique entre l'ARNt du site A à l'ARNt du site P. Ce transfert de la liaison induit ensuite une translocation de l'ARNt déchargé du site P au site E, et de l'ARNt suivant du site A au site P.

Le 60S contient également le tunnel de sortie des peptides qui traverse le ribosome du PTC jusqu'à la surface. La chaîne polypeptidique naissante emprunte ce tunnel pour sortir du ribosome et des interactions avec des RP et l'ARNr 28S permet le repliement de la protéine en cours de synthèse.

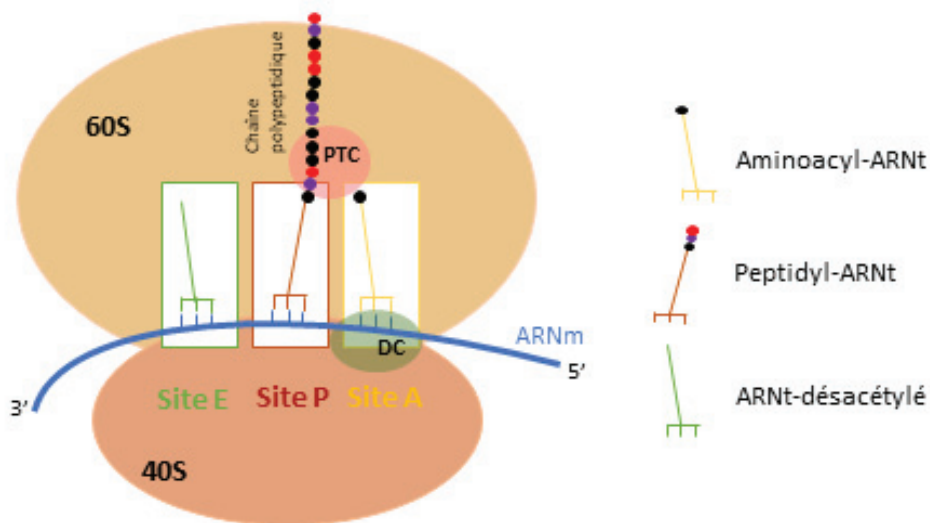


Figure 5. Les sites fonctionnels du ribosome.

La petite sous-unité du ribosome (40S) contient le site de décodage (ou DC, ovale vert) où a lieu le décodage de l'information génétique et la vérification de l'appariement entre le codon de l'ARNm et l'anti-codon de l'ARNt. Cette sous-unité contient trois sites de liaisons de l'ARNt : le site A où se fixe l' aminoacyl-ARNt ; le site P : l'ARNt portant la chaîne polypeptidique ; et le site E pour l'ARN désacétylé prêt à être expulsé du ribosome. La grande sous-unité (60S) contient le centre de transfert de la liaison peptidique (ou PTC, ovale rouge) qui permet de catalyser la liaison peptidique entre l'acide aminé apporté par l'aa-ARNt au site A et le dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique portée par le peptidyl-ARNt. Cette sous-unité contient le tunnel par lequel sort la chaîne polypeptidique en cours de synthèse.

2. Hétérogénéité des ribosomes et traduction

Les ribosomes ont longtemps été considérés comme une entité constante, un simple effecteur de la traduction. En revanche la mise en évidence d'une variation de composition des ribosomes entre différentes espèces, ou selon des conditions physiologiques différentes dans une même espèce, a suggéré que les ribosomes ne sont pas toujours composés de la même façon, mais sont plutôt hétérogènes. De plus, de récentes études ont montré qu'une variation de la composition des ribosomes au niveau des ARNr ou des RP altère la traduction de certains ARNm, faisant du ribosome un régulateur de la traduction. Ces observations ont permis de mettre en évidence

un nouveau concept nommé « ribosome spécialisé ». Ce concept propose qu'un ribosome avec une composition particulière va réguler lui-même la traduction de certains ARNm. Dans cette partie, les modifications de composition des ribosomes au niveau des RP et des ARNr et l'impact de ces modifications sur la traduction seront décrits (Figure 6).

a. Hétérogénéité au niveau des protéines ribosomiques et impact sur la régulation traductionnelle

L'identification de ribosomes différents a été mise en évidence pour la première fois par l'identification de ribosomes avec des compositions différentes au niveau des RP. La mise en évidence de ces altérations a permis l'émission du concept de « ribosome spécialisé » (Xue and Barna, 2012).

i. *Mise en évidence des altérations de composition des ribosomes au niveau des RP*

Trois mécanismes qui pourraient induire des altérations de composition des ribosomes au niveau des RP ont été identifiés : l'expression de gènes paralogues codant pour les RP ; la présence de mutations dans les gènes codant pour les RP ; et la présence de modifications post-traductionnelles dans les RP (Figure 6).

Chez les mammifères, la majorité des RP sont codées par une seule copie de gène (Xue and Barna, 2012). La protéine ribosomique de la petite sous-unité 4 (ou RPS4, Ribosomal Protein of the Small sub-unit 4) est une exception. En effet, RPS4 est codée par trois gènes *RPS4X*, *RPS4Y1* et *RPSY2* qui sont localisés respectivement sur les chromosome X et chromosome Y (Lopes et al., 2010). *RPS4X* et *RPS4Y1* sont exprimés de manière ubiquitaire chez l'homme. En revanche, le gène *RPSY2* est seulement exprimé dans la prostate et les testicules, suggérant l'existence de ribosomes avec une composition spécifique dans les testicules et la prostate chez l'homme. En revanche aucune étude biochimique n'a démontré cette différence de composition. Des mutations dans les gènes codant les RP ont été identifiées chez l'homme dans un contexte pathologique particulier défini comme ribosomopathies. Les ribosomopathies sont des maladies génétiques et donc héréditaires induites par des haplo-insuffisances de gènes qui codent pour des RP ou des facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes (Mills and Green, 2017). En 1999, des mutations de type délétions et translocations du gène codant pour RPS19 ont été identifiées pour la première fois dans des patients atteints de l'Anémie de Blackfan-Diamond (Draptchinskaia et al., 1999). Aujourd'hui des mutations de 20 RP différentes ont été identifiées dans cette ribosomopathie (Aspesi and Ellis, 2019). Ces mutations qui induisent une altération quantitative des RP dans les ribosomopathies suggèrent fortement l'existence de ribosomes

avec des compositions en RP différentes. En revanche la démonstration de cette différence de composition des ribosomes dans ces pathologies n'a pas encore été réalisée.

Des modifications post-traductionnelles des RP peuvent également induire une hétérogénéité de composition des ribosomes. D'après Emmott et collègues, la majorité des RP présentent des modifications post-traductionnelles comme des méthylation ou acétylation (Emmott et al., 2019). Par exemple, RPS6 est phosphorylée sur 5 sites en réponse à l'induction de voies de signalisation mitogéniques ou des facteurs de croissances (Krieg et al., 1988). Une variation des modifications post-traductionnelles des RP pourraient avoir un impact sur la production de ribosomes différents en RP.

ii. Effet des variations de composition des ribosomes au niveau des RP dans la régulation traductionnelle

Une étude en 2011 a démontré qu'une perte d'expression d'une RP régula la traduction de certains ARNm. Kondrashov et collègues ont utilisé un modèle murin présentant une délétion dans le gène codant *RPL38* (Kondrashov et al., 2011). Ils ont identifié que *RPL38* était exprimée de manière tissu-spécifique. Par exemple, ils ont observé une expression préférentielle de *RPL38* dans l'arche maxillaire, la rétine neurale de l'œil et les somites précurseurs des vertèbres. Les auteurs ont déterminé qu'une diminution d'expression de *RPL38* n'affectait pas la synthèse protéique globale mais réduisait spécifiquement la traduction de gènes appartenant à la famille des *homeobox* nécessaires pour la formation du plan d'organisation chez les mammifères (Kondrashov et al., 2011; Xue et al., 2015). Cette régulation traductionnelle des gènes *homeobox* était dépendante de l'expression de *RPL38*. Différentes études ont observé qu'une déplétion de différentes RP impactait la traduction spécifique de certains ARNm (Barna et al., 2008; Cmejlova et al., 2006; Horos et al., 2012; Si-Ying Lee et al., 2013; Xue et al., 2015). Deux études ont démontré qu'une déplétion de RP inhibait la traduction coiffe-dépendante pour favoriser la traduction des ARNm contenant des structures IRES (Barna et al., 2008; Xue et al., 2015). En revanche, ces études n'ont pas démontré clairement qu'une perte d'expression des RP induisait directement la production de ribosomes hétérogènes qui seraient responsables des défauts de traduction observés.

Plus récemment, une étude innovante de Shi et collègues a mis en évidence, la présence de ribosomes hétérogènes au niveau de leur composition en RP au sein d'un même type cellulaire (Shi et al., 2017). En utilisant une nouvelle technologie, le SRM (Selected Reaction Monitoring) qui permet une quantification absolue des RP par spectrométrie de masse, les auteurs ont montré que dans les mESC (murine Embryonic Stem Cells), les ribosomes isolés à partir des polysomes

(fraction des ARNm associées aux ribosomes, donc en cours de traduction), présentent 4 RP en quantité sous-stœchiométrique. Ces RP sont RPL10A, RPL38, RPS7 et RPS25. Ils ont ensuite déterminé l'effet de cette hétérogénéité de ribosomes sur la traduction. Pour cela ils ont créé des lignées cellulaires mESC qui produisent des ribosomes contenant des RP étiquetées (par exemple Flag-RPL10A) pour immunoprécipiter spécifiquement ces ribosomes étiquetés et effectuer une analyse de la traduction par une approche haut-débit, le Ribosome Profiling. En parallèle, dans la même lignée cellulaire, ils ont effectué un Ribosome Profiling sur les ribosomes totaux. Le Ribosome Profiling est une technique basée sur le séquençage des fragments d'ARNm qui sont protégés par les ribosomes, et donc en cours de traduction (Ingolia, 2016). Les auteurs ont comparé les groupes d'ARNm qui sont différentiellement associés aux ribosomes totaux et aux ribosomes contenant la protéine Flag-RPL10A (Shi et al., 2017). Ils ont déterminé que les ribosomes contenant RPL10A favorisaient la traduction d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans l'organisation de la matrice extra-cellulaire. Cette étude permet donc de soutenir pleinement le concept de « ribosomes spécialisés », car cette étude a démontré pour la première fois à partir de ribosomes purifiés, que des ribosomes avec une composition particulière en RP traduisent spécifiquement un certain groupe d'ARNm.

b. Hétérogénéité au niveau des ARNr et impact sur la régulation traductionnelle

Les ARNr ont un rôle majeur dans la traduction puisqu'ils portent l'activité catalytique du ribosome. Ces ARNr subissent des modifications post-transcriptionnelles importantes pour la stabilisation des structures des ARNr sur laquelle repose l'activité catalytique du ribosome. De manière intéressante, les sites de 2'O-Me et Ψ sont concentrés au niveau des sites fonctionnels du ribosome, suggérant leur importance dans l'activité de traduction du ribosome (Natchiar et al., 2017; Sharma and Lafontaine, 2015). Ainsi on peut se demander si une variation du taux des modifications chimiques de l'ARNr induit la production de ribosomes hétérogènes ? Ces modifications pourraient-elles altérer l'activité de traduction du ribosome ? Différentes études ont permis de commencer à répondre à ces questions.

i. Mise en évidence des altérations de composition des ribosomes impliquant des variations de modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Une potentielle variation du taux de Ψ des ARNr a été identifiée suite à une variation de l'expression de la pseudouridine synthase, *DKC1*. Une mutation inactivatrice de *DKC1* a été identifiée dans des patients atteints d'une ribosomopathie, l'X-DC (X-linked dyskeratosis

congenita) (Heiss et al., 1998). Par l'utilisation d'un modèle murin présentant une déplétion de *DKCI* et qui récapitule l'X-DC développé chez l'homme, Ruggero et collègues ont montré qu'une diminution de l'expression de *DKCI* est associée à une diminution globale du taux de Ψ des ARNr (Ruggero et al., 2003). D'autres études ont confirmé qu'une variation de l'expression de *DKCI* était associée à une variation globale du taux Ψ des ARNr dans des modèles cellulaires humains (Montanaro et al., 2006; Penzo et al., 2015).

Comme pour les Ψ , une variation du taux de 2'-O-Me des ARNr a été mise en évidence suite une variation de l'expression de la méthyltransférase, *FBL*. En revanche contrairement aux Ψ , le taux de variation 2'-O-Me suite à une différence d'expression de *FBL* n'était pas global, c'est-à-dire sur les 106 sites, mais touchait seulement quelques sites des ARNr (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013). En effet, dans un modèle cellulaire de tumorigenèse mammaire induit par l'inactivation de p53, la surexpression de *FBL* altérait le taux de 2'-O-Me sur quelques sites des ARNr (Marcel et al., 2013). Cette variation du taux de 2'-O-Me a été mis en évidence par une approche basée sur la RT-qPCR qui permet de déterminer un taux de méthylation relatif d'un panel de sites. Une autre étude a confirmé cette observation par l'utilisation de la technique de RiboMethSeq qui a permis suite à la réduction d'expression de *FBL*, de démontrer que la variation du taux de 2'-O-M survenait seulement sur certains sites (Erales et al., 2017). Ces deux études ont permis démontrer une certaine plasticité de la 2'-O-Me des ARNr.

ii. *Effet des variations de composition des ribosomes au niveau des ARNr sur la régulation traductionnelle*

Plusieurs études dans différents modèles ont mis en évidence qu'une variation de l'expression de *DKCI* et donc du taux de Ψ des ARNr était accompagnée d'une variation de la traduction de certains groupes d'ARNm (Bellodi et al., 2010; Montanaro et al., 2010; Ruggero et al., 2003; Yoon et al., 2006). Ces ARNm dont la traduction est altérée en réponse à une variation de Ψ , présentent une particularité. En effet ils contiennent tous une structure IRES. Ces ARNm codent pour les suppresseurs de tumeurs *tp53* et *P27* ou encore des facteurs anti-apoptotiques *Bcl-xL* et *XIAP* (Bellodi et al., 2010; Montanaro et al., 2010; Yoon et al., 2006). L'étude menée par Penzo et collègues a montré que les ribosomes purifiés à partir de cellules avec une déplétion de *DKCI* présentaient des altérations de la traduction dépendante des IRES de deux ARNm *tp53* et *VEGF*, par une technique de traduction *in vitro* (Penzo et al., 2015). Ces ribosomes présentaient une diminution globale du taux de Ψ des ARNr. Ainsi cette étude suggère que *DKCI*, via son activité de pseudouridine synthase, altère l'activité la Ψ des ARNr

et ainsi de l'activité de traduction des ribosomes pour favoriser la traduction spécifique de certains ARNm. La traduction *in vitro* est une technique indispensable dans les études liées au concept de « ribosome spécialisé » car elle permet de déterminer l'activité intrinsèque d'une population de ribosomes purifiés. En effet, cette technique consiste à introduire des ribosomes isolés à partir de cellules d'intérêts dans un lysat de réticulocytes de lapins qui présente tous les facteurs nécessaires à la traduction, sauf les ribosomes.

Deux études ont démontré qu'une variation de la 2'-O-Me des ARNr est associée à une modification de l'activité de traduction des ribosomes (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2015; Monaco et al., 2018). En effet, dans les cancers du sein, une altération de la 2'-O-Me des ARNr suite à la surexpression de *FBL* modifie l'activité de traduction du ribosome (Marcel et al., 2013). Ces ribosomes modifiés étaient associés à deux types d'altération de l'activité du ribosome : un défaut de la fidélité de traduction (la capacité des ribosomes à reconnaître des codons-stop), et l'augmentation de la traduction de certains ARNm contenant une structure IRES, comme *C-Myc* ou *IGF1R*. En revanche, cette étude n'a pas démontré que les ribosomes dont leur activité de traduction était altérée correspondaient aux ribosomes qui contenaient des ARNr dont la de 2'-O-Me était altérée. Cette démonstration a été réalisée récemment par l'étude d'Erales et collègues (Erales et al., 2017). En effet, les auteurs ont purifié les ribosomes qui présentaient des variations de la 2'-O-Me à partir de cellules où l'expression de *FBL* était diminuée par siARN, pour effectuer la technique de traduction *in vitro*. Ils ont ainsi démontré que la traduction dépendante des IRES de différents ARNm, comme *IGF1R*, était directement affectée par une variation de la 2'-O-Me des ARNr.

L'ensemble de ces données soutient l'existence de ribosomes de composition hétérogène. Cette hétérogénéité de composition des ribosomes peut intervenir aux niveaux des RP et des ARNr via une variation de modifications post-transcriptionnelles. Ces ribosomes hétérogènes présentent une activité de traduction différente, supportant le concept de « ribosomes spécialisés ».

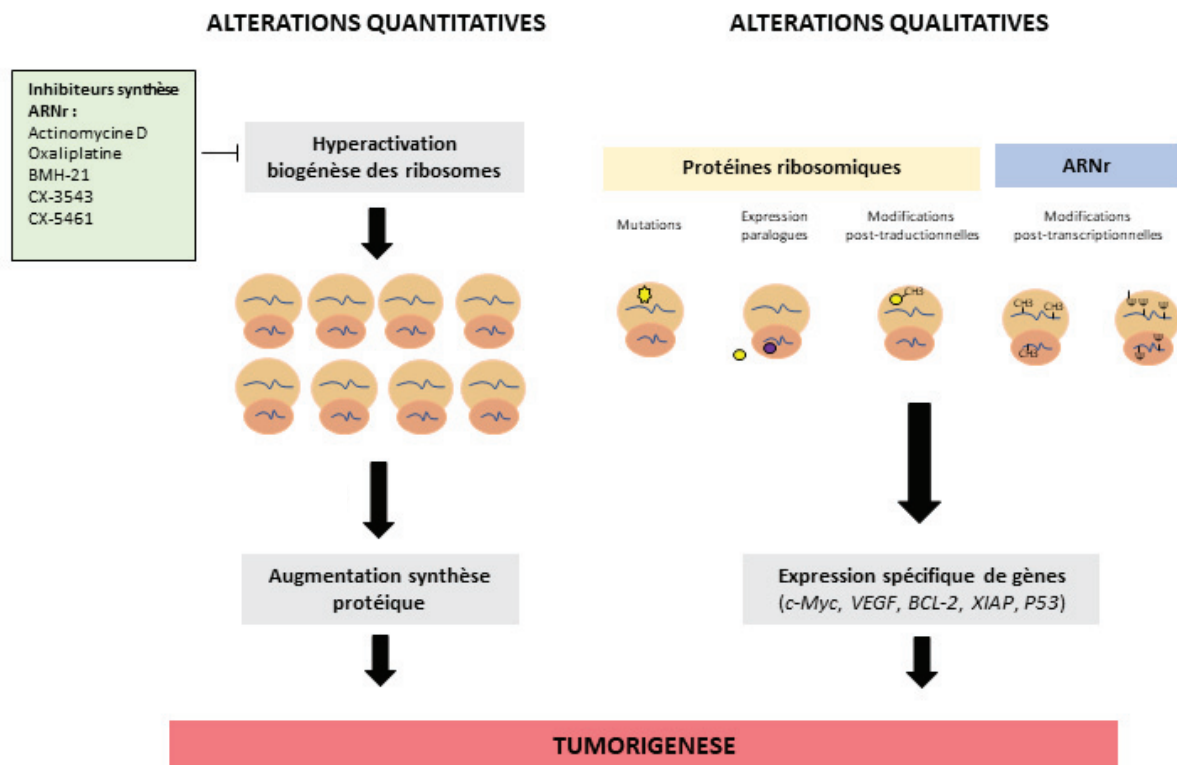


Figure 6. Altérations des ribosomes dans les cancers.

Dans les cancers, deux types d'altérations des ribosomes ont été observées : des altérations quantitatives et des altérations qualitatives. Les altérations quantitatives correspondent à une augmentation accrue de la quantité des ribosomes suite à une hyperactivation de la biogénèse des ribosomes et en particulier de la synthèse des ARNr. Cette augmentation du nombre des ribosomes, et donc de l'augmentation de la synthèse protéique globale, permet aux cellules cancéreuses de maintenir leur état hyperprolifératif. Cette voie peut être ciblée en utilisant des inhibiteurs de la synthèse des ARNr comme CX-5461 ou BMH-21 qui bloquent l'activité de l'ARN Pol I (rectangle vert). Les altérations qualitatives des ribosomes correspondent à une modification de la composition des ribosomes. Les ribosomes peuvent présenter une différence de composition au niveau des protéines ribosomiques (RP) par la présence de mutations des gènes codant pour des RP, l'expression de paralogues et la présence de modifications post-traductionnelles. Une variation du taux de méthylation en 2'-O des riboses (CH3) ou de pseudouridylation (Ψ) des ARNr induit la production de ribosomes avec des compositions différentes au niveau des ARNr. Une altération de la composition des ribosomes modifie son activité intrinsèque et favorise la traduction de certains ARNm impliqués dans la tumorigénèse.

III. Ribosomes et cancer

Deux types d'altérations des ribosomes ont été décrits dans les cancers : une altération de la quantité des ribosomes et une altération de la qualité des ribosomes. L'altération quantitative des ribosomes correspond à la variation du nombre de ribosomes induite par une dérégulation de la biogénèse des ribosomes. L'altération qualitative des ribosomes correspond à une

variation de la composition des ribosomes au niveau des RP ou des ARNr. Dans cette partie, deux points seront traités : le rôle de ces altérations des ribosomes dans la tumorigénèse et les nouvelles opportunités cliniques développées à partir du ciblage de la biogenèse des ribosomes.

1. Rôle des altérations des ribosomes dans les cancers

Une accumulation de données a permis de montrer que les ribosomes sont impliqués dans la tumorigénèse (Pelletier et al., 2017; Ruggero and Pandolfi, 2003; Sulima et al., 2017). En effet, il est aujourd'hui bien connu qu'une altération quantitative des ribosomes et donc une augmentation de la synthèse globale des protéines, est importante voire nécessaire pour soutenir l'hyperprolifération des cellules cancéreuses. De plus des études récentes suggèrent que des ribosomes dont la composition est altérée pourraient être impliqués dans la tumorigénèse en régulant la traduction de certains ARNm impliqués dans les phénotypes cancéreux (Figure 6).

a. Altérations quantitatives des ribosomes et cancer

L'hyperactivation de la synthèse des ribosomes est aujourd'hui bien établie dans les cancers. Depuis des années, l'augmentation de la taille et du nombre des nucléoles par noyau est utilisée pour identifier des cellules cancéreuses ou des tumeurs agressives (Derenzini et al., 2009; Montanaro et al., 2008; Ruggero, 2012a). Mais ce processus n'est pas approuvé en clinique. Cette augmentation de la taille et du nombre des nucléoles dans les cellules cancéreuses reflète directement une hyperactivation de la biogenèse des ribosomes et donc une augmentation de la synthèse protéique globale qui serait nécessaire pour la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses (Ruggero, 2012b). L'hyperactivation de la biogenèse des ribosomes et donc la synthèse des ARNr est hyperactivée dans les cancers via plusieurs voies de signalisation connues en cancérologie. Par exemple l'oncogène *c-Myc* augmente l'activité des ARN Pol I et III tandis que les gènes suppresseurs de tumeurs comme *p53* ou *pRB* (Retinoblastoma protein) diminuent l'activité de ces ARN Pol (Arabi et al., 2005; Cairns and White, 1998; Van Riggelen et al., 2010; White, 2005; Zhai and Comai, 2000). Ces observations ont permis d'établir très rapidement un lien entre altérations quantitatives des ribosomes et cancer. En revanche, aucune étude n'avait montré l'existence du lien direct entre hyperactivation de la biogenèse des ribosomes et tumorigénèse jusqu'à la publication princeps de Barna et collègues (Barna et al., 2008). Les auteurs ont utilisé un modèle murin développant des lymphomes spontanément par activation de l'oncogène *c-Myc*. Dans ce modèle, ils ont introduit une mutation du gène *RPL24* pour diminuer la biogenèse des ribosomes. Les auteurs ont démontré qu'une diminution de la biogenèse des ribosomes et donc la synthèse protéique par l'introduction d'une mutation de *RPL24*, suffisait à bloquer la croissance et la prolifération cellulaire, et plus globalement le

pouvoir oncogénique de *c-Myc*. Cette étude a démontré pour la première fois qu'une altération quantitative des ribosomes contribue à la tumorigenèse (Barna et al., 2008).

D'autres études ont permis de soutenir ces observations. Notamment, l'inhibition de la biogenèse des ribosomes par des inhibiteurs de l'ARN Pol I ou des agents chimiothérapeutiques à base de platine comme l'oxaliplatine, éliminait efficacement et spécifiquement les cellules cancéreuses (Bruno et al., 2017; Bywater et al., 2012; Drygin et al., 2009, 2011). L'ensemble de ces données suggèrent que les cellules cancéreuses sont dépendantes de l'hyperactivation de la biogenèse des ribosomes.

b. Altérations qualitatives des ribosomes et cancer

Diverses données suggèrent que des variations de la composition des ribosomes au niveau des RP ou par des modifications post-transcriptionnelles des ARNr génèrent des ribosomes de composition spécifique, y compris dans les cellules cancéreuses. L'hypothèse est que ces ribosomes vont favoriser la tumorigenèse en régulant la traduction d'ARNm particuliers.

i. Variation de composition des ribosomes au niveau des protéines ribosomiques et cancer

L'étude des ribosomopathies suggèrent que les RP seraient potentiellement impliquées dans la tumorigenèse. En effet, les patients atteints de ribosomopathies qui sont majoritairement induites par des mutations de gènes codant pour des RP, présentent un risque plus élevé de développer des cancers que la population normale. Par exemple, l'Anémie de Diamond Blackfan est caractérisée par la mutation de plus d'une dizaine de RP différentes et est associée à une augmentation du risque de développer différents types de tumeurs, comme des leucémies, des ostéosarcomes ou des cancers colorectaux (Aspesi and Ellis, 2019). En revanche le mécanisme expliquant cette prédisposition aux cancers suite aux mutations des RP est encore obscur. Certains proposent l'hypothèse que les mutations des RP modifient la composition des ribosomes, altérant ainsi la traduction et favorisant la tumorigenèse (Aspesi and Ellis, 2019; Mills and Green, 2017; Sulima et al., 2017). Une étude récente de Kampen et collègues montre que dans des lignées cellulaires de leucémies lymphoblastiques aiguës, la mutation de *RPL10* au résidu 98 qui affecte 8% des patients atteints de cette pathologie, augmente la traduction dépendante des IRES du facteur anti-apoptotique *BCL-2* favorisant la survie des cellules cancéreuses (Kampen et al., 2019). Cette étude valide partiellement les hypothèses basées sur le concept de ribosomes spécialisés, car les auteurs montrent qu'une mutation d'une RP modifie

la traduction d'un ARNm particulier impliqué dans la tumorigenèse. En revanche les auteurs n'ont pas déterminé l'effet de cette mutation sur la composition.

ii. *Variation de composition des ribosomes au niveau des ARNr*

Deux études majeures ont montré qu'une variation de la composition des ribosomes par des modifications post-transcriptionnelles de types 2'-O-Me et Ψ modifient la traduction de certains ARNm impliqués dans la tumorigenèse (Marcel et al., 2013; Yoon et al., 2006) (Figure 6). L'impact d'une variation de Ψ dans la tumorigenèse a surtout été déterminée dans des modèles de X-DC où *DKCI* est muté. La mutation de *DKCI* induit une variation du taux de Ψ des ARNr favorisant ainsi la traduction dépendante des IRES de différents gènes impliqués dans la tumorigenèse comme les gènes suppresseurs de tumeurs *tp53* et *P27* ou les facteurs anti-apoptotiques *Bcl-xL* et *XIAP* (Bellodi et al., 2010; Montanaro et al., 2010; Yoon et al., 2006). Une modification du taux de 2'-O-Me des ARNr a été identifiée dans les cancers du sein au cours de l'initiation et de la progression tumorale (Belin et al., 2009; Marcel et al., 2013). Dans ces modèles cellulaires d'initiation tumorale, la variation du taux de 2'-O-Me des ARNr était associée à une altération de la traduction dépendante des IRES d'ARNm comme *C-Myc* ou *IGF1R* (Marcel et al., 2013). Dans ce modèle, l'altération de la 2'-O-Me est induite par la surexpression de *FBL*. Les auteurs ont montré qu'une surexpression de *FBL* induit une résistance aux chimiothérapies mais aussi une augmentation de la prolifération dépendante d'IGF1R, démontrant le lien entre 2'-O-Me et tumorigenèse (Marcel et al., 2015). Une autre étude a montré que la surexpression de *FBL* favorisait la croissance tumorale dans des modèles murins (Su et al., 2014). En revanche, cette étude n'a pas déterminé si la surexpression de *FBL* dans les tumeurs et *in vivo* étaient associés à une variation du taux de 2'-O-Me des ARNr. Etant donné qu'une variation de l'expression de *FBL* suffit à modifier la de 2'-O-Me des ARNr, ces données suggéreraient l'existence de ribosome présentant des altérations de composition au niveau des 2'-O-Me des ARNr au moins dans des modèles cellulaires mammaires (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013; Su et al., 2014).

2. Ciblage des ribosomes en clinique

La mise en évidence d'une addiction des cellules cancéreuses à une augmentation de la biogenèse des ribosomes pour assurer leur croissance et leur hyperprolifération, a permis d'envisager le ciblage de la biogenèse des ribosomes en cancérologie (Pelletier et al., 2017; Ruggero, 2012a; Ruggero and Pandolfi, 2003). En effet, l'observation que la plupart des cellules cancéreuses produisent plus de ribosomes que les cellules normales suggère que les

cellules cancéreuses seraient plus sensibles à une diminution de la production de ribosomes que les cellules saines assurant un ciblage spécifique. La transcription des ADNr par l'ARN Pol I est l'étape limitante de la biogenèse des ribosomes. Ainsi la plupart des molécules développées pour inhiber la production des ribosomes cible cette étape (Figure 6) (Catez et al., 2018). Dans cette partie une description de manière non exhaustive des différentes molécules connues pour cibler la biogenèse des ribosomes sera réalisée.

a. Ciblage des ribosomes par des molécules chimiotherapeutiques

L'étude de Burger et collègues a permis de démontrer pour la première fois que de nombreuses molécules chimiothérapeutiques utilisées couramment en clinique, et dont le mode d'action connu est soit d'inhiber la synthèse des ADN soit d'introduire des dommages à l'ADN, inhibent également la biogenèse des ribosomes (Burger et al., 2010). Ces molécules inhibent différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. Par exemple les agents alkylants comme le cisplatine ou l'oxaliplatine inhibent la transcription des ADNr tandis que l'anti-métabolite 5-FU (5-Fluorouracil) cible le clivage des pré-ARNr durant l'étape de maturation des ARNr. En revanche l'auteur n'a pas pu déterminer si l'inhibition de la biogenèse des ribosomes par ces molécules contribue directement à leurs actions cytotoxiques ou non. Bruno et collègues ont récemment étudié le mécanisme d'action de trois agents alkylants : le cisplatine, l'oxaliplatine et la carboplatine (Bruno et al., 2017). De manière surprenante l'oxaliplatine, contrairement au cisplatine et au carboplatine, n'élimine pas les cellules cancéreuses par induction de dommages à l'ADN mais induit un stress nucléolaire suite à l'inhibition de la transcription des ADNr. Le stress nucléolaire est une réponse antitumorale dépendante de p53 qui est activée lors d'un dysfonctionnement de la biogenèse des ribosomes (Golomb et al., 2014). Le stress nucléolaire résulte notamment d'une accumulation de RP comme RPL11 qui va se fixer à MDM2 et empêcher la dégradation de p53 induite par MDM2. Cette accumulation de p53 dans la cellule cancéreuse active le programme de mort cellulaire.

Une autre molécule qui inhibe directement la transcription des ADNr et induit un stress nucléolaire est l'actinomycine D (Hollstein, 1974; Perry and Kelley, 1970). L'actinomycine D est le premier antibiotique décrit pour avoir une activité anticancer. Cette molécule a été approuvée en 1964 par la FDA. Elle s'intercale de préférence dans les régions riches en GC de l'ADNr et inhibe la transcription des ADNr. En revanche, cette molécule, par manque de spécificité, cause de fortes toxicités et crée des dommages à l'ADN (Philips et al., 1960). L'effet cytotoxique étant donc multifactoriel et non restreint à la biogenèse des ribosomes.

b. Ciblage des ribosomes par des thérapies ciblées

La mise en évidence de molécules chimiothérapeutiques qui affectent la biogenèse des ribosomes a permis de stimuler l'intérêt de développer des molécules ciblant spécifiquement la biogenèse des ribosomes. Trois molécules récemment développées, inhibent spécifiquement l'activité de l'ARN Pol I : BMH-21, CX-3543 et CX-5461 (Bywater et al., 2012; Colis et al., 2014; Drygin et al., 2009, 2011).

i. Molécule BMH-21

BMH-21, comme l'actinomycine D, s'intercale entre l'ADN double brins avec une préférence pour des motifs riches en GC que l'on retrouve principalement au niveau des ADNr. BMH-21 en se fixant sur l'ADNr, bloque la transcription des ADNr et induit la dégradation de la sous-unité catalytique de l'ARN Pol I (Peltonen et al., 2014). Peltonen et collègues ont montré que BMH-21 possède une activité anticancer puissante *in vitro* dans un panel de lignées cancéreuses, mais aussi, *in vivo*, puisque BMH-21 inhibe la croissance tumorale dans différents modèles de xénogreffes de cellules issues de mélanomes et de cancers colorectaux.

ii. Molécule CX-3543

La molécule CX-3543 se fixe aux motifs G-quadruplexes des ADN que l'on retrouve principalement au niveau des ADNr. CX-3543 bloque l'activité de l'ARN Pol I en empêchant l'interaction entre NCL et les motifs G-quadruplexes des ADNr (Drygin et al., 2009). CX-3543 induit l'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses en activant un stress nucléolaire de manière p53 dépendant ou indépendant. De plus cette molécule présente une activité anticancer *in vivo* puisqu'elle inhibe la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes de cancers du sein et de cancers pancréatiques. CX-3543 est actuellement en Phase I/II d'évaluation clinique dans des tumeurs solides et lymphomes (NCT00955786) et dans des tumeurs neuroendocrines (NCT00780663).

iii. Molécule CX-5461

CX-5461 se fixe aussi aux motifs G-quadruplexes et inhibe l'activité de l'ARN Pol I en empêchant la fixation de SL1 aux promoteurs des ADNr, et ainsi le recrutement de l'ARN Pol I aux ADNr (Drygin et al., 2011). Cette molécule élimine les cellules cancéreuses par induction de la sénescence et de l'autophagie dans les tumeurs solides. De plus, CX-5461 diminue la taille tumorale *in vivo* sur des modèles de xénogreffes de mélanomes et de cancers pancréatiques. Bywater et collègues ont démontré l'activité anticancer de CX-5461 dans des tumeurs liquides, en utilisant un modèle murin qui développe spontanément des lymphomes par activation de l'oncogène *MYC* (Bywater et al., 2012). De manière intéressante, *in vivo* CX-5461 induit

l'apoptose des cellules cancéreuses par activation d'un stress nucléolaire tandis que les cellules saines ne sont pas touchées. Cette étude démontre ainsi la spécificité de la molécule, et du ciblage de la biogenèse des ribosomes pour les cellules cancéreuses, et plus largement l'intérêt de cibler la biogenèse des ribosomes en oncologie. CX-5461 a passé la Phase I d'évaluation clinique qui montre que CX-5461 est bien toléré et induit une faible toxicité chez les patients atteints de cancers hématologiques (Harrison et al., 2015).

En plus de son activité d'inhibiteur de l'ARN Pol I, CX-5461 induit des dommages à l'ADN dû à la forte stabilisation des motifs G-quadruplexes. Or BRCA2, une protéine impliquée dans la tumorigenèse mammaire et des cancers féminins héréditaires, est importante pour la stabilisation de la fourche de réplication et pour la réparation des dommages à l'ADN induits par les motifs G-quadruplexes. Ainsi les cellules cancéreuses qui sont déficientes en BRCA1/2 sont particulièrement sensibles à CX-5461 (Xu et al., 2017). Ces observations ont permis l'initiation d'une étude de Phase 1 pour évaluer CX-5461 dans des cancers déficients en BRCA1/2 (NCT02719977). Il serait maintenant intéressant de démontrer que ces dommages à l'ADN pourraient contribuer à l'inhibition de la transcription des ADN.

Les ribosomes sont des machineries complexes dont leur fonction de traduction est intimement liée à leur structure. Les ribosomes ont longtemps été considérés comme une entité unique ayant toujours la même activité de traduction. Or cette vision du ribosome est maintenant remise en question par la mise en évidence que les cellules pouvaient produire différents types de ribosomes. Ces différences sont induites par une variation de la composition des ribosomes au niveau des RP et des modifications post-transcriptionnelles des ARNr. De plus en plus d'études démontrent que ces ribosomes avec une composition particulière présentent une activité de traduction qui est différente.

Les ribosomes sont aujourd'hui reconnus pour leur implication dans la tumorigenèse. Notamment l'hyperactivation de la biogenèse des ribosomes est nécessaire pour les cellules cancéreuses afin de maintenir leur état hyperprolifératif. La mise en évidence de molécules inhibitrices de la biogenèse des ribosomes, actuellement en phase clinique et qui ciblent efficacement les cellules cancéreuses démontrent l'intérêt de cibler les ribosomes en oncologie. De plus, l'émergence de ribosomes hétérogènes dans les cellules cancéreuses qui favorisent la tumorigenèse par la traduction spécifique de certains ARNm ouvrent encore plus de nouvelles opportunités thérapeutiques. En effet, on pourrait supposer que le ciblage d'une population de ribosomes qui présentent une composition particulière en RP et/ou en ARNr dans

les cellules cancéreuses permettraient d'éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses. Ainsi l'identification de ribosomes avec une composition particulière dans les cellules cancéreuses et leur implication dans la tumorigenèse est un champ de recherche qui devient de plus en plus prometteur en cancérologie.

Chapitre 3 : Les Cancers du sein

Les cancers du sein sont les cancers féminins les plus fréquents dans le monde et représentent la première cause de décès liée au cancer chez la femme. En revanche une forte réduction de la mortalité liée aux cancers du sein a été observée cette dernière décennie grâce à la mise en place de programmes de dépistage. De plus les cancers du sein sont aujourd'hui l'un des cancers les mieux caractérisés, ce qui a permis le développement de thérapies ciblées efficaces. Malgré ces avancées, quelques sous-types de cancers du sein sont encore peu compris et les protocoles de traitements dédiés restent inefficaces. Une meilleure compréhension de la biologie du cancer du sein reste donc aujourd'hui un élément essentiel dans le domaine du cancer du sein afin d'identifier de nouvelles voies de signalisation pour développer de nouvelles options thérapeutiques. Dans ce chapitre, une description du cancer du sein d'un point de vue épidémiologique et étiologique, la classification des cancers du sein et les traitements actuels seront décrits.

I. Epidémiologie et étiologie du cancer du sein

Dans cette partie, le cancer du sein développé chez la femme sera seulement discuté. En effet, le cancer du sein chez l'homme est une maladie très rare qui correspond à 1% des cancers du sein diagnostiqués au total en Europe et aux Etats-Unis (Anderson et al., 2010; Ferzoco and Ruddy, 2016). La caractérisation du cancer du sein chez l'homme est encore limitée, due à un faible nombre de patients et d'études sur cette maladie. En revanche il semblerait que les cancers chez l'homme présentent des caractéristiques biologiques et facteurs de risque uniques par rapport aux maladies développées chez la femme. Dans cette partie, quelques chiffres clés sur le cancer du sein, l'anatomie du sein féminin et les facteurs de risque seront décrits.

1. Le cancer du sein en quelques chiffres

Selon le rapport publié récemment par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) à partir de la base de données GLOBOCAN, en 2018, environ 2.1 millions de nouveaux cas dans le monde correspondent à un cancer du sein (Bray et al., 2018). Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme, avec un fort taux d'incidence dans les pays développés comme l'Europe ou l'Amérique du Nord. Cette tendance est inversée pour la mortalité, en effet le taux de mortalité est le plus faible dans l'Amérique du Nord et l'Europe du Nord.

Cette observation peut potentiellement s'expliquer par la mise en place d'accès au dépistage par mammographie, une prise en charge des patients ou l'accès aux soins qui diffèrent selon les pays (DeSantis et al., 2015; Marmot et al., 2013; Pace and Keating, 2014; Youlten et al., 2014).

Selon le programme SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) du NIH (National Institute of Health), la survie à 5 ans des patientes atteintes de cancer du sein aux Etats-Unis a atteint 89.7% entre 2008 et 2014 (National Cancer Institute, 2015). En France, plus de 58000 nouveaux cas ont été estimés par l'INCa en 2016 (Institut National du Cancer), dont plus de 11000 décès représentant 18.5% des décès par cancer chez la femme (Institut National du Cancer, 2016). La survie à 5 ans en France est de 87% entre 2005 et 2010. Dans les pays moins développés ou en développement, la survie à 5 ans est réduite par rapport aux Etats-Unis ou en France. Par exemple, la survie à 5 ans en Thaïlande est de 63% et en Uganda à 46% (Sankaranarayanan et al., 2010).

2. L'anatomie du sein

Le sein est un organe reproducteur secondaire chez la femme qui permet la production de lait. La production du lait est effectuée par la glande mammaire qui est présente dans chaque sein. La glande mammaire s'organise en une vingtaine de lobes, chaque lobe étant composé de lobules (Ramsay et al., 2005; Zucca-Matthes et al., 2016). Chaque lobule contient des alvéoles ou acini qui constituent la partie sécrétrice de la glande mammaire. En effet, les alvéoles sont composées de lactocytes qui ont un rôle de production et de stockage du lait (Figure 7).

Ces alvéoles sont connectées par des canaux alvéolaires ou intralobulaires pour former les lobules. Ces lobules sont aussi connectés par des canaux interlobulaires pour former les lobes. Les canaux interlobulaires se rejoignent pour former un grand canal, le canal galactophore, à raison d'un canal galactophore par lobe. Ainsi le lait va circuler entre ces différents canaux jusqu'aux canaux galactophores qui vont apporter le lait au niveau du mamelon.

La glande mammaire est également composée de tissus adipeux qui entourent les lobes. Ces glandes se développent et sont contrôlées par de nombreux facteurs dont les hormones : la progestérone, l'œstrogène et la prolactine (Briskin and O'Malley, 2010). Le sein est aussi parcouru par des vaisseaux sanguins et lymphatiques nécessaires au bon fonctionnement de l'organe par l'apport de nutriments et hormones et l'évacuation de déchets cellulaires. Les vaisseaux et ganglions lymphatiques forment un réseau lymphatique qui est principalement situé à trois endroits : au niveau des aisselles qu'on appelle les ganglions axillaire ; au niveau de la clavicule à deux endroits, au-dessus, avec les ganglions sus-claviculaires et au-dessous, avec les ganglions sous-claviculaires (ou infra-claviculaires) ; et au niveau du sternum avec les ganglions thoraciques internes (Institut National du Cancer). L'épithélium mammaire comprend deux types cellulaires : les cellules luminales et les cellules myoépithéliales (ou

basales). Les cellules luminales bordent la lumière des canaux et des lobules (INSERM). Les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont en contact avec la lame basale et le stroma environnant.

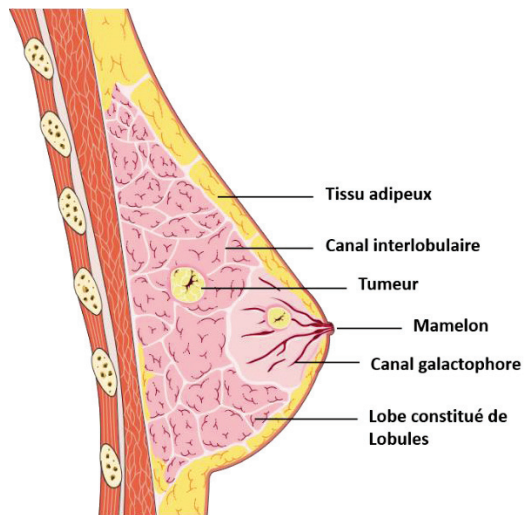


Figure 7. Représentation schématique de la structure du sein.

Chaque sein est composé d'une glande mammaire qui est responsable de la production du lait. La glande est divisée en compartiments, les lobes, qui sont composées de lobules. Les lobules présentent les alvéoles qui sont responsables de la production du lait. Le lait est ensuite transporté des lobules au mamelon via les canaux galactophores. Les cancers du sein (en jaune) se développent majoritairement au niveau des canaux galactophores (les cancers canaux) et au niveau des lobules (les cancers lobulaires). Schéma adapté de Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>)

3. Les facteurs de risque du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle, c'est-à-dire que différents facteurs peuvent influencer l'apparition de tumeurs mammaires. Différentes études épidémiologiques ont permis d'identifier de potentiels facteurs de risques comme l'hygiène de vie (obésité, consommation d'alcool, tabac), l'exposition à des facteurs environnementaux comme la radiation ionisante ou des polluants ou encore des facteurs génétiques (Lacey et al., 2013). Dans ce paragraphe, les facteurs de risques les plus connus et acceptés dans le domaine de l'épidémiologie seront traités. Ces facteurs de risques sont les facteurs liés à l'âge des patientes, l'histoire familiale et à la reproduction. Un autre facteur de risque qui est très important et qui ne sera pas détaillé, est le facteur lié au sexe puisque 1% des cancers du sein sont développés chez l'homme contre 99% chez la femme (Siegel et al., 2017).

a. L'âge

En plus du sexe, l'âge est un facteur de risque très important car le taux d'incidence du cancer du sein augmente avec l'âge (McPherson, K; Stell, CM, 2000). Le risque d'apparition du cancer du sein doublerait tous les 10 ans jusqu'à la ménopause où l'augmentation du risque ralentirait significativement. De plus selon une étude basée sur les données SEER, les cancers du sein présenteraient différentes caractéristiques selon l'âge des patientes au diagnostic. Les tumeurs agressives et donc de mauvais pronostic seraient diagnostiquées chez les patientes les plus jeunes ayant moins de 40 ans (Walker et al., 1996; Zabicki et al., 2006).

b. L'histoire familiale

Entre 5 et 10% des cas de cancers du sein sont induits par des facteurs héréditaires (Bray et al., 2018; McPherson, K; Stell, CM, 2000). Une étude sur un grand nombre d'échantillons (n = 160192 échantillons) par « The Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer » ont déterminé que des femmes qui avaient une sœur, une mère ou une fille (lien de parenté de premier degré) ayant un cancer du sein avaient un risque beaucoup plus élevé de développer cette maladie par rapport aux femmes n'ayant aucun proche avec un cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). Ce risque augmentait avec le nombre de proches affectés par cette maladie et avec l'âge au diagnostic de ces proches (< 50 ans) (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001; Pharoah et al., 1997).

De plus, 15 à 20% des cancers du sein héréditaires sont induits par une mutation des gènes de prédisposition au cancer du sein *BRCA1* et *BRCA2* (Breast Cancer) (Couch et al., 1997; Venkitaraman, 2002). Plusieurs études ont démontré que les femmes avaient plus de 50% de risque de développer un cancer du sein lorsqu'elles avaient un lien de parenté avec des personnes ayant une mutation sur au moins un de ces deux gènes ou lorsqu'elles présentaient elles-mêmes l'une de ces mutations (Antoniou et al., 2003; King et al., 2003).

c. Les facteurs liés à la reproduction

L'âge de la ménarche (période des premières menstruations), la parité (nombre de grossesses) et la ménopause sont les points les plus importants des facteurs liés à la reproduction. Une ménarche précoce, c'est-à-dire avant 12 ans, et une ménopause tardive, après 55 ans, augmentent le risque de développer des cancers du sein (Hunter et al., 1997; Trichopoulos et al., 1972). Cette augmentation du risque est liée à un prolongement d'exposition des tissus du

sein aux hormones comme l'œstrogène ce qui favoriserait l'apparition de tumeurs mammaires (Lacey et al., 2013). Plusieurs études ont montré que plus la parité est importante chez une femme, plus le risque de cancer est diminué (Hunter et al., 1997; M. et al., 2001; Macmahon et al., 1970). De plus, l'âge lors de la grossesse menée à terme est également important. En effet il a été montré que des femmes qui accouchent avant 20 ans ont une forte diminution de risque de développer des tumeurs par rapport aux femmes nullipares ou qui accouchent après 35 ans. L'allaitement permet également de diminuer le risque de cancer du sein et particulièrement si la durée de l'allaitement (pour chaque enfant au total) est importante (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002).

II. Les classifications des cancers du sein

La biologie du cancer du sein est aujourd'hui de mieux en mieux caractérisée. Il est maintenant bien connu que le cancer du sein n'est pas une maladie unique mais un groupe de maladies qui présentent différentes caractéristiques cliniques, biologiques et moléculaires. La classification des cancers du sein est primordiale en clinique pour la prise en charge des patientes. En effet, elle permet la prédiction de la survie des patientes ainsi que la sélection des patientes qui répondraient à un type de traitement spécifique. La classification des tumeurs mammaires continue d'évoluer et de s'affiner. En effet, au début des années 1990, une classification basée sur des critères anatomopathologiques a été développée (Ellis et al., 1992; Elston and Ellis, 1991). Puis une classification moléculaire des cancers du sein s'est développée à partir des années 2010 et continue aujourd'hui de s'affiner. Ces différentes classifications utilisées en clinique seront détaillées dans cette partie.

1. Classification anatomopathologique des cancers du sein

La classification anatomopathologie est celle utilisée couramment en clinique et est basée sur trois facteurs : la morphologie des tumeurs et deux facteurs pronostics, le stade de la tumeur déterminé par le système TNM (Tumor, Node, Metastasis) et le grade de la tumeur. Cette classification est importante pour aider les cliniciens à poser un pronostic et prendre une décision sur le type de traitement suite au diagnostic du cancer.

a. Classification histologique basée sur la morphologie des cancers du sein

Environ 95% des cancers du sein sont des adénocarcinomes ce qui signifie que les tumeurs se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire (Makki, 2015). Ces adénocarcinomes sont classés sur la base de deux facteurs : le site d'origine de la tumeur et la

capacité d'invasion des cellules cancéreuses. En effet, les adénocarcinomes peuvent avoir deux origines : les canaux galactophores correspondant aux adénocarcinomes canaux et les lobules qui sont les adénocarcinomes lobulaires (Figure 1). De plus la capacité d'invasion de ces tumeurs est définie comme *in situ* (non invasif) ou invasifs.

Parmi les sous-types histologiques des cancers du sein, les cancers canaux invasifs (IDC pour Invasive Ductal Carcinoma) et les cancers canaux *in situ* (DCIS pour Ductal Carcinoma In Situ) sont majoritaires, correspondant à environ 70-80% et 15-20% des cancers du sein respectivement (INSERM; Li et al., 2003). Selon la morphologie et l'architecture des cellules tumorales, chaque classe d'adénocarcinome peut être encore classée en sous-types avec des pronostics différents (Diab et al., 1999; Ellis et al., 1992; Makki, 2015). Cette classification permet de mettre en évidence une forte hétérogénéité au niveau morphologique des cancers du sein. Les sous-types histologiques sont présentés de manière détaillée dans la Figure 8.

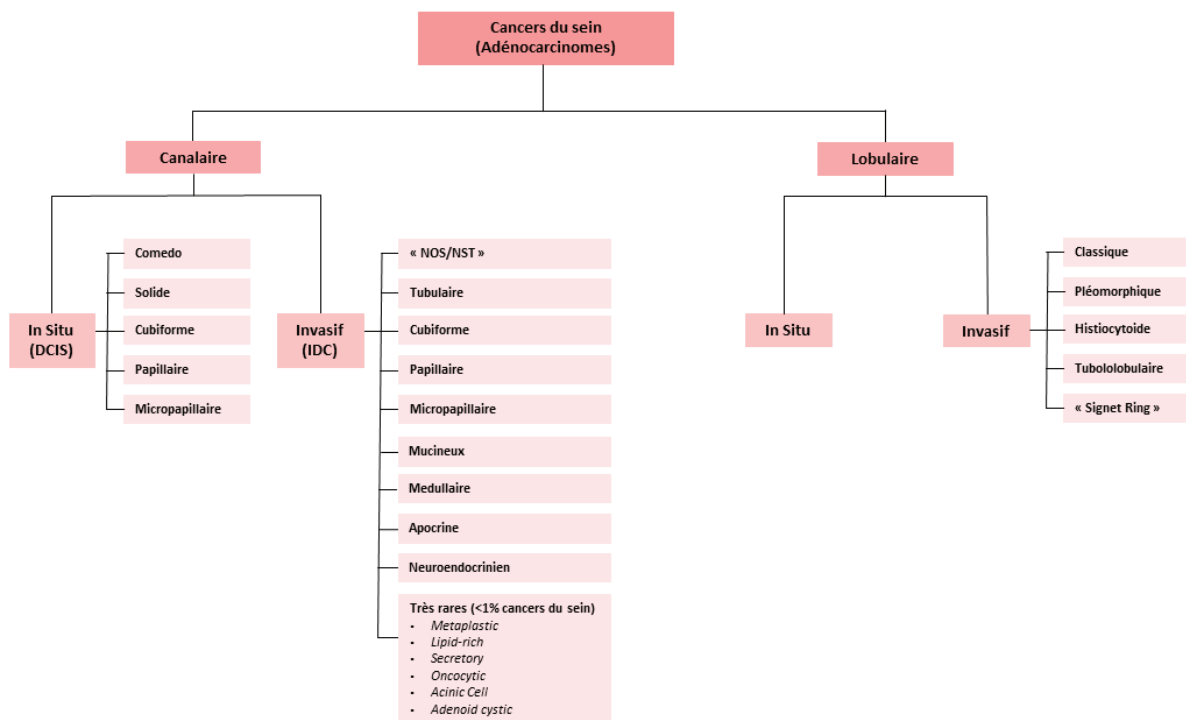


Figure 8. Classification histologique et hétérogénéité des cancers du sein.

Les adénocarcinomes sont caractérisés par leur origine (canaux ou lobulaires) et la capacité d'invasion des cellules tumorales (*in situ* ou invasif). Ces sous-types peuvent être encore classés selon les caractéristiques morphologiques et architecturaux. NOS : Not Otherwise Specified ; NST : No Specific Type. Les noms des sous-types histologiques très rare ont gardé leur intitulé en anglais (en italique).

b. Classification basée sur le système TNM

Le système TNM est un outil commun et standardisé, utilisé internationalement par les cliniciens. Le système TNM est défini par « the American Joint Committee on Cancer » selon trois critères : la taille et l'infiltration de la tumeur (T) ; le nombre et l'emplacement des ganglions lymphatiques envahis (N) ; et la présence ou absence de métastases (M). Le détail de la classification TNM est présentée dans le Tableau 2.

Le TNM est utilisé pour déterminer le stade du cancer, c'est-à-dire, le degré de propagation du cancer. Le stade de la tumeur est noté de 0 à IV. La détermination du stade de la tumeur selon la classification TNM est complexe et ne sera pas détaillée ici mais peut être consultée dans le document par « the American Joint Committee on Cancer » (American Joint Committee on Cancer, Breast Staging, 8th Edition, 2018). Des tumeurs de stade I et II signifient que les tumeurs restent localisées et qu'elles ne se sont pas propagées de la glande mammaire. Des tumeurs de stade III représentent des tumeurs dont la taille est élevée ou qui s'étendent au-delà de la glande mammaire avec potentiellement une propagation de cellules tumorales dans les tissus ou ganglions lymphatiques environnants. Enfin des tumeurs de stade IV représentent un cancer métastatique (présence de métastases à distances).

Tableau 2. Classification simplifiée du système TNM d'après (American Joint Committee on Cancer, Breast Staging, 8th Edition, 2018)

Classification TNM					
Tumeur (T)	T0	T1	T2	T3	T4
	Pas de détection de tumeur primaire	Taille tumorale ≤ 20 mm	20 mm < Taille tumorale ≤ 50 mm	Taille tumorale > 50 mm	Pas de taille tumorale spécifiée mais atteinte directe paroi thoracique
Ganglion (N)	N0	N1	N2	N3	
	Pas de détection de métastases dans ganglions lymphatiques	Micro-métastases/métastases dans 1 à 3 ganglions axillaires	Métastase dans 4 à 9 ganglions axillaires	Métastases dans ≥ 10 ganglions axillaires ou dans ganglions sus ou sous-claviculaires	
Métastase (M)	M0	M1			
	Pas de détection de métastases à distance	Présence de métastases à distance			

c. Classification basée sur le grade

Le grade de la tumeur est noté de 0 à 3 et est déterminé de différentes manières, la plus utilisée en clinique étant la classification Nottingham Grading System (NGS). La classification NGS permet de déterminer l'agressivité de la tumeur et est dérivée de la classification SBR (Scarff Bloom and Richardson) (Bloom and Richardson, 1957; Elston and Ellis, 1991). La classification NGS reflète le taux de différenciation de la tumeur par trois critères : l'architecture de la tumeur (présence de tubules) ; la taille et la forme des noyaux ; et l'activité mitotique des cellules cancéreuses.

Ces classifications sont basées sur l'évolution naturelle du cancer. En effet, les cellules tumorales au cours de la progression, se différencient et perdent leur fonction d'origine ce qui se traduit par une perte de la structure de la glande mammaire et l'absence de structures en forme de tubules. De plus, les cellules cancéreuses présentent un pléomorphisme nucléaire et une activité de prolifération accrue par rapport aux cellules normales. Sur cette base, les tumeurs sont notées par un système de points (3 points maximum) pour chaque critère. Un score total situé entre 3 à 5 correspond aux tumeurs les moins agressives (grade 1), un score de 6 à 7 désigne des tumeurs d'une agressivité intermédiaire (grade 2) et un score de 8 à 9 est associé à des tumeurs de forte agressivité (grade 3). L'évaluation du score des trois critères est détaillée dans le Tableau 3.

Tableau 3. Tableau de scoring selon les trois critères du Nottingham Grade System selon (Elston and Ellis, 1991)

Critères	Score		
	1	2	3
Formation des tubules dans la tumeur	Dans la majorité (< 75 %)	Partiellement (0 - 75 %)	Faible ou aucun (< 10%)
Pléomorphisme nucléaire	Noyaux petits et réguliers	Augmentation et atypie modérée	Pléomorphisme marquée
Nombre de mitoses*	0 – 5	6 – 10	> 11

* Le nombre de mitoses est calculé tous les 10 champs à la périphérie de la tumeur. Le score peut varier selon le microscope, l'objectif et le champ de diamètre du microscope. Ici le score pour le nombre de mitoses calculés a été effectué avec un Nikon, un objectif x40 et un champ de diamètre de 0.44mm.

2. Classification moléculaire des cancers du sein

La classification anatomopathologique permet ainsi de mettre en évidence l'hétérogénéité des cancers du sein. En revanche, ce type de classification ne permet pas de d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Ainsi ces dix dernières années, beaucoup d'efforts ont été concentrés dans l'amélioration de la classification des cancers du sein par des approches

moléculaires afin d'avoir une meilleure vision de l'hétérogénéité au niveau moléculaire de cette maladie et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Trois types de classification seront abordés dans cette partie : la classification moléculaire selon le profil d'expression génique par des analyses transcriptomiques ; la classification selon le statut de récepteurs par immunohistochimie (IHC) ; et la récente classification du sous-type Triple Négatif (TN).

a. Classification selon le profil d'expression génique

Dès le début du XXI^{ème} siècle, le développement à la fois de nouvelles technologies, avec par exemples des approches moléculaires de pointe telles que les puces à ADN (ou DNA microarrays), et méthodologiques, notamment en biostatistique et bioinformatique ont permis de stratifier les tumeurs mammaires selon leur profil d'expression génique. La première étude innovante publiée par Perou et collègues, a permis de mettre en évidence une hétérogénéité au niveau moléculaire des tumeurs mammaires (Perou et al., 2000). L'utilisation de puces à ADN sur une quarantaine d'échantillons a permis définir une liste de gènes « intrinsèques », c'est-à-dire les gènes dont l'expression varie significativement entre différentes tumeurs mais reste inchangée entre différents échantillons d'une même tumeur. En utilisant cette liste, les auteurs ont pu mettre en évidence quatre sous-types moléculaires basés sur l'expression différentielle des gènes de la voie de signalisation oestrogénique : le sous-type Luminal, Basal-like, HER2+ et Normal-like.

i. *Sous-type Luminal*

Le sous-type Luminal est caractérisé par une forte expression d'un groupe de gènes qui sont typiques des cellules épithéliales de type luminales de la glande mammaire, comme *ER* (Estrogen Receptor) ou les *cytokératines (CK) 8 et 18*.

ii. *Sous-type Basal-like*

Le sous-type Basal-like surexprime les gènes caractéristiques des cellules épithéliales de type basales (ou myoépithéliales) de la glande mammaire comme la *laminine* ou les *CK5, CK6 et CK17*.

iii. *Sous-type HER2+*

Le sous-type HER2+ est caractérisé par une amplification du gène *HER2* (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) et d'autres gènes qui sont localisés dans la même région du chromosome 17. Contrairement aux sous-types Luminal et Basal-Like, les cancers HER2+ ne sont pas représentatifs d'un type cellulaire spécifique de la glande mammaire.

iv. Sous-type Normal-like

Le sous-type Normal-like contient les tumeurs qui ont été regroupées avec les échantillons mammaires normaux. Ces tumeurs sont caractérisées par une forte expression de marqueurs des cellules basales et d'adipocytes et une faible expression de gènes caractéristiques des cellules luminales.

Cette classification initiale selon l'expression génique a été validée par différentes études avec un nombre d'échantillons plus large (Sorlie et al., 2003; Sørlie et al., 2001; Sotiriou et al., 2003). Ces trois études ont également montré que le sous-type Luminal était hétérogène et pouvait être encore stratifié en au moins deux groupes. Notamment, Sorlie et collègue ont déterminé dans trois séries indépendantes de cancer du sein (un total de 288 échantillons) que le sous-type Luminal pouvait être divisé en groupes Luminal A et Luminal B (Sorlie et al., 2003). Le Luminal B se distingue du Luminal A par une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération comme *MKI67* (Marker of proliferation KI-67) et un mauvais pronostic. En effet, avec les données cliniques, les auteurs ont mis en évidence que les patientes porteuses de tumeurs de sous-type Luminal A présentaient une meilleure survie que les patientes porteuses de tumeurs Luminal B. A contrario, les patientes dont les tumeurs sont classées HER+ et Basal-like présentent la plus mauvaise survie (Sorlie et al., 2003; Sørlie et al., 2001).

Il y a une dizaine d'années, d'autres sous-types de cancer du sein portant une signature moléculaire spécifique ont été identifiés par des analyses transcriptomiques : le sous-type Moléculaire Apocrine et le sous-type Claudin-low.

v. Sous-type Moléculaire Apocrine

Le sous-type Moléculaire Apocrine est caractérisé par l'absence d'expression d'*ER* et une forte expression du récepteur aux androgènes et des gènes de la voie liée aux androgènes (Farmer et al., 2005; Lehmann-Che et al., 2013). Contrairement aux autres études, le sous-type HER2+ n'a pas été identifié. En revanche, 50% des tumeurs Moléculaire Apocrine présentaient une amplification de *HER2*.

vi. Sous-type Claudin-low

Le sous-type Claudin-low présente deux caractéristiques. La première caractéristique est une forte expression de marqueurs souches des cellules mammaires ou des cellules initiatrices de tumeurs comme *CD44* ou *ALDH1*. (Ginestier et al., 2007; Mani et al., 2008; Prat et al., 2010;

Sabatier et al., 2014). La deuxième caractéristique est l'expression de marqueurs de l'EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition), avec une faible expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, comme *CDHI* ou les différentes claudines, et une forte expression des facteurs de transcription de l'EMT, comme les familles *ZEB* et *TWIST* (Prat et al., 2010; Sabatier et al., 2014).

Cette classification moléculaire permet aujourd'hui de mieux comprendre la biologie du cancer du sein et est associée à des différences de survie, présentant ainsi un pouvoir pronostic. En revanche la mise en place en routine de ce système de classification semble difficile en clinique. En effet, des études transcriptomiques et des analyses bioinformatiques/biostatistiques peuvent être longs et coûteux. Pour pallier à ce problème, différentes solutions ont été développées, comme l'utilisation du PAM50 (Prosigna), approuvé par la FDA en 2013, et qui permet d'identifier les sous-types moléculaires par l'utilisation d'une signature basée sur l'expression de 50 gènes (Parker et al., 2009). Une deuxième solution, moins fine mais aujourd'hui utilisée couramment en clinique, est l'utilisation de marqueurs de substitution en immunohistochimie (IHC) (Goldhirsch et al., 2013). Cette solution permet d'identifier le sous-type moléculaire des tumeurs, par l'utilisation d'un faible nombre de marqueurs, et d'une technique faisable en routine à moindre coût.

b. Classification selon le statut de récepteurs en immunohistochimie

Le développement de la technologie du Tissue Microarray (TMA) a permis de valider les signatures géniques au niveau protéique. En effet, cette technologie permet l'analyse par IHC dans une lame, de diverses tumeurs et ouvre donc la possibilité de tester différents marqueurs sur un grand nombre d'échantillons.

Une première étude menée par Callagy et collègues a permis de déterminer si la classification moléculaire des cancers du sein pouvait être retrouvée par l'analyse de 13 biomarqueurs en IHC sur plus d'une centaine de tumeurs (Callagy et al., 2003). Ils ont sélectionné 13 facteurs qui permettaient la stratification au niveau transcriptomique des tumeurs en sous-types intrinsèques comme ER, PR (Progesterone Receptor), HER2 et les CK de type luminal et basal. Sur la base de ces 13 marqueurs, et particulièrement selon l'expression d'ER, les mêmes sous-types intrinsèques ont été identifiés : Luminal A, Luminal B, HER2+ et Basal-like. Cette étude a donc permis d'identifier de potentiels marqueurs de substitution en IHC pour refléter la classification moléculaire issue des analyses transcriptomiques des cancers du sein. Aujourd'hui les trois marqueurs de stratification les plus utilisés en IHC sont les récepteurs ER, PR et HER2 qui permettent de classer de manière simplifiée les tumeurs en trois grands groupes : Luminal,

HER2+ et Triple Négatif (TN). La classification des sous-types de cancer du sein définie par des marqueurs IHC et validée par l'ESMO (European Society for Medical Oncology) et St Gallen International Breast Conference, est détaillée dans le Tableau 4.

i. Sous-type Luminal

Le sous-type Luminal est identifié par la surexpression des récepteurs hormonaux (RH) que sont ER et PR et l'absence de surexpression du récepteur HER2 (soit ER+ PR+/- HER2-). Ce sous-type représente 70% des tumeurs et est associé avec la meilleure survie parmi les trois groupes (Cheang et al., 2009; Nielsen et al., 2004). Un affinement de la classification du sous-type Luminal en Luminal A et Luminal B a été développé par l'introduction du marqueur de prolifération KI-67 puisque les tumeurs de type Luminal B sont caractérisées par une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération (Cheang et al., 2009). Le statut des récepteurs PR et HER2 servent également à distinguer les tumeurs de type Luminal A, des tumeurs de type Luminal B par rapport au pronostic. En effet les tumeurs Luminal B sont associés à une plus mauvaise survie par rapport aux tumeurs Luminal A (Cheang et al., 2009; Vallejos et al., 2010). Or des études ont démontré que des patientes porteuses de tumeurs ER+ mais PR- et/ou HER2+ présentent un mauvais pronostic par rapport aux patientes avec des tumeurs typiquement Luminal A (ER+ PR+ HER2-) (Cheang et al., 2009; Prat et al., 2013a).

ii. Sous-type HER2+

Le sous-type HER2 est identifié par l'absence de surexpression des RH et la surexpression de HER2 (soit ER- PR- HER+). Ce sous-type représente environ 15% des cancers du sein et est associé avec une mauvaise survie par rapport aux tumeurs Luminal A et Luminal B (Nielsen et al., 2004; Vallejos et al., 2010).

iii. Sous-type Triple Négatif

Les cancers de type Triple Négatif sont caractérisés par une absence de surexpression des trois récepteurs (soit ER- PR- HER2-). Ils représentent 15% des cancers du sein et les patientes atteintes de cette tumeur présentent un mauvais pronostic. Les patientes avec des tumeurs TN ont un risque plus élevé que leurs cancers progressent durant les 5 ans après diagnostic par rapport aux patientes atteintes d'un autre sous-type de cancer du sein (Dent et al., 2007).

Les cancers de type Basal-like sont également caractérisés par l'absence de surexpression au niveau protéique de ces trois récepteurs (Nielsen et al., 2004). En revanche, une tumeur Triple Négative n'est pas synonyme d'une tumeur Basal-like. En effet, d'après une étude par Prat et collègues, 78.6% des tumeurs classées TN correspondent à des tumeurs Basal-Like et

inversement 68.5% de tumeurs Basal-Like sont TN (Prat et al., 2013b). Le reste des tumeurs TN non Basal-like sont classées HER+, Luminal ou Normal-like démontrant l'hétérogénéité de ce groupe. D'ailleurs une étude innovante a permis de classer le sous-type Triple Négatif en 6 classes et qui seront détaillées dans le prochain paragraphe (Lehmann et al., 2011).

Tableau 4. Classification des sous-types de cancer du sein par l'utilisation de marqueurs de substitution en immunohistochimie d'après (Goldhirsch et al., 2013; Senkus et al., 2015)

Sous-type	ER	PR	HER2 amplifié*	KI-67
Luminal A	Positif	Positif	Négatif	Faible
Luminal B				
HER2 négatif	Positif	Positif ou Négatif	Négatif	Elevé
HER2 positif	Positif	Positif ou Négatif	Positif	Elevé ou Faible
HER2+	Négatif	Négatif	Positif	
Triple Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	

* L'amplification de HER2 peut être déterminée par immunohistochimie ou par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Positif correspond à une surexpression pour ER, PR, HER2 et/ou une amplification pour HER2 et négatif correspond à l'absence de surexpression. ER : Estrogen Receptor ; PR : Progesteron Receptor ; HER2 : Human Epidermal Growth Receptor 2 ; KI-67 : marqueur prolifératif.

c. Classification des cancers Triple Négatifs

Le cancer TN est aujourd'hui un cancer dont le traitement reste limité par rapport aux autres sous-types des cancers du sein. Les cancers TN étant très hétérogènes, il est ainsi nécessaire de mieux caractériser ce sous-type pour améliorer sa classification et identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Lehmann et collègues ont effectué des analyses de profils d'expression génique et d'analyses de type « Gene Ontology » (qui permet de déterminer un enrichissement en fonctions biologiques sur la base du profil d'expression génique) sur deux séries indépendantes de cancer du sein. Ils ont ainsi identifié 6 classes de cancers TN : Basal-Like 1 et 2, Immunomodulatoire, Mésoenchymateux, « Mesenchymal stem-like », Luminal récepteur androgène (Lehmann et al., 2011).

i. Sous-type Basal-like 1

Ce sous-type présente un enrichissement des voies de signalisation liées au cycle cellulaire et à la division cellulaire. Notamment les auteurs ont identifié une augmentation de l'expression des gènes liés à la prolifération, comme *MKI67*, et à la réponse aux dommages de l'ADN. Ces tumeurs sont donc caractérisées par une forte prolifération cellulaire.

ii. Sous-type Basal-like 2

Ce type de cancer est caractérisé par l'enrichissement de voies de signalisation liées aux facteurs de croissance. Lehmann et collègues ont, en effet, identifié une forte expression de facteurs de croissance comme *EGF* (Epidermal Growth Factor) ou *IGF1R* (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor).

iii. Sous-type Immunomodulatoire

Le sous-type Immunomodulatoire présente un enrichissement des voies de signalisation liées à l'immunité. Ils ont observé par exemple une forte expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation des cytokines, la présentation de l'antigène et la réponse liée à la reconnaissance de l'antigène.

iv. Sous-type Méenchymateux

Ce sous-type est caractérisé par l'enrichissement des voies de signalisation liées à la mobilité et à la différenciation cellulaire. Les auteurs ont également observé l'expression de gènes liés à l'EMT, avec notamment une diminution de l'expression de *CDH1* et une augmentation de l'expression des marqueurs méenchymateux.

v. Mesenchymal stem-like

Ce sous-type présente les mêmes caractéristiques que le sous-type Méenchymateux, avec en plus un enrichissement des voies de signalisation impliquées dans les facteurs de croissance, l'angiogenèse et les cellules souches. Ils ont également observé une diminution de l'expression des différentes claudines et des gènes liés à la prolifération.

vi. Sous-type Luminal récepteur androgène

Le sous-type Luminal récepteur androgène ou LAR (Luminal Androgen Receptor) est caractérisé par un fort enrichissement de facteurs impliqués dans la régulation des hormones et le métabolisme des androgènes et des œstrogènes. Les tumeurs de type LAR expriment fortement le récepteur androgène ainsi que les cibles situées en aval de cette voie.

La classification des cancers du sein est donc importante pour déterminer le pronostic (selon le grade, le stade et le sous-type du cancer) des patientes. Ces classifications ont permis de développer de nouveaux traitements et aujourd'hui ces classifications permettent de prédire leur efficacité. En particulier selon le statut des récepteurs ER, PR et HER2, les cliniciens sont aptes à prescrire un traitement adapté. Par exemple les patientes qui surexpriment les RH

bénéficieraient plus d'un traitement antihormonal ciblant la voie de signalisation ER que les patientes dont HER2 est amplifié. Les différents traitements utilisés aujourd'hui en routine en clinique seront décrits dans la partie suivante.

III. Les traitements des cancers du sein

Le but d'un traitement anticancer est dans l'idéal, de pouvoir supprimer la tumeur ou métastases et/ou de ralentir le développement de la tumeur, et/ou dans les pires cas, réduire le risque de récurrences de la maladie ou les métastases. Le traitement administré aux patientes atteintes d'un cancer du sein dépend de différents facteurs pronostics relatifs à la tumeur : la taille le grade, le stade, le sous-type histologique et moléculaire (selon le statut des RH et HER2 par IHC). D'autres facteurs sont également pris en compte, qui sont dépendants de la patiente, tels que l'âge, la ménopause et/ou la santé globale. Définir ces facteurs au moment du diagnostic de la maladie, sont donc essentiels pour la prise en charge des patientes.

Les traitements du cancer du sein peuvent être classés en deux groupes : les traitements localisés et les traitements systémiques. Les traitements localisés correspondent à la chirurgie et à la radiothérapie qui ciblent localement la tumeur. Les traitements systémiques correspondent aux traitements médicamenteux comme la chimiothérapie ou l'hormonothérapie diffusés par voies orales ou sanguines. Les différents types de traitement décrits dans cette partie correspondent aux traitements préconisés en France d'après « le guide de prise en charge des patients » de l'INCa et sont résumés dans la Figure 9 (INCa, 2013).

1. Les traitements localisés du cancer du sein

Les traitements localisés agissent seulement sur la région où se trouve la tumeur, à l'inverse des traitements systémiques. Il existe deux types de traitements localisés du cancer du sein : la chirurgie et la radiothérapie.

a. La chirurgie

Deux types d'intervention chirurgicale sont utilisés pour traiter les cancers du sein : la chirurgie conservatrice (ou tumorectomie) qui consiste à retirer seulement la tumeur ; et la chirurgie non conservatrice (ou mastectomie) qui consiste à enlever la totalité du sein. Après la chirurgie, un traitement adjuvant, comme la radiothérapie et/ou l'hormonothérapie et/ou la chimiothérapie, est souvent administré pour prévenir la récurrence de la maladie.

i. La chirurgie conservatrice

La chirurgie conservatrice consiste à retirer la tumeur avec une marge de tissu sain qu'on appelle la marge de sécurité qui permet de vérifier si la tumeur a bien été entièrement retirée.

Si cette marge de sécurité est atteinte par des cellules cancéreuses, une seconde chirurgie sera effectuée.

La tumorectomie est proposée lorsque la taille tumorale est inférieure à 2 cm ou lorsque la tumeur est unique. Ces tumeurs sont souvent des carcinomes *in situ*. Il est possible, lorsqu'une tumeur présente une taille supérieure à 2 cm, d'administrer un traitement néoadjuvant. Un traitement néoadjuvant peut être une chimiothérapie ou une hormonothérapie, celui-ci ayant pour but de diminuer la taille de la tumeur afin de faciliter l'intervention chirurgicale. En parallèle de la tumorectomie, il est possible d'effectuer une exérèse des ganglions axillaires pour déterminer le degré d'extension de la tumeur mammaire. Après chirurgie, une radiothérapie est administrée comme traitement adjuvant pour éviter la récurrence du cancer.

ii. La chirurgie non conservatrice

La mastectomie est proposée pour différentes conditions : la taille de la tumeur est trop importante (> 5 cm) pour qu'un traitement néoadjuvant soit efficace ; ou la patiente présente plus de deux tumeurs dans le même sein. Ces tumeurs sont souvent des carcinomes invasifs. La mastectomie totale et la mastectomie radicale modifiée sont deux types de mastectomie qui peuvent être proposés à la patiente. La mastectomie totale consiste à retirer le sein, le mamelon, le revêtement des muscles du thorax tout en gardant les nerfs, les muscles du thorax et les ganglions lymphatiques. La mastectomie radicale modifiée est presque similaire à la mastectomie totale sauf qu'elle retire également quelques ganglions axillaires pour déterminer le degré d'extension de la tumeur.

b. La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayons ionisants appliqués à un point précis pour cibler les cellules cancéreuses tout en épargnant les tissus sains et les organes proches. L'ionisation induit des radicaux libres qui provoquent la mort cellulaire par coupures des brins de l'ADN. Seules les cellules prolifératives sont radiosensibles, ce qui permet la spécificité de ce traitement puisque les cellules cancéreuses sont hyperprolifératives par rapport aux cellules saines. La radiothérapie est utilisée usuellement après intervention chirurgicale. Elle peut également être prescrite pour un cancer du sein métastatique afin de ralentir l'évolution de la tumeur et de traiter les métastases. La curiethérapie et la radiothérapie externe sont les deux types de traitements radiothérapeutiques dans les cancers du sein.

i. La curiethérapie

Ce traitement est peu utilisé dans les cancers du sein car la curiethérapie est très invasive. En effet, elle consiste à placer la source radioactive à l'intérieur du corps au niveau de la tumeur pour être directement en contact avec la zone à traiter.

ii. La radiothérapie externe

La source de radiation provient de l'extérieur du corps de la patiente. Elle est appliquée au niveau de la glande mammaire et du lit tumoral après chirurgie conservatrice. En revanche après chirurgie non conservatrice, la radiothérapie est appliquée au niveau de la paroi thoracique. L'énergie de rayonnement ionisant est représentée en Gray (Gy). En tant que traitement adjuvant, la dose est souvent de 50 Gy délivrés en 25 séances, soit environ 2 Gy par séance.

2. Les traitements systémiques

Les traitements systémiques ou médicamenteux circulent dans tout le corps afin d'atteindre les cellules cancéreuses qui sont présentes à différentes localisations ou qui n'ont pas été détectées lors du diagnostic. Ainsi ces traitements sont souvent administrés dans trois cas de figure : en tant que traitement néoadjuvant, pour diminuer la taille tumorale ; en tant que traitement adjuvant, pour éviter des récives dans les cancers *in situ* et invasifs ; ou en présence de cancers du sein métastatiques, pour atteindre les cellules cancéreuses à différentes localisations. Il existe trois types de traitements systémiques : la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées.

a. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de molécules qui vont inhiber la division cellulaire et induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses. Ces molécules peuvent être utilisées seules, ou plus couramment, en combinaison. En effet, une combinaison de différentes molécules chimiothérapeutiques permet une action synergique de ces molécules et ainsi d'augmenter la toxicité tout en réduisant le risque de résistance.

Les principaux mécanismes induisant la cytotoxicité par ces molécules sont l'inhibition de la synthèse de l'ADN et le blocage du cycle cellulaire. Les principaux agents anticancéreux utilisés pour inhiber la synthèse de l'ADN dans les cancers du sein sont les fluoropyrimidines (5-FU et capécitabine), les agents alkylants (cyclophosphamide) et les anthracyclines (doxorubicine). Les molécules chimiothérapeutiques utilisées dans les cancers du sein pour bloquer le cycle cellulaire sont les taxanes (docétaxel, paclitaxel) et le méthotrexate. Ces molécules ciblent les cellules qui se divisent rapidement incluant les cellules cancéreuses mais

aussi les cellules saines, comme les cellules sanguines, ce qui induit des effets secondaires à ces traitements.

b. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie consiste à inhiber la sécrétion des hormones ou à bloquer l'action des hormones afin d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses. Ce traitement est proposé aux patientes qui présentent des tumeurs hormono-sensibles, c'est-à-dire qui expriment ER et PR, correspondant usuellement aux sous-types Luminal. Le traitement non médicamenteux et le traitement médicamenteux représentent les deux types majoritaires d'hormonothérapie.

i. *L'hormonothérapie non médicamenteuse*

Ce traitement consiste à inhiber la synthèse d'œstrogène par les ovaires en rendant ces organes non-fonctionnels. La radiothérapie, pour irradier les ovaires, ou l'ovariectomie, qui consiste à enlever chirurgicalement les ovaires sont des traitements non médicamenteux afin d'inhiber la synthèse des œstrogènes.

ii. *L'hormonothérapie médicamenteuse*

Trois types de médicament représentent cette hormonothérapie : les anti-œstrogènes, les anti-aromatases et les agonistes de la LH-RH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone). Le type de traitement sera proposé en fonction de la présence ou non de ménopause chez la patiente.

Les anti-œstrogènes sont proposés aux femmes ménopausées ou non et ont pour but de bloquer l'action de l'œstrogène. Il existe deux types d'anti-œstrogènes : les SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation) et les SERM (Selective Estrogen Modulator). Le SERD (Fulvestrant) se fixe au récepteur à l'œstrogène et induit sa dégradation par le protéasome via une ubiquitination. Cette action réduit le nombre de récepteurs œstrogènes disponibles en surface, et réduisant ainsi l'activation de la voie œstrogène intracellulaire par fixation de l'œstrogène à son récepteur. Le SERM (Tamoxifène) bloque également la fixation de l'œstrogène à ER mais par un mécanisme de compétition de fixation entre le Tamoxifène et l'œstrogène, au récepteur œstrogène.

Les anti-aromatases, ou inhibiteurs de l'aromatase (Létrozole), bloquent la production de l'œstrogène et sont prescrits aux femmes ménopausées. En effet, lorsque la femme est ménopausée l'œstrogène n'est plus produite par les ovaires mais provient de l'aromatase des androgènes en œstrogènes. Cette réaction enzymatique est catalysée par l'aromatase. Ainsi le Létrozole cible l'aromatase et induit une diminution de la production des œstrogènes.

Pour les femmes non ménopausées, un autre traitement peut être proposé qui est un agoniste de la LH-RH (Leuproréline). La LH-RH est une hormone produite par l'hypothalamus qui stimule

la sécrétion par l'hypophyse de la LH (Luteinizing Hormone). La LH va stimuler les ovaires pour favoriser la production d'œstrogène. L'utilisation de cet agoniste hyperstimule l'hypophyse ce qui l'empêche de stimuler les ovaires et bloque ainsi la production d'œstrogène par les ovaires. Ce traitement induit alors une ménopause artificielle.

c. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées visent spécifiquement des protéines impliquées directement dans la tumorigénese. Plusieurs thérapies ciblées sont utilisées dans les cancers du sein dont les inhibiteurs de HER2, le bévacizumab et l'éverolimus.

i. *Les inhibiteurs de HER2*

Deux types d'inhibiteurs de HER2 sont utilisés aujourd'hui en clinique : le trastuzumab et le lapitinib.

Le trastuzumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal qui cible spécifiquement le récepteur HER2. Ce traitement est donc administré aux patientes qui présentent des tumeurs surexprimant HER2, ces tumeurs représentent environ 15% des cancers du sein. L'Herceptin a été approuvé par la FDA en 1998. En effet, plusieurs études cliniques ont montré que l'Herceptin, en combinaison avec une chimiothérapie en traitement adjuvant dans des cancers métastatiques HER2+ ou des cancers non-métastatique HER2+, augmentait significativement la survie globale et la survie sans récurrence des patientes (Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005; Slamon et al., 2001). Le trastuzumab aurait trois mécanismes d'action : la dégradation d'HER2, la stimulation du système immunitaire et l'inhibition des voie MAPK et PI3K/AKT afin de diminuer la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses (Arnould et al., 2006; Vu and Claret, 2012).

Le lapitinib est un double inhibiteur des récepteurs tyrosines kinases EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et HER2. Le lapitinib (Tyverb) est souvent administré en deuxième ligne de traitement avec la molécule chimiothérapeutique, capécitabine aux patientes présentant des tumeurs métastatiques HER2+ (Geyer et al., 2006).

ii. *Inhibiteur de VEGF*

Le bévacizumab (Avastin) est un anticorps monoclonal qui cible la protéine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF est un facteur qui stimule la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. Ainsi le bévacizumab est un anti-angiogénique qui inhibe la croissance tumorale en appauvrissant l'approvisionnement de la tumeur en nutriments et en oxygène. Le bévacizumab est souvent administré aux patientes qui présentent un cancer métastatique en combinaison avec des chimiothérapies comme le paclitaxel et la capécitabine (Gligorov et al.,

2014; Miller et al., 2007; Robert et al., 2011). En revanche son utilisation pour traiter les cancers métastatiques n'est pas unanime dans le monde. En effet, la FDA (Amérique) a retiré en 2011 son approbation du bévacicumab pour les cancers métastatiques du sein, tandis que l'EMA (Europe) a gardé son approbation (Sasich and Sukkari, 2012). Ces deux agences présentent une différence d'opinion concernant l'efficacité du bévacicumab par rapport à sa toxicité.

iii. Inhibiteur de mTORC1

L'everolimus (Afinitor) est un inhibiteur de mTORC1 (cf. Chapitre I paragraphe « Inhibiteurs de la voie mTOR ») qui a été approuvé par la FDA et l'EMA pour le traitement des cancers du sein métastatiques ER+ PR+ HER2- chez les femmes ménopausées (Baselga et al., 2012; Piccart et al., 2014). L'everolimus est prescrit en deuxième ligne de traitement en combinaison avec l'exemestane (un anti-aromatase), aux patientes qui ont subi un traitement à base d'anti-aromatases et dont la maladie a récidivé ou dont la maladie est associée à des métastases.

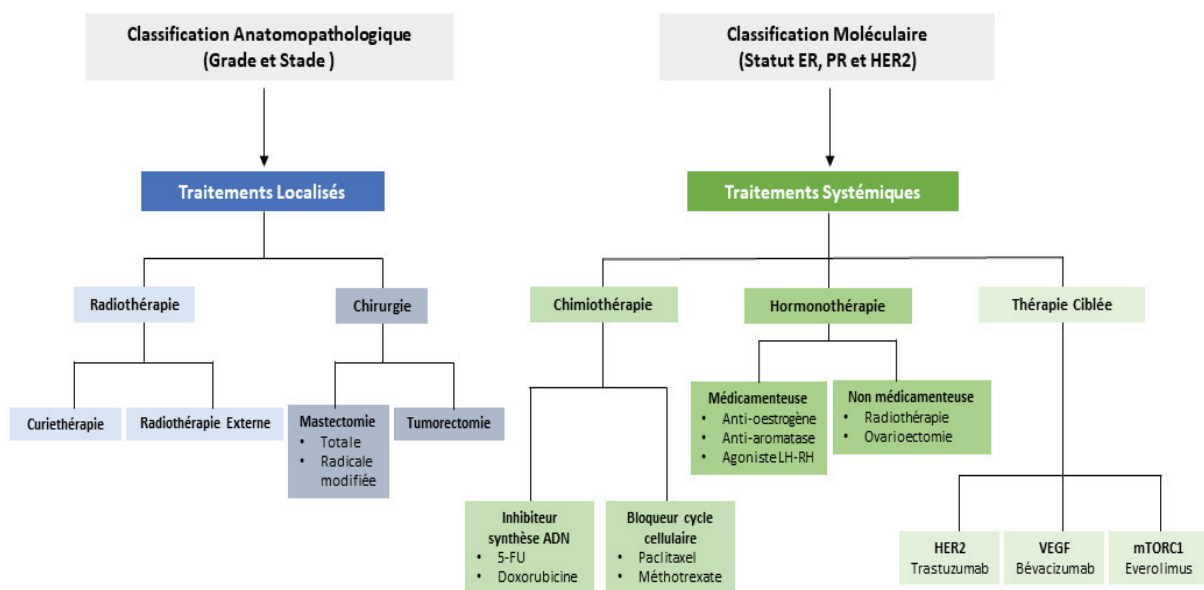


Figure 9. Les traitements des cancers du sein.

Les traitements des cancers du sein peuvent être divisés en deux groupes : les traitements localisés qui ciblent localement la tumeur comme la radiothérapie et la chirurgie et les traitements systémiques qui circulent dans tout le corps. La chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées font partie des traitements systémiques. La radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie peuvent agir seules ou en combinaison en tant que traitement néo-adjuvant et adjuvant avant et après la chirurgie afin de diminuer la taille tumorale et prévenir les récurrences, respectivement. Les classifications sont indispensables pour le choix des traitements. Selon la classification anatomopathologique de la tumeur des patientes, une chirurgie non conservatrice (mastectomie) ou conservatrice (tumorectomie) peut être proposée aux patientes. Selon l'expression des récepteurs ER, PR et HER2 (qui reflètent la classification moléculaire des cancers du sein), l'administration des traitements systémiques sera différente. Par exemple, les patientes porteuses de tumeurs HER2+ se feront administrer les anti-HER2 comme le trastuzumab, tandis que les patientes avec des tumeurs ER+ PR+ auront tendance à recevoir des hormonothérapies.

Les nombreux traitements disponibles ont permis de diminuer significativement la mortalité induite par le cancer du sein. En revanche, en France, 18.5% de femmes atteintes d'un cancer du sein sont décédées de leur maladie en 2016 (Institut National du Cancer, 2016). Cette mortalité peut dépendre de plusieurs facteurs : la présence d'une tumeur métastatique, le développement d'une résistance à un traitement ou l'absence de traitements efficaces pour un sous-type de cancer du sein comme le Triple Négatif. Ainsi, des études continuent d'être réalisées pour décrypter les différents mécanismes responsables de l'agressivité, la résistance et l'hétérogénéité des cancers du sein afin de développer des nouvelles options de traitements et/ou d'identifier des biomarqueurs pronostics et/ou prédictifs. Les biomarqueurs jouent un rôle essentiel dans la prise en charge des patients, en effet, ils permettent de déterminer le niveau d'agressivité de la tumeur et la susceptibilité de la tumeur à répondre à un traitement donné. Parmi les thérapies ciblées du cancer du sein, un inhibiteur de la voie mTOR est utilisé, or cette voie est impliquée dans la régulation de la traduction. On pourrait se demander si l'efficacité de l'éverolimus dans les cancers du sein repose sur son impact sur les voies impliquées dans la prolifération et la survie des cellules ou son impact sur la voie de régulation de la traduction. Si l'inhibition de la voie mTOR impacte la voie de régulation de la traduction, la traduction et/ou les effecteurs de la traduction comme le ribosome pourraient être une nouvelle voie à cibler dans les cancers du sein.

IV. La Transition Epithélio-Mésenchymateuse

La classification moléculaire des sous-types des cancer du sein a permis d'identifier différents processus biologiques impliqués dans la tumorigenèse mammaire. Parmi ces processus biologiques, je décrirai spécifiquement la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui a été utilisé comme modèle au cours de ma thèse.

Le cancer Triple Négatif est le sous-type le plus hétérogène et qui présente le moins d'options thérapeutiques à ce jour. La chimiothérapie est le traitement de référence du fait de l'absence de surexpression des récepteurs ER, PR et HER2. L'identification de sous-types des cancers TN a permis de mieux le caractériser et permettra d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles (Lehmann et al., 2011b). Parmi ces sous-types, les cancers Claudin-low, Mésenchymateux et Mesenchymal-stem like sont caractérisés par l'expression de marqueurs de l'EMT. (Lehmann et al., 2011; Prat et al., 2010). L'EMT est impliquée dans différents processus dont la tumorigenèse, au niveau de l'initiation et de la progression tumorale (Dongre

and Weinberg, 2018; Nieto et al., 2016). Ces observations feraient de l'EMT une voie intéressante à cibler pour les sous-types de cancer du sein associés à l'EMT. Dans cette partie, une description de ce processus, son rôle dans le cancer du sein et enfin les différents mécanismes résultant en l'induction de l'EMT seront décrits dans cette partie.

1. Les changements cellulaires liés à la transition épithélio-mésenchymateuse

L'EMT est un processus cellulaire qui permet la transdifférenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Les cellules épithéliales acquièrent ainsi un phénotype mésenchymateux. Cette transition est dynamique et réversible, ce processus inverse étant ainsi appelé MET (Mesenchymal-Epithelial Transition). L'EMT est essentiel au cours du développement embryonnaire notamment lors de la gastrulation ou la formation des cellules de la crête neurale (Kalluri and Weinberg, 2009). Chez l'adulte, l'EMT n'est activé que dans de rares cas physiologiques comme la cicatrisation. Aujourd'hui, la définition de l'EMT s'est élargie avec l'introduction d'une transition partielle de l'EMT (Dongre and Weinberg, 2018; Nieto et al., 2016). En effet, il est aujourd'hui accepté que les cellules épithéliales ne se différencient pas complètement en cellules mésenchymateuses mais oscillent entre des états intermédiaires, c'est-à-dire des états mi-épithéliaux et mi-mésenchymateux, illustrant la plasticité cellulaire durant ce processus. En revanche, pour simplifier cette partie, un changement d'état complet entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses sera décrit (Figure 10).

a. Structure des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales présentent une morphologie qui est dite « prismatique ». Ces cellules sont caractérisées par la présence d'une polarité baso-apicale et une forte cohésion intercellulaire. Au pôle basal, les cellules épithéliales se lient à la lame basale grâce aux hémidesmosomes et aux intégrines, comme l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ (Huang et al., 2012). De plus, les cellules épithéliales sont liées les unes aux autres latéralement par des jonctions cellulaires qui sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées sont situées spécifiquement au niveau de l'apex des cellules épithéliales, et sont responsables de l'étanchéité et du maintien de la polarité de ces cellules. Les deux éléments principaux de ces jonctions serrées sont les protéines transmembranaires claudines et occludines. Les domaines cytoplasmiques de ces deux protéines se lient aux protéines ZO (Zonula Occludens) qui s'associent aux filaments du cytosquelette d'actine (Alberts et al., 2002).

Les desmosomes permettent l'adhésion cellulaire ainsi qu'une solidité mécanique des cellules et du tissu épithélial (Alberts et al., 2002). Les desmosomes sont composés de protéines transmembranaires : les protéines desmogléines et desmocollines, qui font partie de la famille des cadhérines. Ces protéines se lient aux protéines d'ancrage comme la desmoplakine qui permettent la connexion aux filaments intermédiaires du cytosquelette (les cytokératines).

Les jonctions adhérentes permettent une adhésion stable entre les cellules épithéliales, via leur liaison avec le cytosquelette d'actine des différentes cellules épithéliales. Un constituant essentiel de ces jonctions est l'E-Cadhérine (Epithélial-Cadhérine), une protéine transmembranaire codée par le gène *CDH1*. Le domaine cytoplasmique de l'E-Cadhérine interagit avec des protéines cytoplasmiques, les caténines. En particulier la β -caténine se lie à l' α -caténine qui à son tour se lie aux microfilaments d'actine corticale (Shapiro and Weis, 2009).

b. Les étapes de l'EMT

Le processus d'EMT peut être résumé en trois grandes étapes : la perte des jonctions épithéliales, la réorganisation architecturale du cytosquelette et une reprogrammation de l'expression génique des différents acteurs de l'EMT (Lamouille et al., 2014). Lors du processus de l'EMT, les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux qui se traduit par l'acquisition d'une morphologie fibroblastique avec une polarité avant-arrière (Dongre and Weinberg, 2018). Les cellules mésenchymateuses sont isolées et présentent une capacité migratoire et invasive accrue.

i. Perte des jonctions épithéliales

L'initiation de l'EMT est induite par la déstabilisation de l'intégrité de l'épithélium et la perte de contact entre des cellules épithéliales en conséquence d'une diminution de l'expression des composants des différentes jonctions cellulaires (Dongre and Weinberg, 2019; Lamouille et al., 2014). En effet, une diminution de l'expression des claudines et des occludines induit une dissolution des jonctions serrées, tandis qu'une diminution de l'expression d'E-Cadhérine déstabilise les jonctions adhérentes. Cette perte des jonctions épithéliales s'accompagne d'une perte de la polarité baso-apicale des cellules épithéliales.

ii. Réorganisation architecturale du cytosquelette

Les cellules épithéliales subissent un changement morphologique favorisé par une réorganisation du cytosquelette d'actine corticale (réseau de filaments d'actine sous-membranaire) permettant une elongation cellulaire et l'acquisition d'une capacité migratoire

unidirectionnelle (Lamouille et al., 2014). Cette réorganisation du cytosquelette est caractérisée principalement par la formation de fibres de stress d'actine, importante pour la contractilité et la motilité cellulaire. Elle est aussi caractérisée par la réorganisation du réseau d'actine membranaire pour former des protubérances. Ces protubérances qui sont des lamellipodias, des filopodias et des invadopodias, permettent à la cellule d'acquérir des capacités migratoires et invasives. Enfin les cellules adoptent une polarité avant-arrière permettant à la cellule de migrer de manière unidirectionnelle.

iii. Reprogrammation de l'expression génique

Au cours de l'EMT, les cellules répriment l'expression des protéines épithéliales. Parmi ces protéines, la diminution de l'E-Cadhérine est un des marqueurs les plus importants de l'EMT et induit une déstabilisation des jonctions adhérentes (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Lamouille et al., 2014). Une diminution des autres protéines impliquées dans les autres jonctions cellulaires, comme les claudines et la desmoplakine, induisent une perte des jonctions serrées et des desmosomes respectivement.

En parallèle d'une répression de l'expression des protéines épithéliales, une activation de gènes codant pour les protéines mésenchymateuses est observée. Par exemple, une activation de l'expression de la protéine mésenchymateuse, N-Cadhérine (Neural Cadhérine) est observée en même temps qu'une diminution de l'expression d'E-Cadhérine (Lamouille et al., 2014). Une altération d'expression des protéines du cytosquelette est également impliquée dans l'EMT. Au cours de l'EMT, la composition des filaments intermédiaires du cytosquelette change et passe d'un type épithélial à un type mésenchymateux, par répression des cytokératines et augmentation de l'expression de la protéine vimentine. La vimentine est également un des marqueurs les plus importants de l'EMT. Enfin, l'acquisition de la capacité d'invasion au cours de l'EMT est contrôlée par une augmentation de l'expression de protéases, comme les MMP2 et MMP9 qui favorisent la dégradation de la matrice extra-cellulaire et donc favorisent l'invasion.

La mise en place de l'EMT est principalement orchestrée par les facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TFs). Ces facteurs qui régulent l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, et des EMT-TF eux-mêmes (Figure 10). La régulation de l'expression génique au cours de l'EMT par ces EMT-TFs sera décrit plus en détail dans la partie 3.

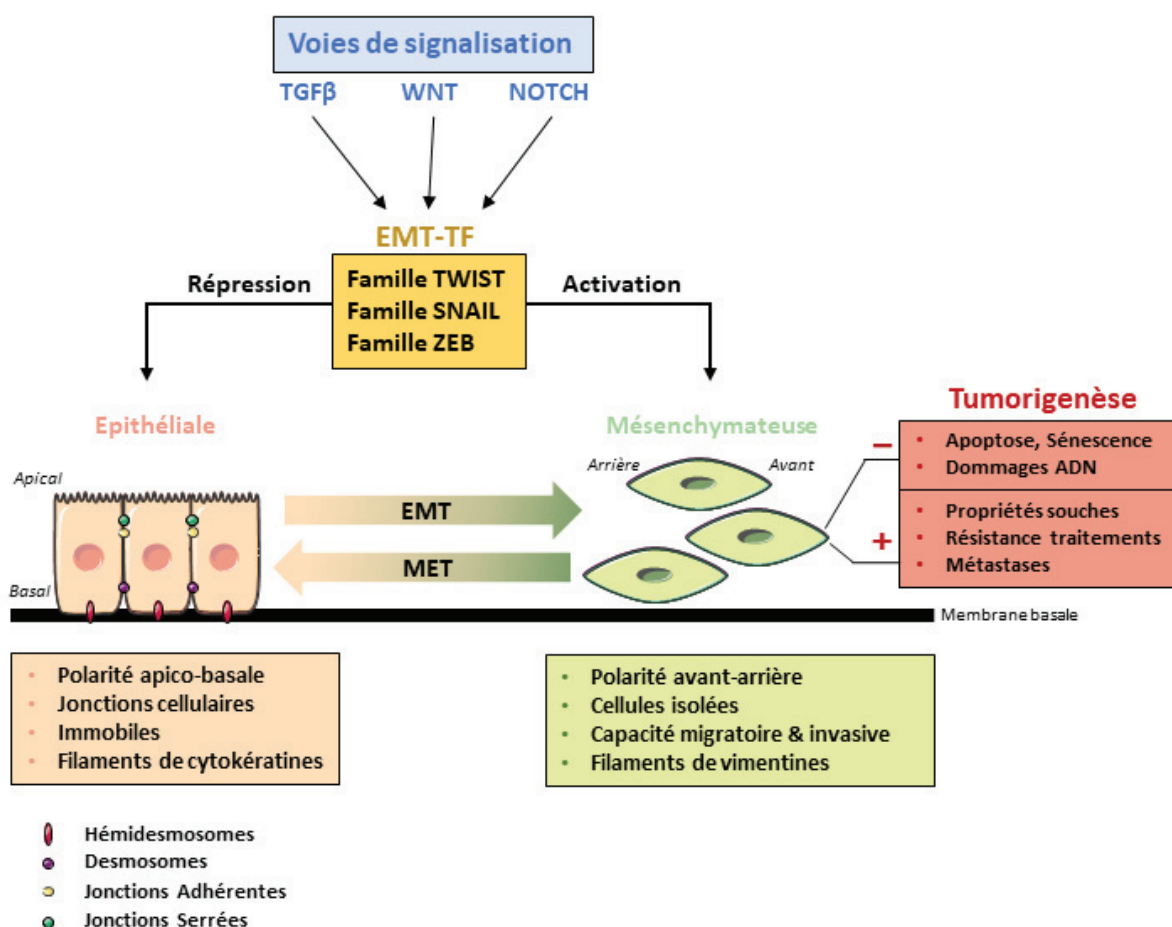


Figure 10. Schéma simplifié de l'EMT.

L'EMT est principalement orchestré par les EMT-TFs (TWIST1, TWIST2, SNAIL, SLUG, ZEB1 et ZEB2) qui sont activés par des voies de signalisation comme TGFβ, NOTCH et WNT. Ces EMT-TFs permettent de réprimer les caractéristiques épithéliales tout en activant un phénotype mésenchymateux. En effet, les cellules épithéliales perdent leur polarité baso-apicale, leurs jonctions cellulaires et réorganisent leur cytosquelette pour acquérir une polarité avant-arrière, une capacité de migration et d'invasion. Durant la tumorigenèse, l'EMT permet aux cellules cancéreuses d'obtenir divers avantages sélectifs comme l'échappement aux mécanismes de sauvegarde induits par l'activation d'oncogènes et aux dommages de l'ADN, l'acquisition de caractéristiques souches, de résistance aux traitements et le développement de métastases. EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition ; MET : Mesenchymal to Epithelial Transition ; EMT-TFs : EMT Transcription Factors ; TGFβ : Transforming Growth Factor β. (<https://smart.servier.com/>)

2. Rôle de l'EMT dans les cancers du sein

L'EMT peut être classifiée en trois types basés sur le contexte biologique dans lequel l'EMT a lieu (Kalluri and Weinberg, 2009). L'EMT de type 1 est observée lors de l'embryogenèse tandis que l'EMT de type 2 intervient lors du processus de cicatrisation. L'EMT de type 3 est observée dans les cellules cancéreuses. L'EMT de type 3 peut avoir lieu dans différents types de cancer comme le mélanome, le cancer colorectal ou le cancer pulmonaire (Caramel et al., 2013; Vu

and Datta, 2017; Xiao and He, 2010). Dans cette partie seule l'EMT de type 3 sera décrit et spécifiquement dans les cancers du sein (Figure 10).

a. Rôle de l'EMT dans l'initiation tumorale mammaire

Le rôle de l'EMT dans la tumorigenèse est principalement connu au niveau de la progression tumorale lors du développement des métastases du fait des caractéristiques migratoires et invasives des cellules mésenchymateuses (Figure 10). Or différentes études suggèrent que les EMT-TFs pourraient aussi avoir un rôle dans l'initiation tumorale (Puisieux et al., 2014).

i. *Echappement aux mécanismes de sauvegarde de la cellule*

L'échappement des mécanismes de sauvegarde induit par l'activation d'oncogènes est une étape importante lors de la transformation cellulaire. Ces mécanismes de sauvegarde que sont l'apoptose et la sénescence, permettent de restreindre une prolifération cellulaire aberrante suite à l'activation d'oncogènes.

Ansieau et collègues ont mis en évidence dans des cellules épithéliales mammaires (ou HMEC pour Human Mammary Epithelial Cell), que l'activation de l'oncogène *HER2* accompagnée de la surexpression de *TWIST1* ou de *TWIST2* diminuait significativement la sénescence par rapport aux HMEC présentant seulement l'activation de *HER2* (Ansieau et al., 2008). Cette inhibition de la sénescence par *TWIST1* et *TWIST2* passe par l'inhibition de la voie p53/Rb (Retinoblastoma) car les protéines TWIST diminuent l'expression de *p16^{INK4A}* et de *p21^{cip1}*. Cette étude suggère que TWIST permettrait de contourner la sénescence, un mécanisme de sauvegarde induit par l'activation d'un oncogène et favoriserait la transformation cellulaire.

Une autre étude par Valsesia-Wittmann et collègues a mis en évidence que *TWIST1* permettait également d'échapper à l'apoptose en réponse à l'activation de l'oncogène *N-myc* dans des cellules cancéreuses de neuroblastomes (Valsesia-Wittmann et al., 2004). Cette inhibition de l'apoptose par *TWIST1* passe par la diminution de l'expression de *p21^{cip1}* et donc une inhibition de p53. Ces deux études suggèrent une activité oncogénique de TWIST1, cette hypothèse a été validée par l'étude de Morel et collègues (Morel et al., 2012). En effet, la surexpression de *TWIST1* accompagnée d'une activation de l'oncogène *H-Ras* favorise la transformation des cellules HMEC via une diminution de l'activité phosphatase de PP2A, et l'apparition de tumeurs de type Claudin-Low dans des modèles murins. Les auteurs suggèrent que TWIST1 favorise la tumorigenèse via le contournement de barrières de protection mis en place par p53, pRB et PP2A lors de l'initiation tumorale.

ii. Initiation tumorale indépendante d'une instabilité génomique

Le dogme est que durant la tumorigenèse, les cellules cancéreuses acquièrent et accumulent des anomalies génomiques qui sont la conséquence directe d'une activation oncogénique et d'une perte des suppresseurs de tumeurs. Cette activation mitogénique des cellules se traduit par une prolifération cellulaire aberrante et la mise en place de mécanismes oncosuppresseurs, comme par exemple la sénescence et l'apoptose par p53. Cette prolifération aberrante et les mécanismes de sauvegarde de la cellule induisent d'importants dommages à l'ADN. En revanche ce type de tumorigenèse n'est pas applicable à toutes les tumeurs. En effet, 26% des cancers Triple Négatifs qui correspondent au sous-type Claudin-Low présentent un faible taux d'instabilité génomique (Morel et al., 2017). Une étude innovante par Morel et collègues a mis en évidence que la réactivation de l'EMT-TF *ZEB1*, en régulant l'expression de l'anti-oxydant *MSRB3* (Méthionine Sulfoxide Reductase B3), permet aux cellules cancéreuses de résister à un stress oxydatif induit par l'activation d'un oncogène et de réduire fortement les dommages à l'ADN. Cette réactivation de *ZEB1* favorise une transformation maligne sur la base d'une faible instabilité génomique (Morel et al., 2017).

Ces différentes données ont permis de mettre en évidence le rôle des EMT-TFs dans l'initiation tumorale mammaire. En revanche, une question reste posée. Le rôle des EMT-TFs dans l'initiation tumorale est-il dépendant de leur fonction d'inducteur de l'EMT ou totalement indépendant de l'EMT ?

b. Rôle de l'EMT dans la progression tumorale mammaire

Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, le développement de métastases et la résistance aux traitements sont les deux principales causes de la progression de leurs maladies. Or diverses études ont montré l'implication de l'EMT dans le développement de ces deux paramètres.

i. Rôle de l'EMT dans le développement et la dissémination des métastases

L'EMT est usuellement proposée comme un des mécanismes favorisant la dissémination métastatique (Kalluri and Weinberg, 2009). En revanche le rôle de l'EMT dans le développement des métastases est encore aujourd'hui contesté car *in vivo*, les métastases présentent un phénotype épithélial (Fischer et al., 2015). La présence du phénotype épithélial dans les métastases pourrait s'expliquer par la mise en place d'une MET qui permettrait aux cellules tumorales disséminatrices de revenir à un état épithélial. Ainsi le modèle proposé de la dissémination métastatique induite par l'EMT est le suivant : la transdifférenciation des cellules épithéliales de la tumeur primaire en cellules mésenchymateuses par le processus d'EMT qui leur permet d'acquérir un pouvoir migratoire et invasif. Ces capacités vont leur permettre

d'entrer dans des vaisseaux sanguins environnant puis de quitter la circulation sanguine à un site distant où les métastases pourraient se développer. Afin de coloniser un second site, les cellules cancéreuses mésenchymateuses subissent une MET pour revenir à un état épithélial (Kalluri and Weinberg, 2009). Ce modèle transitoire et dynamique de l'EMT a été validé dans des modèles murins (Tran et al., 2014; Tsai et al., 2012). Notamment ces deux études ont démontré qu'une expression transitoire des EMT-TFs *TWIST1* et *SNAIL* favorisait le développement de métastases, au contraire d'une expression stable de ces deux facteurs.

Au niveau clinique, plusieurs études avaient pour objectif d'identifier la mise en place de l'EMT au cours du développement de métastases. Pour cela elles ont étudié les CTC (Circulating Tumor Cells). Les CTC correspondent aux cellules tumorales qui ont quitté la tumeur primaire et circulent dans les vaisseaux sanguins, et qui sont fortement susceptibles de générer des métastases (Micalizzi et al., 2017). Dans les cancers du sein métastatiques, une expression des marqueurs de l'EMT, comme les protéines vimentine ou N-Cadhérine, ou des EMT-TFs, comme *TWIST1* a été identifiée dans les CTC (Armstrong et al., 2011; Kallergi et al., 2011). De manière intéressante, Armstrong et collègues ont identifié que 75% des CTC issues de patientes diagnostiquées avec un cancer du sein métastatique, coexprimaient des facteurs épithéliaux (cytokératines) et des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine et vimentine) (Armstrong et al., 2011). Cette étude suggère comme en *in vivo*, que les CTC subissent un changement phénotypique pour passer d'un état épithélial à un état partiellement mésenchymateux et soutient la nécessité d'un changement transitoire impliquant l'EMT lors du développement métastatique. Une étude de Yu et collègues a permis d'identifier un enrichissement de marqueurs mésenchymateux dans les CTC et de démontrer que cet enrichissement est spécifique aux sous-types HER2+ et TN des cancers du sein (Yu et al., 2013). Ces études permettent donc de soutenir le rôle de l'EMT dans le développement métastatique des cancers du sein.

ii. Rôle de l'EMT dans la résistance aux thérapies

Différentes études ont mis en évidence une association entre l'EMT et la résistance aux traitements. Notamment concernant la résistance aux chimiothérapies, diverses études ont montré que des cellules tumorales mammaires résistantes à différentes chimiothérapies comme le paclitaxel, le 5-FU ou la doxorubicine, présentaient des caractéristiques de l'EMT (Li et al., 2009; Lim et al., 2013; Saxena et al., 2011; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2012). La présence des caractéristiques de l'EMT se traduit par l'expression des marqueurs mésenchymateux, la répression des marqueurs épithéliaux et une augmentation du pouvoir invasif et migratoire des cellules tumorales résistantes. Deux études ont montré qu'une inhibition de l'EMT réduit la

résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies, montrant l'importance de l'EMT dans la résistance aux chimiothérapies dans les cancers du sein (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2012). En revanche, ces études n'ont pas identifié de mécanismes moléculaires responsables de ces résistances aux chimiothérapies. Deux mécanismes ont été proposés : une résistance induite par la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire ou l'augmentation de l'expression de plusieurs protéines de transport de type ATP-Binding Cassette qui permettent l'efflux d'un grand nombre de molécules chimiothérapeutiques et à l'origine de l'acquisition d'une résistance à plusieurs thérapies (Li et al., 2009; Saxena et al., 2011).

De plus ce phénotype de résistance associé à l'EMT a également été observé dans d'autres types de thérapies. En effet, deux études ont montré que des cellules tumorales mammaires résistantes au tamoxifène (hormonothérapie) et au trastuzumab (thérapie ciblée) présentaient un phénotype de l'EMT (Hiscox et al., 2006; Wu et al., 2012).

Ces différentes études ont permis de mettre en évidence un rôle potentiel de l'EMT dans la résistance aux différents types de traitements du cancer du sein. De plus, ces travaux émettent la possibilité que cibler les marqueurs de l'EMT en combinaison aux traitements traditionnels des cancers du sein permettrait de réduire une potentielle résistance à ces traitements. Il est aujourd'hui nécessaire de valider le rôle de l'EMT dans la résistance *in vivo*, c'est-à-dire à l'aide d'échantillons tumoraux.

c. Rôle de l'EMT dans l'acquisition de propriétés souches

Les cellules souches cancéreuses (ou CSC, Cancer Stem Cells) présentent deux caractéristiques : la capacité d'auto-renouvellement et l'habileté à régénérer le phénotype de la tumeur primaire (May et al., 2011). Ces cellules sont impliquées à la fois dans l'initiation tumorale, les CSC ont d'ailleurs une deuxième appellation « TIC » (Tumour Initiating Cells), et dans la progression de la maladie en favorisant le développement de métastases et la résistance aux thérapies (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007; Shibue and Weinberg, 2017). Les marqueurs les plus utilisés pour identifier les CSC mammaires sont les récepteurs de surface CD24^{low} (faible expression de CD24) et CD44^{high} (forte expression CD44), ou encore l'expression d'ALDH1 (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007). Plusieurs études ont permis d'établir un lien entre EMT et CSC dans l'initiation et la progression tumorale.

i. *EMT et propriétés souches dans l'initiation tumorale mammaire*

Une étude innovante réalisée par Mani et collègues a permis de mettre en évidence que l'induction de l'EMT dans des HMEC immortalisées générait des cellules avec des propriétés

souches (cellules CD24^{low}/CD44^{high} et la capacité d'auto-renouvellement) (Mani et al., 2008). Ces cellules suite à l'induction de l'expression des EMT-TFs *SNAIL* ou *TWIST1* présentaient un phénotype mésenchymateux. De plus, une surexpression constitutive de *SNAIL* ou *TWIST1* dans des HMEC immortalisées avec activation de *RAS* induit un enrichissement en cellules avec des propriétés souches et le développement plus efficace de tumeurs xéno greffées dans des modèles murins par rapport aux mêmes cellules HMEC-RAS sans expression d'EMT-TFs. Ainsi l'induction de l'EMT favorise un enrichissement en CSC. Une autre étude a montré qu'il existait un lien direct entre EMT et acquisition de propriétés souches (Morel et al., 2008). Notamment l'induction de l'EMT par le TGFβ dans des cellules CD24^{high}/CD44^{low} avec un phénotype épithélial induit la génération de cellules CD24^{low}/CD44^{high} avec un phénotype mésenchymateux.

ii. EMT et propriétés souches dans la progression tumorale mammaire

Liu et collègues ont caractérisé deux types cellulaires issus de tumeurs mammaires primaires et présentant des propriétés souches: les cellules ALDH1+ et les cellules CD24^{low}/CD44^{high} (Liu et al., 2014). Les cellules ALDH1+ présentent un phénotype épithélial avec un pouvoir prolifératif élevé et sont localisées au centre de la tumeur. Les cellules CD24^{low}/CD44^{high} présentent un phénotype mésenchymateux avec un pouvoir invasif élevé et un pouvoir prolifératif faible, localisées à la périphérie de la tumeur. A l'aide de lignées cellulaires, ils ont pu mettre en évidence une plasticité des cellules souches. En effet, ils ont observé que les cellules ALDH1+ avec un phénotype épithélial pouvait se convertir en cellules CD24^{low}/CD44^{high}, et inversement. Cette plasticité des cellules pouvant effectuer une EMT/MET peut jouer un rôle crucial dans la formation de métastases.

L'EMT et les propriétés souches pourraient être impliquées dans le développement métastatique et la résistance aux traitements. En effet, Aktas et collègues ont observé un enrichissement des marqueurs de l'EMT et des marqueurs souches (ALDH1) dans les CTC de patientes diagnostiquées avec un cancer du sein métastatique et résistantes aux traitements administrés (Aktas et al., 2009). Un autre groupe a mis en évidence que les cellules tumorales mammaires restantes après un traitement hormonal ou chimiothérapeutique étaient enrichies en une sous-population présentant des propriétés souches (CD24^{low}/CD44^{high} et capacité d'auto-renouvellement) et des caractéristiques mésenchymateuses (Creighton et al., 2009).

3. Mécanismes moléculaires à l'origine de la reprogrammation génique au cours de l'EMT

Les mécanismes qui permettent une reprogrammation de l'expression génique au cours de l'EMT sont aujourd'hui bien étudiés, le plus connu étant la reprogrammation transcriptionnelle induite par les facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TFs). Aujourd'hui, d'autres mécanismes émergent comme l'épigénétique ou la traduction. Dans cette partie, les mécanismes induisant l'EMT au niveau physiologique seront décrits car ils correspondent aux mêmes mécanismes dérégulés lors de la tumorigenèse. Dans cette partie, la reprogrammation génique induite par différentes voies de signalisation, ainsi que les régulations transcriptionnelles, épigénétiques et traductionnelles activatrices de l'EMT seront décrites. Il faut savoir que dans les cancers, le microenvironnement de la tumeur est impliqué dans l'induction de l'EMT (Dongre and Weinberg, 2019). En effet, les cellules stromales et immunitaires, par des communications paracrines, peuvent induire l'EMT dans les cellules cancéreuses environnantes. Ces régulations ne seront pas décrites ici. Je me focaliserai uniquement sur les mécanismes moléculaires régulant l'expression génique des cellules.

a. Les voies de signalisation activatrices de l'EMT

L'EMT peut être activée par différentes voies de signalisation intracellulaires. Les voies de signalisations qui sont connues pour induire l'EMT, via l'activation des EMT-TF et impliquées dans la tumorigenèse mammaire, seront décrites brièvement (Dongre and Weinberg, 2019; Wu et al., 2016). Ces voies de signalisation sont les voies du TGF β , WNT/ β -Caténine et NOTCH (Figure 10).

i. La voie du TGF β

La voie du TGF β est la voie de signalisation intracellulaire inductrice de l'EMT la plus connue (Dongre and Weinberg, 2019; Lamouille et al., 2014; Wu et al., 2016). La fixation des ligands TGF β s aux récepteurs TGF β de type 1 et de type 2 (TGF β R1 et TGF β R2) induit une phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3 qui vont ensuite former un complexe avec SMAD4. La translocation du complexe trimérique SMADs du cytoplasme au noyau va permettre d'activer l'expression de gènes mésenchymateux (*vimentine* et *fibronectine*) et des EMT-TFs (*SNAIL*, *SLUG*, *ZEB1* et *TWIST1*).

Une autre voie, qui implique le TGF β mais indépendamment de SMAD, contribue également à l'activation de l'EMT. L'activation du TGF β va en effet activer d'autres voies de signalisation comme NOTCH, p38/ MAPK, PI3K/AKT ou RHO-like GTPases.

ii. La voie WNT

Il existe deux voies de signalisation de WNT qui activent l'EMT, la voie canonique dépendante de la protéine β -Caténine qui sera présentée ci-dessous, et la voie indépendante de β -Caténine (Dongre and Weinberg, 2019; Wu et al., 2016).

La fixation des ligands de WNT aux récepteurs de la famille des Frizzled permet par différents événements, la stabilisation de β -Caténine et sa translocation dans le noyau. La protéine β -Caténine forme ensuite un complexe transcriptionnel avec TCF (T-cell-specific transcription factor) et LEF (Lymphoid enhancer-binding factor) pour activer l'expression des EMT-TFs (*SLUG*, *ZEB1* et *TWIST1*).

iii. La voie NOTCH

La voie NOTCH est activée par la fixation des ligands de la famille des Delta-like et Jagged aux récepteurs NOTCH (NOTCH1 à NOTCH4) (Dongre and Weinberg, 2019; Lamouille et al., 2014; Wu et al., 2016). Cette fixation des ligands induit un clivage des récepteurs NOTCH afin de libérer le domaine intracellulaire de NOTCH. Ce domaine intracellulaire va migrer au noyau pour se lier à des facteurs transcriptionnels pour activer l'expression des EMT-TFs *SLUG* et *SNAIL*.

b. Induction d'une reprogrammation génique par une régulation transcriptionnelle et épigénétique.

Il est aujourd'hui connu qu'une reprogrammation de l'expression génique a lieu lors de la transdifférentiation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Cette reprogrammation génique inclue une régulation transcriptionnelle et une régulation épigénétique.

i. Régulation transcriptionnelle au cours de l'EMT

Le changement d'expression permettant la perte d'un phénotype épithélial et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux est majoritairement orchestré par les EMT-TFs. Aujourd'hui beaucoup d'EMT-TFs ont été identifiés comme FOXC2 ou KLF8, en revanche seuls les EMT-TFs les plus connus et considérés comme des « master regulators » de l'EMT seront décrits dans cette section (Puisieux et al., 2014; Zheng and Kang, 2014).

Ces EMT-TF sont les facteurs de transcription soit à doigt de zinc, comme les familles SNAIL (*SNAI1/SNAIL* et *SNAI2/SLUG*) et ZEB (*ZEB1* et *ZEB2*), ou bHLH (basic Helix-Loop-Helix) comme la famille TWIST (*TWIST1* et *TWIST2*). Ces facteurs sont majoritairement classifiés comme EMT-TFs car ils ont la capacité de réprimer directement ou indirectement le gène *CDH1* qui code pour l'E-Cadhérine, la protéine considérée comme la « gardienne » des

caractéristiques épithéliales. Certains EMT-TFs répriment directement l'E-Cadhérine en se fixant sur des séquences nucléotidiques de type E-box présentes sur le promoteur de *CDHI*. Ces EMT-TF sont les facteurs de la famille SNAIL et ZEB (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Comijn et al., 2001; Hajra et al., 2002; Vandewalle et al., 2005). En revanche pour TWIST1, une étude a montré que ce facteur réprime *CDHI*, bien qu'aucune étude n'ait démontré une interaction directe avec le promoteur de *CDHI* (Yang et al., 2004). Ces EMT-TFs ne régulent pas seulement l'expression de la protéine E-Cadhérine, mais répriment aussi l'expression d'autres facteurs épithéliaux, impliqués dans la polarité cellulaire, les jonctions serrées et les desmosomes, tout en activant l'expression des facteurs mésenchymateux, comme les protéines *vimentine*, *N-Cadhérine* ou *MMPs* (Aigner et al., 2007; De Craene et al., 2005; Moreno-Bueno et al., 2006; Spaderna et al., 2008; Yang et al., 2004). Afin de maintenir le programme transcriptionnel au cours de la dynamique transition de l'EMT, les EMT-TFs sont capables de se réguler entre eux, citons par exemple la coopération de TWIST1 et SNAIL pour activer l'expression de *ZEB1* (Dave et al., 2011).

ii. Régulation épigénétique au cours de l'EMT

En plus d'une régulation transcriptionnelle, une régulation épigénétique et traductionnelle au cours de l'EMT sont nécessaires pour induire une reprogrammation profonde de l'expression génique permettant la plasticité cellulaire durant ce processus. Les EMT-TFs peuvent coopérer avec des régulateurs épigénétiques pour réguler l'EMT (Tam and Weinberg, 2013a). Beaucoup d'études ont permis de mieux comprendre les mécanismes de répression de *CDHI* par les EMT-TFs. Par exemple, une fois fixé au niveau du promoteur de *CDHI*, SNAIL interagit avec deux protéines EZH2 et SUZ12 au sein du complexe PRC2 (multisubunit Polycomb Repressive Complex 2), pour réprimer *CDHI*. Le complexe PRC2 inhibe la transcription de *CDHI* par induction d'une tri-méthylation de l'histone H3-K27 (Herranz et al., 2008). TWIST1 réprime également *CDHI* en activant l'expression de *BMII*, une sous-unité de PRC1 afin d'induire l'EMT (Yang et al., 2010). D'autres mécanismes de régulation épigénétique de l'EMT ont été identifiés, impliquant la désacétylation des histones via HDAC et ou la déméthylation des histones. En effet le complexe NuRD (Mi-2-Nucleosome Remodeling and Deacetylase) est recruté par SNAIL, au niveau du domaine SNAG en N-terminal, ou TWIST1 pour réprimer *CDHI* et d'autres facteurs épithéliaux (Fu et al., 2011; Peinado et al., 2004). Une autre étude a montré que SNAIL peut également recruter au niveau du domaine SNAG, une histone déméthylase LSD1 (Lysine Specific Demethylase) pour inhiber l'expression de différents marqueurs épithéliaux (Lin et al., 2010).

Les miARNs sont de puissants régulateurs de l'EMT, notamment en régulant les EMT-TFs. Par exemple la famille des miR-200 est connue pour réguler l'EMT en réprimant l'expression de ZEB1 et ZEB2. De plus, ces miARNs peuvent être régulés épigénétiquement. En effet, dans un modèle cellulaire HMEC dont l'EMT est induite par le TGF β , l'expression de *SIRT1*, une histone désacétylase, réprime le promoteur de *miR-200* par le biais d'une désacétylation d'histones permettant ainsi le maintien de l'EMT (Eades et al., 2011). De plus, une étude d'Iliopoulos et collègues a montré qu'une inhibition de l'expression de miR-200 augmentait l'expression de *SUZ12* et induisait une répression de *CDHI* par le biais de PRC2 (Iliopoulos et al., 2010).

c. Induction d'une reprogrammation génique par une régulation traductionnelle au cours de l'EMT

Le contrôle de la traduction est aujourd'hui un mécanisme d'induction de l'EMT qui commence à émerger. Cet intérêt pour la traduction a été mis en avant par l'étude de Jechlinger et collègues (Jechlinger et al., 2003). En effet, les auteurs ont quantifié l'expression génique en utilisant une puce à ADN à partir des ARNm liés aux polysomes (les ARNm en cours de traduction) et de l'ARNm total entre les cellules épithéliales murines (EpRas) avant et après induction de l'EMT par le TGF β (EpRasXT). Les auteurs ont montré que 15% des ARNm transcrits étaient régulés seulement au niveau traductionnel dans l'EMT, montrant l'importance d'un contrôle traductionnel dans l'EMT. Aujourd'hui plusieurs études ont montré qu'une régulation traductionnelle via des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction et des RBP contribuait à l'induction de l'EMT (Figure 11).

i. Régulation traductionnelle par les miARNs

Les miARNs jouent un rôle très important dans la régulation de l'EMT (Craene and Berx, 2013; Lamouille et al., 2014). L'EMT peut être régulé par les miARNs en contrôlant l'expression soit des EMT-TF, soit des facteurs épithéliaux ou mésenchymateux par trois mécanismes : une régulation épigénétique comme décrit précédemment (cf. paragraphe « Régulation épigénétique au cours de l'EMT ») ; une dégradation des ARNm cibles ; ou une inhibition de la traduction de ces ARNm. Les miARNs sont souvent connus comme inhibiteur de l'expression par dégradation de l'ARNm. Mais de nombreuses études ont montré que les miARNs répriment la traduction au niveau de l'élongation, et au niveau l'initiation de la traduction, potentiellement, en interférant avec le complexe eIF4F (Fabian et al., 2010; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Maroney et al., 2006; Mathonnet et al., 2007; Thermann and Hentze, 2007). Une étude a également montré que miR-430 dans les embryons de poissons

zèbres réprime l'expression génique par inhibition de l'initiation de la traduction avant d'induire la dégradation des ARNm (Bazzini et al., 2012).

Les miARNs qui ciblent les EMT-TFs sont aujourd'hui les plus étudiés et connus. Par exemple, une étude par Gregory et collègues a montré que les miARNs de la famille des miR-200 et le miR-205 régulent l'expression de *ZEB1* et *ZEB2* et permettent la mise en place d'une MET (Gregory et al., 2008). Ces deux EMT-TF présentent au niveau de leur 3'UTR des séquences complémentaires aux miARNs de la famille des miR-200 : miR-200a et miR-200b et le miR-205. En revanche le mécanisme de répression de *ZEB1* et *ZEB2* par ces miARN n'a pas été mis en évidence. Etant donné le rôle émergent des miARNs dans le contrôle traductionnel on pourrait supposer que ce mécanisme passe par une inhibition de la traduction de *ZEB1* et *ZEB2*.

ii. Régulation traductionnelle par des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction

Parmi les facteurs canoniques de la traduction, eIF4E et eIF3 ont été identifiés comme des facteurs impliqués dans l'EMT. Robichaud et collègues ont montré que le TGF β activait la voie p38/MAPK favorisant la phosphorylation d'eIF4E qui favorise la traduction de l'EMT-TF *SNAIL* et du facteur mésenchymateux *MMP3* induisant ainsi une EMT (Robichaud et al., 2015). Plusieurs études ont déterminé une implication des différentes sous-unités du complexe eIF3 dans l'EMT. Notamment la diminution de l'expression de la sous-unité *eIF3e* induit une EMT dans les cellule épithéliales du poumon, les cellules A549, et dans les cellules mammaires immortalisées, les cellules MCF10A (Desnoyers et al., 2015; Gillis and Lewis, 2013). Par des analyses de profils de polysomes, les deux études ont montré qu'une diminution de l'expression d'*eIF3e* réduisait la synthèse globale protéique. Malgré cette diminution de la synthèse protéique globale, ils ont observé que certains ARNm continuaient à être traduits notamment les ARNm codant *SNAIL* et *ZEB2* pour le modèle mammaire et *SNAIL*, *ZEB2* et *vimentine* pour le modèle pulmonaire. Les auteurs suggèrent que la traduction spécifique de ces ARNm contribuerait à l'induction de l'EMT et notamment selon Desnoyers et collègues par un mécanisme de traduction dépendante des IRES (Desnoyers et al., 2015). Desnoyers et collègues ont identifié la présence de structures IRES dans les ARNm *SNAIL*, *ZEB2* et *vimentine*. En revanche ils n'ont pas déterminé si la diminution de l'expression d'*eIF3e* augmentait la traduction de manière IRES dépendante de ces trois ARNm. Une autre étude a permis de mettre évidence que la diminution de l'expression d'une autre sous-unité du complexe eIF3, *eIF3i* favorise l'EMT dans les cellules A549 (Perez et al., 2011). En revanche une étude a montré que la surexpression de la sous-unité *eIF3a*, induisait une EMT (Guo et al., 2017). Ces études

suggèrent que selon la sous-unité du complexe eIF3, celui-ci peut induire une EMT ou une MET. Cette différence de rôle des sous-unités du complexe eIF3 dans l'EMT pourrait s'expliquer par l'utilisation des modèles cellulaires. En effet, Guo et collègues ont utilisé des cellules épithéliales de rat tandis que les trois autres études ont utilisés des lignées cellulaires humaines. Ainsi, pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester l'impact d'une surexpression ou d'une sous-expression d'*eIF3a* sur l'EMT dans des lignées épithéliales humaines.

iii. Régulation traductionnelle par des RBP

Plusieurs études ont montré que des RBP interagissant avec différents éléments structuraux et séquences spécifiques, comme les IRES, les éléments BAT (TGF β Activated Translational) ou GRE (Guanine-Rich Element), pour réguler la traduction spécifique d'ARNm impliqués dans l'EMT.

LA est une protéine nucléaire qui une fois dans le cytoplasme, favorise la traduction IRES-dépendante du marqueur mésenchymateux *LamB1* (Petz et al., 2012a, 2012b). LamB1 est en effet, une protéine de la matrice extracellulaire qui régule la migration et la prolifération cellulaire. Un autre exemple est la protéine YB-1 (Y-box binding protein-1), qui induit l'EMT dans les cellules mammaires MCF10A présentant une activation de l'oncogène *Ras* (Evdokimova et al., 2009; Mouneimne and Brugge, 2009). YB-1, qui est un inhibiteur de la traduction coiffe dépendante, augmente la traduction de *SNAIL* via une structure IRES présente dans la région 5'UTR de *SNAIL*.

Chaudhury et collègues ont identifié deux mécanismes de régulation traductionnel impliquant des éléments situés en 3' UTR des ARNm qui favorisent l'induction de l'EMT. Ils ont montré que dans des cellules MCF10A, la protéine CELF1 augmente la traduction de plusieurs gènes comme *SNAIL1* et *JUNB*, et induit une EMT de manière indépendante du TGF β (Chaudhury et al., 2016). Ces gènes présentent une séquence particulière au niveau de leur 3'UTR qui correspond à l'élément GRE. Dans une seconde étude, Chaudhury et collègues ont mis en évidence une régulation traductionnelle dépendante du TGF β de deux facteurs qui induisent l'EMT, *DAB2* et *ILEI* (Chaudhury et al., 2010). En effet, le TGF β lève l'inhibition traductionnelle de *DAB2* et *ILEI* induite par la fixation de la RBP hnRNP E1 (heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein E1) sur les éléments BAT de ces deux gènes. Le TGF β induit l'activation de la protéine Akt2 qui phosphoryle hnRNP E1 et induit le détachement d'hnRNP E1 des éléments BAT.

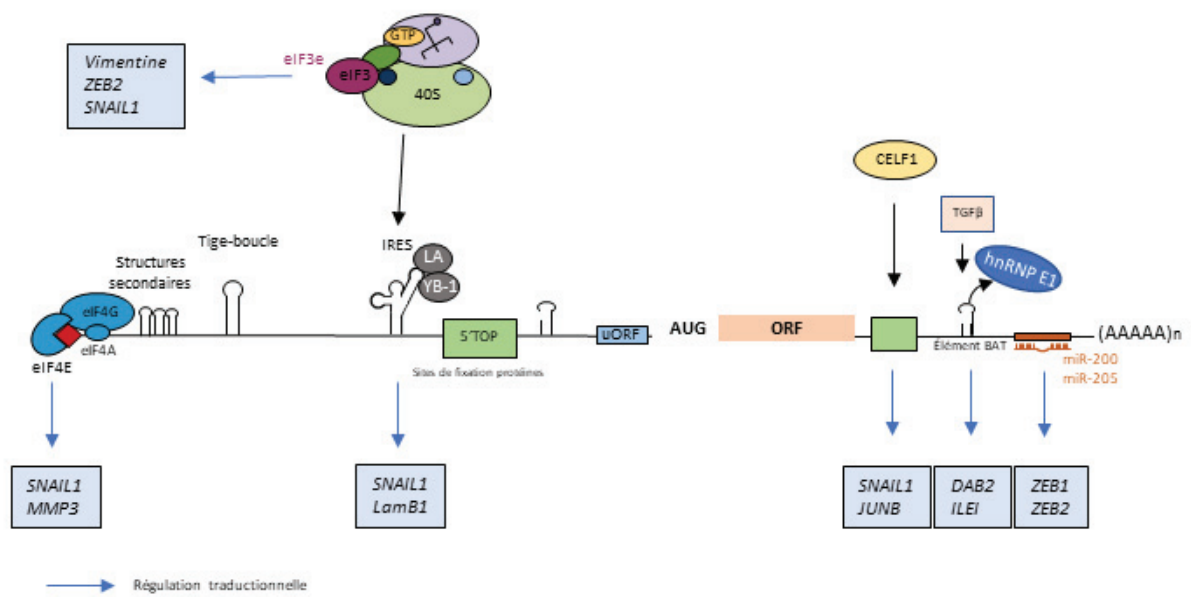


Figure 11. Le contrôle traductionnel au cours de l'EMT

Différents mécanismes qui contrôlent la traduction de certains ARNm sont impliqués dans l'EMT : une régulation par des facteurs canoniques de l'initiation de la traduction (eIF4E, eIF3e) ; une régulation impliquant les structures secondaires (IRES et élément BAT) et des sites de fixation aux RBP (CELF1) ou aux miARNs. Les boîtes bleues indiquent les gènes dont la traduction est dérégulée au cours de l'EMT.

L'EMT est donc un processus complexe qui permet aux cellules cancéreuses mammaires d'acquérir de nombreuses caractéristiques comme la résistance aux mécanismes de sauvegarde induite par l'activation d'oncogènes ou l'acquisition de propriétés souches. Malgré la complexité de l'EMT, il est aujourd'hui connu que l'EMT est gouvernée par une reprogrammation transcriptionnelle et épigénétique en condition physiologique ou durant la tumorigenèse. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression génique survenant au cours de l'EMT permettrait de mieux comprendre son rôle dans la tumorigenèse mammaire et donc de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans les cancers du sein dépendants de l'EMT.

Quelques études ont montré que la régulation traductionnelle participerait à l'induction de l'EMT mais il reste encore beaucoup à explorer. On peut se demander quelle est la place de la traduction dans la reprogrammation génique survenant au cours de l'EMT. De plus, quelques études ont montré qu'une augmentation de la traduction d'ARNm contenant des IRES et codant des EMT-TF favorisaient l'EMT. Or il est aujourd'hui connu que parmi les effecteurs de la traduction, les ribosomes présentent des variations de composition qui favorisent la traduction dépendante des IRES. Actuellement le rôle du ribosome dans l'EMT est encore inexploré. Une

variation de la composition du ribosome pourrait-il avoir un impact dans la reprogrammation traductionnelle lors de l'EMT ?

HYPOTHESES & OBJECTIFS

Les cancers du sein représentent la première cause de mortalité induite par un cancer chez la femme dans le monde. Le cancer du sein est une maladie très hétérogène dont le pronostic des patientes repose majoritairement sur la classification des tumeurs. En effet, chaque sous-type présente des caractéristiques cliniques distinctes, des survies différentes et nécessite une prise en charge spécifique. Une meilleure caractérisation des cancers du sein permettra d'identifier de nouvelles voies de signalisation ayant un impact majeur dans la tumorigenèse mammaire. Ces nouvelles voies de signalisation permettront d'identifier (1) de potentiels biomarqueurs cliniques ; et (2) de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes. Les ribosomes ont été longtemps considérés comme de simples effecteurs de la traduction. Or il émerge que les ribosomes présentent un rôle majeur en tant que régulateurs de la traduction. En effet, une variation de la composition des ribosomes à la fois au niveau des ARNr et des protéines ribosomiques altérerait leur activité pour favoriser la traduction d'un groupe d'ARNm. Dans notre équipe, nous avons démontré qu'une variation de la méthylation en 2'-O des riboses des ARNr favorise la traduction de certains ARNm contenant des structures IRES, et qui codent pour des oncoprotéines comme *IGF1R* ou *C-MYC* (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013).

Les ribosomes pourraient s'avérer être une nouvelle voie impliquée dans la tumorigenèse mammaire. Notre hypothèse est que des altérations de composition des ribosomes surviennent dans les cancers du sein pour favoriser la traduction d'ARNm impliqués dans la tumorigenèse mammaire. De tels ribosomes de composition particulière pourraient correspondre à de nouvelles sources de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques pour améliorer la prise en charge de patientes atteintes de cancers du sein. Pour cela il convenait de démontrer l'existence d'altérations de composition des ribosomes dans les cancers du sein. Au cours de ma thèse j'ai développé deux axes pour atteindre cet objectif :

1. Identifier les altérations d'expression des facteurs de la biogenèse des ribosomes induisant des altérations de la production et de la composition des ribosomes dans les tumeurs mammaires et déterminer leurs valeurs pronostiques ;
2. Identifier les altérations de composition des ribosomes, de mêmes que les altérations de traduction survenant dans un modèle cellulaire de l'EMT.

RESULTATS

I. Article 1 : Dual association of the 2'-O-ribose methyltransferase FBL expression with poor prognosis in early breast cancers reveals that reduction of FBL contributes to spontaneous tumorigenesis

Dual association of the 2'-O-ribose methyltransferase FBL expression with poor prognosis in early breast cancers reveals that reduction of FBL contributes to spontaneous tumorigenesis. Flora Nguyen Van Long, Audrey Lardy-Cleaud, Dimitri Carène, Caroline Rossoni, Frédéric Catez, Agathe Dolbeau, Marjorie Martin, Paul Rollet, Nathalie Pion, Déborah Monchiet, Valentin Simioni, Susan Bray, Doris Le Beherec, Ibrahim Bouakka, Amélie Colombe Vermorel, Laetitia Odeyer, Emilie Lavergne, Alexandra Diot, Lee B. Jordan, Alastair M. Thompson, Françoise Jamen, Thierry Dubois, Sylvie Chabaud, Stefan Michiels, Isabelle Treilleux, Jean-Christophe Bourdon, David Perol, Alain Puisieux, Fabrice André, Jean-Jacques Diaz, Virginie Marcel. **En préparation.**

1. Contexte

De récentes études ont permis de mettre en évidence que des altérations de la composition des ribosomes pourraient jouer un rôle important dans la tumorigenèse (Kampen et al., 2019; Marcel et al., 2015; Yoon et al., 2006). Notre équipe a notamment démontré pour la première fois dans des cellules cancéreuses mammaire, l'existence de ribosomes qui présentaient une variation du profil de méthylation de 2'-O-Me (Marcel et al., 2013). Cette variation de composition était induite par la surexpression de la méthyltransférase *fibrillarine* (*FBL*) via l'inactivation de *tp53*. L'activité de traduction de ces ribosomes différents était altérée et favorisait la traduction d'ARNm contenant des séquences IRES et impliqués dans la tumorigenèse comme *c-Myc*, *IGF1R* ou *VEGF* (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2015). Ainsi, ces études suggèrent l'existence de ribosomes qui présentent une composition particulière basée sur une variation du profil de 2'-O-Me, dans les cancers du sein. En revanche, ces ribosomes de composition différente ont toujours été identifiés dans des modèles cellulaires. Pour démontrer l'existence de ribosomes hétérogènes, il est nécessaire aujourd'hui de les identifier directement dans des tumeurs humaines.

L'objectif de ce projet était d'identifier des altérations de composition des ribosomes survenant au niveau des 2'-O-Me des ARNr dans des tumeurs mammaires. Etant donné que les techniques pour quantifier le taux de 2'-O-Me des ARNr comme le RiboMethSeq n'étaient pas encore disponibles au début de ma thèse, nous avons utilisé *FBL* comme substitut de la variation de la 2'-O-Me des ARNr. En effet, *FBL* est l'enzyme qui catalyse la réaction de 2'-O-Me et la

variation de l'expression de *FBL* est corrélée à la variation du profil de 2'-O-Me des ARNr (Érales et al., 2017; Marcel et al., 2013). Ainsi pour démontrer l'existence d'altérations de composition des ribosomes au niveau de la 2'-O-Me des ARNr dans les tumeurs mammaires, nous nous sommes concentrés sur *FBL* et avons déterminé si :

- l'expression de *FBL* au niveau ARNm et protéique était altérée dans les tumeurs mammaires
- les altérations d'expression de *FBL* sont associées à des caractéristiques cliniques particulières.

Dans ce projet, j'ai mis au point la technique de qPCR moyen-débit (Fluidigm) qui a été utilisée pour quantifier l'expression des facteurs d'intérêts, mais aussi la méthode de classification du marquage *FBL* en immunohistochimie (IHC) sur la cohorte de 434 tumeurs du CLB (Centre Léon Bérard). J'ai généré et interprété les différentes données provenant des analyses des 3500 tumeurs mammaires. Dans le cadre ce projet, j'ai eu l'opportunité de superviser Paul Rollet, un étudiant en Master 1 de l'école de l'INSERM qui a permis de quantifier et analyser les données d'expression générées pour une cohorte du CLB de 40 échantillons. J'ai également encadré Nathalie Pion, technicienne de l'équipe, pour la double lecture des TMA (Tissue MicroArrays), l'extraction des ARN totaux ainsi que la génération des données d'expression de la série de tumeurs mammaires provenant de l'IGR (Institut Gustave Roussy). J'ai suivi et participé aux prises de décision concernant les analyses statistiques effectuées par les collaborateurs biostatisticiens. Et j'ai également participé à la prise en charge et suivi des poissons zèbres pour déterminer le rôle de *FBL* dans la tumorigenèse *in vivo*. Enfin, j'ai été responsable du montage des figures de ce manuscrit.

2. Manuscrit en préparation

Dual association of the 2'-O-ribose methyltransferase *FBL* expression with poor prognosis in early breast cancers reveals that reduction of *FBL* contributes to spontaneous tumorigenesis

Flora Nguyen Van Long¹, Audrey Lardy-Cleaud², Dimitri Carène^{3,4}, Caroline Rossoni⁴, Frédéric Catez¹, Agathe Dolbeau¹, Marjorie Martin¹, Paul Rollet¹, Nathalie Pion¹, Déborah Monchiet¹, Valentin Simioni¹, Susan Bray⁵, Doris Le Beherec⁶, Ibrahim Bouakka³, Amélie Colombe-Vermorel⁷, Laetitia Odeyer⁷, Emilie Lavergne², Alexandra Diot⁸, Lee B. Jordan⁹, Alastair M. Thompson^{8,10}, Françoise Jamen¹¹, Thierry Dubois¹², Sylvie Chabaud², Stefan Michiels⁴, Isabelle Treilleux⁶, Jean-Christophe Bourdon⁸, David Pérol², Alain Puisieux¹, Fabrice André³, Jean-Jacques Diaz^{1,*} and Virginie Marcel^{1,*}

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Léon Bérard Cancer Centre, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69373 cedex 08, France

² Department of Clinical Research, Léon Bérard Cancer Centre, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France

³ Predictive biomarkers and novel therapeutic strategies Group, Institut Gustave Roussy, University of Paris Sud, INSERM 981, 114 rue Edouard Vaillant, 94800, Villejuif, France

⁴ Department of Biostatistics and Epidemiology, Institut Gustave Roussy, 94800, Villejuif, France

⁵ Tayside Tissue Bank, Ninewells Hospital and Medical School, NHS Tayside, Dundee, Scotland, DD1 9SY, UK

⁶ Department Translational Research, Institut Gustave Roussy, 94800, Villejuif, France

⁷ Department of Translational Research and Innovation, Léon Bérard Cancer Centre, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France

⁸ Division of Cancer Research, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Scotland DD1 9SY, United Kingdom

⁹ Department of Pathology, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Scotland DD1 9SY, United Kingdom

¹⁰ Olga Keith Wiess Chair of Surgery, Dan L. Duncan Breast Center, Division of Surgical Oncology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

¹¹ Université Paris-Saclay, Equipe MHAPS, Laboratoire CIAMS - EA 4532, 91405 Orsay Cedex, France

¹² Breast Cancer Biology Group, Translational Research Department, PSL Research University, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

* Co-senior and corresponding authors:

Virginie Marcel: virginie.marcel@lyon.unicancer.fr

Jean-Jacques Diaz: jean-jacques.diaz@lyon.unicancer.fr

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Cheney A, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08

Keywords: fibrillarin, ribosome, prognostic marker, early breast cancer, rRNA, ribosome, zebrafish

Abstract

Screening programs reduced mortality of breast cancer patients by improving the detection of breast cancer at early stage. However, it remains crucial to identify patients at low-risk of recurrence to avoid deleterious effect of adjuvant chemotherapies in such early diagnosed patients. Recent advances in the ribosome biogenesis field suggest that ribosome/translation pathway could be an innovative source of prognostic markers. Among ribosome biogenesis factors, fibrillarin (*FBL*) has pivotal roles in key steps of ribosome biogenesis and has been shown to be altered in breast cancers. Using a series of 3,500 non-metastatic primary breast tumors, we showed that *FBL* is an independent marker of poor outcome both at mRNA and protein levels even when compared to current clinical gold-standard such as tumor size, lymph node invasion and breast cancer subtypes. Interestingly, not only overexpression of *FBL*, but also underexpression of *FBL*, was associated with poor survivals. These two types of related *FBL* breast tumors associated with poor outcome showed different characteristics, including differential amount of ribosomes. Using zebrafish *in vivo* model, we demonstrated that in contrast to what expected, reduction of *FBL* expression contributes to spontaneous tumorigenesis. Altogether, our study identified *FBL* as a strong marker of breast cancer outcome but also demonstrated for the first time that reduction of *FBL*, and thus of ribosome biogenesis, plays a key role in breast cancer.

Introduction

Although impressive progresses have been made over the past 15 years, breast cancer still remains the most frequent cancer in women worldwide with about 2 million diagnosed cases in 2018 (*Globocan 2018, OMS*). Breast cancer-related death is intimately linked to the nature of the tumor since this heterogeneous disease encompasses several subtypes with distinct phenotypes, responses to therapy and thus clinical outcomes¹. The main strategy used for breast cancer patients' management relies on the identification at diagnosis of breast cancer subtypes and characteristics, in particular tumor size and lymph node invasion, to provide a therapeutic treatment specifically adapted to the tumor. Nevertheless 15-20% of breast patients are still dying from their disease. One important issue in the field remains the identification of prognostic and predictive markers to allow de-escalade of therapies in early breast cancer². Indeed, thanks to screening programs allowing early detection, breast cancer mortality have been reduced by 20% in the invited population². However in this population, patients who are at low-risk for recurrence derive only a small absolute benefit from adjuvant chemotherapies, which may be outweighed by long-term toxicities. Identification of innovative biomarkers in such population would allow the delivering of optimal treatments.

Early breast cancer patients could directly benefit from the emerging concepts in the field of ribosome biogenesis. Several studies have reported that increased protein synthesis induced by hyperactivation of ribosome biogenesis contributes to tumorigenesis by sustaining the hyperproliferative rate of cancer cells^{3,4}. The addiction of cancer cells to ribosome biogenesis hyperactivation is clearly illustrated by the numerous molecules specifically targeting the ribosome production that have been developed in the last few years as anti-cancer treatment⁴⁻⁶. Indeed, it has recently been shown that targeting ribosome biogenesis specifically kills cancer cells without affecting healthy ones^{7,8}. Moreover, recent study unravels that oxaliplatin sensitivity, conversely to other platinum-derived compounds, is strongly correlated with higher expression of components from the translation machinery, including in breast cancer, sustaining the importance of ribosome biogenesis in tumorigenesis⁹. Hyperactivation of ribosome biogenesis has been known as a relevant marker of cancer cells for a long time¹⁰. AgNOR staining, which corresponds to silver staining of nucleolar regions where ribosome biogenesis takes place, has been shown to correlate with neoplastic transformation and cancer aggressiveness, although this marker has never been approved for clinical purpose.

Among the numerous proteins present in the nucleoli, the ribosomal RNA (rRNA) methyltransferase FBL is an abundant one. FBL catalyses the rRNA 2'-O-Me but has also been described as regulator of additional steps of ribosome biogenesis, including rDNA synthesis or pre-rRNA cleavages^{11,12}. It has been reported that *FBL* expression is increased in prostatic neoplasia and during mammary tumorigenesis¹³⁻¹⁵. Moreover, we showed that *FBL*

overexpression in MCF7 breast cancer cell lines promotes cell proliferation, colony formation and doxorubicin resistance¹⁴. We indeed recently reported that alteration of *FBL* expression induces modulation of rRNA 2'-O-Me and directly affects translational activities of ribosomes thus altering the translation of specific mRNAs encoding proteins with oncogenic such as IGF1R or CMYC^{11,14,16}. Here, we deciphered whether *FBL* could be an innovative marker of poor outcome in early breast cancer patients.

Material and Methods

Human breast tumors and healthy donors samples

Six cohorts of breast cancer patients were analysed from five different institutions: Tayside Tissue Bank of Dundee (TTB, Dundee, Scotland, UK), The Cancer Genome Atlas (TCGA, NIH, USA)¹⁷, Centre Léon Bérard (CLB, Lyon, France) and Institut Gustave Roussy (IGR, Villejuif, France) (Supplementary Table S1). For consistency among the six cohorts, all series were composed of women with primary breast cancer patients, no family history, no neoadjuvant treatment and no distant metastasis detected at diagnosis. A seventh series composed of mastectomies derived from healthy donors was provided by Institut Curie (Paris, France) (Supplementary Table S1).

Series 1 consisted of 216 primary breast tumor samples from the Tayside Tissue Bank of Dundee and received approval from the Local Research Ethics Committee of the Tayside Tissue Bank (REC Reference 07/S1402/90)¹⁸. Tumor grades were defined according to the cancer cells proliferation and differentiation status, while tumor stages were determined based on the TNM staging system (T: tumor size; N: number of invaded lymph nodes; and M: presence of metastases) (Supplementary Table S2). Tumors size were designated as “small” when tumor size was < 30 cm whereas “large” tumors corresponded to size ≥ 30 cm. Lymph node invasion status was considered “positive” when at least one invaded lymph node was detected at diagnosis. HER2 receptor status and hormonal receptors status (ER: oestrogen receptor; and PR: progesterone receptor) were determined by immunohistochemistry staining (IHC) on paraffin-embedded tumors. Tumors intrinsic breast cancer subtypes were assessed based on the hormonal and HER2 receptors status. Tumors presenting ER+ PR+/- HER2- status were considered as equivalent to luminal subtype, ER+/- PR+/- HER2+ tumors were equivalent to HER-enriched subtype and ER- PR- HER2- tumors were equivalent to triple-negative breast cancer subtype (TNBC). Total RNA were extracted from 10 mg of tumor tissue as described in a previous study¹⁸.

Series 2 corresponded to a series of 818 samples obtained from the TCGA Breast Invasive Carcinoma project of the public database cBioPortal (<http://cbioportal.org>)¹⁷. Normalized z-

Score mRNA expression (RNA Seq V2 RSEM) was downloaded. Of note, 157 patients that were not women, having family history or metastasis at diagnostic, were excluded of the analysis resulting of a total of 661 patients analysed for this cohort (Supplementary Table S2). For consistency between the different cohorts, breast cancer intrinsic subtypes were assigned using ER, PR and HER2 status and lymph node invasion status was determined using Dundee criteria.

Series 3 issued from Centre Léon Bérard encompassed 434 formalin-fixed and paraffin-embedded primary tumors that were assembled in triplicates into tissue microarrays (TMA) blocks (Supplementary Table S9). Tumor grade was assessed using the Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading system which is based on three morphologic features, the cancer cell mitotic activity, nuclear polymorphism and differentiation. Same characteristics as Dundee Series were used to define the tumor size and lymph node invasion status. Hormonal receptors status was determined using IHC and HER2 receptor by both IHC and fluorescence *in situ* hybridization assay. Intrinsic breast cancer subtypes were determined using ER, PR and HER2 status and SBR grade: luminal A subtype corresponded to ER+ PR+/- HER2- tumors with SBR grade 1-2; luminal B to ER+ PR+/- HER2- tumors with SBR grade 2-3 or ER+ PR+/- HER2+ tumors; HER2-enriched subtype to ER- PR- HER2+ tumors; and TNBC subtype to ER- PR- HER2- tumors. Series 4 corresponded to total RNA extracted from 40 available frozen biopsies issued from tumors of Series 3 to compare *FBL* mRNA expression and FBL IHC staining. Total RNA extractions were performed by the Biological Resources Center of CLB.

Series 5 consisted of 1759 primary tumors from Institut Gustave Roussy that were either fixed in formalin or in alcohol-formalin-acetic acid (AFA) were included in TMA (Supplementary Table S9). Lymph node invasion status and breast cancer intrinsic subtype were defined using the same criteria as Series 1. Series 6 corresponded to total RNA extracted from 196 available frozen biopsies issued from Institut Gustave Roussy (Supplementary Table S2). Biopsies were ground in TRIzol Reagent (ThermoFisher Scientific) using 2 cycles at 6000 rpm for 30 seconds with the Precellys Evolution homogenizer (Bertin instruments). For complete tissue homogenization another cycle of 10000 rpm for 30 seconds was added for the biggest biopsies. To maintain the temperature at 4°C during biopsies grinding, a Cryolys instrument (Bertin instrument) was associated to the Precellys device. Total RNA extractions were performed following the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). 30 µg of total RNA were purified using RNeasy Mini Kit and DNase treatment was included (Qiagen). Purified-total RNA quality was assessed by loading 250 ng of RNA on a 1% Tris-acetate-EDTA agarose gel (Euromedex) with 0.5 µg/mL Ethidium Bromide (Euromedex).

Series 7 was composed of 11 healthy samples issued from female mammary plastic surgery. Total RNA were extracted and obtained from the Biological Resource Center of Institut Curie as previously described¹⁹. The Bioethic Law No. 2004-800, the French National Institute of

Cancer Ethic Charter and the ethics committee of Institut Curie approved utilisation of this cohort.

Routine statistical analyses using Kaplan Meier curves and univariate Cox regression were performed to verify these breast cancer series corresponded to standard breast cancer population (Supplementary Figures S1, S9 and Tables S3).

RT-qPCR

About 200 ng of total RNAs were reverse transcribed using M-MLV kit (Invitrogen) for Dundee series or using PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara) for CLB, IGR and Institut Curie series according to the manufacturer's instructions.

Medium throughput RT-qPCR was performed using breast cancer series. cDNAs were pre-amplified during a multiplex PCR using primers of the different genes of interest (Supplementary Table 4) and Pre-Amp Master Mix (Fluidigm) followed by an Exonuclease I treatment (New England BioLabs). cDNAs were then diluted at 1:5 in 1X Tris-EDTA buffer (Promega). Gene expression was quantified by medium throughput real-time quantitative PCR using the HD Biomark system (Fluidigm) coupled with Master Mix 2X EvaGreen (BioRad) and either the GE 48.48 Dynamic Array DNA Binding Dye Sample & Assay Loading reagent kit (Fluidigm) for Dundee series or the GE 96.96 Dynamic Array DNA Binding Dye Sample & Assay Loading reagent kit (Fluidigm) for the other RNA series. Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method by the Fluidigm Real-Time PCR Analysis software (v 3.1.3, Fluidigm) and normalized with Xpress Ref Universal Total RNA (Qiagen) as sample control. For Dundee and Institut Curie series 1 and 7, *GAPDH* was used as housekeeping gene while for CLB and IGR series 4 and 6, the Ct value median of five housekeeping genes were used (*β -actin*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PGK1* and *PPIA*). For each sample, two independent RT were performed and qPCR on each cDNA were performed in triplicate, six values being thus used to calculate FC.

Low throughput RT-qPCR was performed using Light Cycler 480 II instrument (Roche) coupled with the Light Cycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) to calibrate primers or quantify *FBL* expression levels in few samples.

FBL immunohistochemistry staining

For CLB series 3, immunohistochemistry staining was performed on 4 microns sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors. The different steps from de-paraffinization and epitope retrieval to immunodetection were performed using the Discovery XT (Roche-Ventana) automate. Slides were counterstained using Hematoxylin Phloxine Saffron solution (Roche) and Bluing (Roche). Slide mounting was done by the Tissue-Tef film (SAKURA Finetek) instrument. FBL antibody (ab5821 lot GR1979-001, Abcam) diluted at 1:400 was incubated for

1h before revelation using Omnimap anti-rabbit conjugated to Horseradish Peroxydase kit (Roche) with ChromoMap 3,3–diaminobenzidine (DAB) reagent (Roche).

For IGR series 5, two types of fixation were used. About 594 breast tumors were fixed by formalin and 1256 tumors by alcohol-formalin-acetic acid (AFA). Similar automate and protocol were used for FBL immunostaining (ab5821 lot GR253838-1, Abcam).

FBL immunostaining corresponded to brown dots in the nucleus. Breast tumors were classified according to FBL immunostaining organization, meaning the number of dots per nucleus. Four different types of FBL immunostaining organization were detected: “single FBL staining” corresponding to the presence of one dot per nucleus; “multiple FBL staining” to the presence of several dots per nucleus; “heterogeneous FBL staining” to the presence of cells exhibiting either single or multiple dots per nucleus; and finally “no detection of FBL staining” to the absence of detectable FBL immunostaining. Breast tumors reading and classification were done by two independent experimenters.

Images acquisition were done by Zeiss Axio Imager 2 microscope and processed using ZEN Blue software (v 2.5.75.2).

Cell culture and siRNA transfection

HeLa cells were maintained in Minimum Essential Medium (MEM) (Life Technologies) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (Life Technologies), 1% Penicillin-Streptomycin (Life Technologies), 1% Non-essential amino acids (Life Technologies) and 1% L-Glutamine (Life Technologies) at 37°C with 5% CO₂ content. A mix of three siRNA duplexes were used to silence fibrillarin: 5'- UUU CCU CGA CAA AUG AAG AC – 3'; 5'- AAA AUC ACA AAG UGU CCU CCA -3'; and 5'- UCU CUC GCA AUC CUG ACA G -3' (Eurogentec). A control siRNA duplex negative control (Eurogentec) was used as the experiment transfection negative control. Briefly, cells were transfected for 96h using X-tremeGene siRNA Transfection Reagent (Roche) by following the manufacturer’s protocol.

Western Blot analysis

About 20 µg of total protein lysates purified using 2X Laemli buffer were loaded on a 12.5% polyacrylamide gel (Bio-Rad) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE healthcare Life Sciences) using the Trans Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) buffer. Antibodies were incubated for 1h at room temperature in 2.5% non-fat milk in TBST (FBL: ab5821 lots GR1979-001 and GR253838-1, Abcam, 1:1000; Actin as loading control: A5441, Sigma, 1:5000). Proteins were detected using an anti-rabbit and anti-mouse peroxidase conjugated

antibody (Cell signalling) at 1:10000 in TBST and Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). The chemiluminescence signal was detected by the ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad) and analysed using Image Lab software (v 5.1, Bio-Rad).

Transcriptomic analysis

Using RNA-seq data issued from the TCGA series (RNA Seq V2 RSEM), bioinformatics analyses were performed. Two-rounds of clustering analyses were performed using k-means clustering approach. A first clustering was performed independently in the three groups of *FBL* expression to identify tumors within the three *FBL*-based groups that exhibit similar expression profiles. A second clustering was performed on the three groups by conserving the previously identified tumor clustering to identify putative difference in gene expression between the three *FBL*-based breast tumors. Finally, gene ontology was performed using DAVID tools (functional annotation clustering)²⁰. Bioinformatic analyses were performed using R.

Tumor monitoring in zebrafish

Tumor onset was monitored in *Danio rerio* zebrafish lines of AB background carrying homozygous mutant *tp53* gene (*tp53*^{zdf1/zdf1} expressing mutant p53M214K protein, ZFIN ID: ZDB-GENO-080606-235) with either homozygous wild-type or heterozygous transgenic *fb1* gene (*fb1*^{hi2581Tg/+} inducing heterozygous depletion of *fb1*, ZFIN ID: ZDB-GENO-080606-223). Detection of tumors was monitored for 12 months in 6- to 18-months old zebrafishes. Masses detection or end of the protocol was followed by zebrafish euthanasia in 0.4 g/l Tricaine Methan Sulfate for 10 min before fin and tissue harvest. Tumor identification was confirmed by hematoxylin/phloxine B coloration as well as PCNA3 and SOX10 immunostaining (ref). Genotyping was performed on gDNA purified using lysis (10mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 0.3% Tween-20, 0.3% Igepal CA-630 and 1mM EDTA) and proteinase K treatment. To detect *fb1*^{hi2581Tg} mutation, a single forward primer (5'- GAG GAA AAG CGG GTC TGA G -3') and two reverse primers hybridizing either the wild-type (5'- AGT GCG TGG CTA ACT CAT CC -3') or the mutant allele (5'- GAA GCC TAT AGA GTA CGA GCC ATA G -3') were used. A RFLP approach was used for *tp53* genotyping, the *tp53*^{zdf1} mutation introducing a MbolI restriction site in a 336-bp DNA fragment (forward : 5'- ACA TGA AAT TGC CAG AGT ATG TGT C -3' ; reverse : 5'- TCG GAT AGC CTA GTG CGA GC -3').

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize patients' initial characteristics. Between-group comparisons were performed using a Chi-2's or Fisher's exact test for categorical data and T test or non-parametric Kruskal-Wallis' test for continuous data.

Cut-offs of gene expression levels were determined using quartile/tercile-based overall survival in the Dundee series. Regarding *FBL*, three groups of expression levels were then refined based on *FBL* mRNA levels distribution: tumors expressing “low” *FBL* expression levels that corresponds to [0-20]% of *FBL* expression levels; “intermediate” *FBL* expression levels that corresponds to]20-80]% of *FBL* expression levels; and “high” *FBL* expression levels that corresponds to]80-100]% of *FBL* expression levels. The same cut-off was applied on the TCGA and IGR series. Overall survival (OS) corresponded to the timing from date of diagnosis to either death or last follow-up for censored patients. Disease-free survival (DFS) corresponded to the timing from date of diagnosis to either relapse, death (if no relapse had been observed) or last follow-up for censored patients. Distant disease-free survival (DDFS) corresponded to the timing from date of diagnosis to the either metastasis detection or last follow-up for censored patients. Survival curves for OS, DFS and DDFS with associated log-rank tests were generated using the Kaplan Meier method. Survival median has been estimated using the inverted Kaplan-Meier method. Cox proportional hazards model was used to investigate confounding factors predicting for OS and DFS. Variables sufficiently informed (less than 10% missing value in univariate analyses) and significant at a 10% level were included in a backward selection procedure to keep factors significant at a 5% level in the final multivariate model. Comparison of *FBL* expression levels between the three *FBL*-based groups of breast tumors with healthy donors was performed using non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests

All P-values corresponded to two-tailed P-values. A P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using either SAS v9.4 (SAS Institute) or GraphPad Prism v7.0a softwares (GraphPad Software, Inc). Graphical representations were depicted using GraphPad Prism software.

Results

Overexpression and underexpression of *FBL* mRNA levels are associated with poor outcome of early breast cancer patients

To decipher whether ribosome biogenesis factors, and in particular the rRNA methyltransferase *FBL*, can be used as innovative biomarkers to identify at early diagnostic breast cancer patients having the poorest outcome independently of current gold-standards, we first analysed association between *FBL* expression and overall and disease-free survivals in a series of 216 primary breast tumors diagnosed without metastases that exhibits a median

survival of 12.4 years (Series 1, Dundee) (Supplementary Tables S1 and S2). The Dundee series was representative of a standard breast cancer population, - tumor size, lymph node invasion and intrinsic breast cancer subtypes being relevant markers of survivals (Supplementary Figure S1A, D and G, Supplementary Table S3). In this breast tumor series, *FBL* mRNA levels were quantified using medium throughput RT-qPCR.

Using the quartile and tercile distribution of *FBL* mRNA levels as initial cut-off values, we observed that three groups of *FBL*-related breast cancer patients exhibit different overall survivals (Supplementary Figure S2). *FBL* cut-offs were then refined allowing the clear definition of these three groups: the “low” and “high” *FBL*-related groups each composed of 20% of the patients carrying tumors that express either the lowest or the highest *FBL* mRNA levels; and the “intermediate” *FBL*-related group corresponding to the other 60% of breast cancer patients. Based on this *FBL*-related stratification, Kaplan-Meier curves revealed that *FBL* mRNA levels was significantly associated with poor overall and disease-free survivals (Figure 1A and 1C). Indeed, in the Dundee series composed of 216 samples, patients carrying early breast tumors expressing either “high” or “low” mRNA levels of *FBL* exhibited the poorest survivals compared to patients with tumors expressing “intermediate” *FBL* mRNA levels.

Similar association between *FBL* mRNA expression levels and overall and disease-free survival was observed using a second set of *FBL* primers in the Dundee series (Supplementary Figure S4), but also using a second independent series of 661 breast samples (TCGA series corresponding to public RNA-seq data, Figure 1B and 1D). Such observations ruled out any technical problem associated with primer design, pre-amplification cycles or expression normalization. To support these data, we performed additional statistical analyses. Using *FBL* data issued from the two set of primers in the Dundee series, univariate Cox regression also showed an association between *FBL* mRNA levels and overall and disease-free survivals (Table 1, FBL-1 and FBL-2). Compared to “intermediate” *FBL* expressing breast tumors, both “high” and “low” *FBL* expressing breast tumors were associated with an increased hazard ratio when regarding overall and disease-free survivals, indicating the latter tumors were associated with poor survivals compared to “intermediate” ones. Of note, only the “low” *FBL* mRNA levels exhibited a CI 95% not encompassing 1, suggesting that significance was mainly related to the “low” *FBL* tumors rather than the “high” *FBL* tumors as observed on Kaplan-Meier curves (Figure 1A and 1C).

To characterize more deeply the three different tumor groups expressing increasing amount of *FBL*, we compared *FBL* mRNA levels quantified in the 216 samples of Dundee series to that one quantified in 11 mastectomy samples issued from healthy donors (Supplementary Figure S3). Compared to healthy tissues, a significant decrease in *FBL* mRNA levels was observed in the “low” *FBL* expressing tumors while a significant gradual increase in *FBL* mRNA levels

was observed in the “intermediate” and “high” *FBL* expressing tumors. These data suggest that the “high” *FBL* expressing tumors overexpressed *FBL* mRNA levels compared to normal tissues while the “low” *FBL* expressing tumors underexpressed *FBL* mRNA levels compared to normal tissues. Altogether, these data suggest that overexpression, but also underexpression, of *FBL* is associated with poor prognosis in early breast cancer.

***FBL*, but not the other protein components of the rRNA 2'-O-Me complex, is an independent marker of poor outcome in breast cancer at mRNA levels**

rRNA 2'-O-ribose methylation is catalysed by a complex composed of the rRNA methyltransferase *FBL* but also of three additional protein components, *NHP2L1*, *NOP56* and *NOP58*¹¹. To solve whether association with poor outcome of early breast cancer patients is solely restricted to *FBL*, we first performed univariate Cox regression and Kaplan-Meier analyses for *NHP2L1*, *NOP56* and *NOP58* (Table 1 and Supplementary Figure S6A-F). Although borderline significance was observed for association between *NHP2L1* or *NOP56* mRNA levels and overall or disease-free survivals, a stronger and significant association was observed between *NOP58* mRNA levels and overall and disease-free survivals using the two different statistical approaches. Similarly, to what observed for *FBL*, the breast cancer patients carrying tumors expressing “low” *NOP58* presented the poorest outcomes. As expected, due to the presence of *FBL* and *NOP58* within the same protein complex and thus their linked biological functions, a strong correlation of expression was observed in the Dundee series (Supplementary Figure S6). Multivariate Cox regression models were thus built to decipher whether patients' outcome is dependent upon *FBL* and/or *NOP58*. These models revealed that *FBL*, but not *NOP58*, remained associated with poor overall and disease-free survivals (Table 2). It suggested that *FBL*, but not the other protein components of the rRNA 2'-O-Me complex, is associated with poor prognosis of breast cancer patients.

In the multivariate Cox regression analyses, we also introduced currently used clinical gold-standards (tumor size, lymph node invasion and intrinsic breast cancer subtypes) in order to decipher the importance of *FBL* expression in improving the current stratification of early breast cancer patients. We observed that even after adjustment on these gold-standards, *FBL* mRNA levels remained associated with poor overall and disease-free survivals (Table 2). Based on the p-values, it appeared that *FBL* mRNA levels were a better marker of prognosis than lymph node invasion status and intrinsic breast cancer subtypes in the Dundee series. Such observations were also obtained using the second set of *FBL* primers in the Dundee series (Supplementary Table S5). Regarding the intrinsic breast cancer subtypes, we indeed observed that “low” and “high” *FBL*-related breast cancer groups tended to exhibit the poorest overall and disease-free survivals in all breast cancer subtypes, including ER+ PR+/- HER2-

(corresponding to luminal subtype) and ER- PR- HER2- (corresponding to triple negative subtype) (Supplementary Figure S7). This tendency was not observed in ER+/- PR+/- HER2+ tumours (corresponding to HER2-amplified subtype), probably due to the limited access of this population to Herceptin treatment. Interestingly, *FBL* mRNA levels allowed significant discrimination of patients with different outcomes exhibiting either small tumor size or no invaded lymph node at early diagnostic (Supplementary Figure S5). Indeed, the combination of *FBL* mRNA level and tumor size markers significantly identified three categories of breast cancer patients: patients with the best overall and disease-free survivals (median OS = 15.7 years; median DFS = undefined) that carry small tumors expressing intermediate *FBL* mRNA levels; patients with the poorest overall and disease-free survivals (median OS = 3.2 years; median DFS = 4.5 years) that carry large tumors expressing low *FBL* mRNA levels; and patients with intermediate survivals exhibiting the other combinations (Supplementary Figure S5A-B). Overall, these data indicated that *FBL* mRNA level is an independent marker of poor outcome in early breast cancer.

A validation series composed of 199 primary breast tumors at early diagnostic was analysed to sustain these observations (IGR series, Supplementary Tables S1-S2 and Figures S1B, S1E and S1H). Since too few events occurred in these series for analysing overall and disease-free survivals, we focused on the association of *FBL* mRNA levels with distant disease-free survival. Using the same cut-offs as previously, Kaplan-Meier curves and univariate Cox regression showed that patients carrying tumors expressing either “low” or “high” *FBL* mRNA levels exhibited a significantly poorest distant disease-free survival than patients with tumors expressing “intermediate” *FBL* mRNA levels (Supplementary Figure S8 and Table S7). In addition, multivariate Cox regression models built on different markers (*FBL* mRNA levels, tumor size, lymph node invasion, tumor grade, intrinsic breast cancer subtype, age at tumor onset) revealed that only *FBL* mRNA levels and tumor size remained significant markers of distant disease-free survival (Supplementary Table S8). Altogether our data strongly indicate that *FBL* is an independent marker of early breast cancer patient outcome.

Lack of FBL detection using immunohistochemistry is associated with poor outcome in breast cancer

Due to lack of strict correlation between mRNA and protein levels as well as the key role of translation regulation in cancers²¹, we then analysed FBL expression at protein levels by immunohistochemistry (IHC) on TMA. A test series of 434 primary breast tumors (CLB series) and a validation series of 1773 ones (IGR series) displaying classical characteristics of breast cancer population and survival markers were used (Supplementary Table S9 and Supplementary Figure S9). IHC was performed using the same polyclonal anti-FBL antibody

but issued from two different lots that showed strong specificity and efficiency for FBL protein detection (Supplementary Figure S10).

Using the test CLB series, breast tumors were classified based on different organisations of FBL staining (Figure 2A and A panel of Supplementary Figures S12-15). We indeed identified samples exhibiting a single FBL dot per tumoral cells (termed “single FBL staining”), samples displaying multiple FBL dots per tumoral cells (“multiple FBL staining”) and samples composed of tumoral cells with either a single or multiple FBL dots (“heterogeneous FBL staining”). Surprisingly, we also identified samples in which FBL was not detected (“no detection of FBL staining”). This latter group corresponded to about 8.5% of tumor samples. Interestingly similar distributions of these four FBL-related groups were observed in both the test CLB and the validation IGR series, the “no detection of FBL staining” representing about 12% of the IGR series (Supplementary Figure S11A). These data support the existence of breast tumors with at least low expression of *FBL* gene as observed at mRNA levels.

The association of the four FBL-related breast cancer patients' groups with overall and disease-free survivals was analysed using Kaplan-Meier curves (Supplementary Figures S11B-C). No significant association was observed. However, the patients bearing tumors with “no detection of FBL staining” displayed the poorest survivals. We thus compared survival of patients with tumours exhibiting or not a FBL staining. In CLB series, patients with “no detection of FBL staining” tumor status tended to have a poorest overall and disease-free survivals than patients carrying tumors where FBL staining was detectable (Figure 2B-C). In IGR series, a significant association was observed (Figure 2D-F). Indeed, “no detection of FBL staining” was associated with poor invasive and distant disease-free survivals. Only a tendency was observed for overall survival due to the few death events in these series. These data suggested that “no detection of FBL staining” is a maker of poor outcome in early breast cancer patients. FBL is one of the main protein expressed in nucleolus, a subcellular compartment where ribosome biogenesis takes place¹¹. To rule out that “no detection of FBL staining” arises from lack of nucleoli preservation during sample processing, we analysed nucleoli organization in the 434 tumors of CLB series using HPS staining. We observed that all tumor samples displayed nucleoli, suggesting that lack of detectable FBL staining was not related to lack of nucleoli (Supplementary Figure S16A-B). In contrast, using total RNA extracted from 41 randomly chosen samples issued from CLB series, we observed that tumors where FBL was not detected by IHC expressed significantly lower *FBL* mRNA levels than the ones where a FBL staining was detected (Supplementary Figure S16C). Overall, these data support the existence of primary breast cancer tumors expressing low levels of *FBL* but also the association of low *FBL* expression with poor outcome in early breast cancer.

Breast tumors overexpressing or underexpressing *FBL* exhibit distinct characteristics

To characterize the difference between primary breast tumours overexpressing or underexpressing *FBL*, we first compared clinical characteristics of breast patients in the Dundee, CLB and IGR series where *FBL* expression was assessed at mRNA or protein levels respectively. In Dundee series, no difference was observed in the different *FBL*-related tumor groups, the “high” and “low” *FBL*-related tumors being slightly enriched in PR- tumours compared to the “intermediate” ones (Supplementary Table S10). In CLB and IGR series, tumors categorized as “no detection of *FBL* staining” were associated with clinical characteristics related to aggressive cancers compared to “*FBL* staining” tumors (Supplementary Tables S11-S12). Indeed at diagnostic, “no detection of *FBL* staining” tumors displayed higher tumor size, increased age of patients and increased nervous invasion, as well as enrichment in ER-, PR- and triple negative breast compared to “*FBL* staining tumors”. These data suggest that breast tumors overexpressing and underexpressing *FBL* exhibit different clinical characteristics.

To decipher whether such difference also occurred at molecular levels, we took advantages of the TCGA series for which several molecular data are publically available¹⁷. At genomic levels, we first observed that breast tumors expressing “low” *FBL* mRNA levels had a significantly lower number of copy alteration or mutation counts that breast tumors expressing “high” *FBL* mRNA levels, supporting that the two *FBL*-related tumor groups are different ones (Supplementary Figure S17A-B). Using the whole transcriptome dataset of the TCGA series, we then compared gene expression in breast tumors overexpressing and underexpressing *FBL* (Figure 3). Clustering approaches revealed that four out of the 10 gene-based clusters displayed different expression profiles between “high” and “low” *FBL*-related tumors. While genes involved in clusters 0 and 3 were less expressed in “low” than in “high” *FBL*-related tumors, genes involved in clusters 4 and 5 were more expressed in “low” than in “high” *FBL*-related tumors, indicating that the two *FBL*-related tumor groups have different biological properties. Interestingly the cluster 0 corresponded to the one for which the difference in gene expression was the most drastically different between “low” and “high” *FBL*-related tumors, but also to the only one enriched in gene encoding ribosomal proteins and proteins involved in translational process as shown by gene ontology analyses (Supplementary Figure S18). Comparison of median expression of the 80 human ribosomal proteins in the three *FBL*-related tumors indeed showed a significant dose-dependent correlation between *FBL* mRNA expression levels and ribosomal protein expression levels, as expected due to the role of *FBL* in ribosome biogenesis¹¹ (Supplementary Figure S17C). Overall, it appeared that breast tumors overexpressing and underexpressing *FBL* exhibited different clinical and molecular characteristics. These data suggested the existence of breast tumors exhibiting either a large

amount of ribosomes or in contrast a strong reduction of ribosomes, the two of them displaying poor clinical outcomes.

Heterozygous depletion of *FBL* contributes in *in vivo* tumorigenesis

The analysis of 3,500 breast tumor samples revealed the existence of tumors underexpressing *FBL* characterized by a low ribosome amount that are associated with poor patients' outcome. This observation was in clear divergence with the actual literature sustaining that hyperactivation of ribosome biogenesis emerges as a novel hallmark of cancer cells to maintain their high proliferative rate⁴⁻⁶. To determine whether underexpression of *FBL* favors tumorigenesis, we analysed the impact of *FBL* heterozygous depletion on tumor incidence *in vivo* using spontaneous tumor model of zebrafish. Zebrafishes develop spontaneous tumors in response to environmental exposure or genetic disabilities, the tumors exhibiting similar phenotypes or cancer-related genes than those found in humans²². Here, we used a zebrafish model expressing homozygous p53 mutant protein (tp53^{M214K}) that has been shown to develop spontaneous malignant peripheral nervous system tumors (MPNST) from 10-months old²³. Crossing were performed to obtain 58 *fb*l^{+/+} and 111 *fb*l^{+/-} zebrafishes in tp53^{M214K/M214K} background. The reduction of *fb*l expression at mRNA levels was previously confirmed by RT-qPCR in *fb*l^{+/-} zebrafish embryos of wild-type background used for the crossing²⁴.

We monitored tumor incidence in this zebrafish cohort for 12 months from age of 6 to 18 months. Among the 179 zebrafishes, we identified 39 masses. Histological analyses using hematoxylin-phloxine B coloration and PCNA3 or Sox10 staining was performed to confirm that the detected masses corresponded to classical MNPTS tumors (Figure 4B-C). Tumors were mainly localized in eyes and abdomen, only few melanoma having been detected as previously reported in this model²³. No difference in tumor location was observed in *fb*l^{+/+} or *fb*l^{+/-} tp53^{M214K/M214K} zebrafishes, suggesting that homozygous depletion of *FBL* do not affect tumor pattern. In contrast, a significant difference in tumor onset was observed in *fb*l^{+/+} compared to *fb*l^{+/-} tp53^{M214K/M214K} zebrafishes (Figure 4A). Tumors were detected from 7.3 months in *fb*l^{+/-} tp53^{M214K/M214K} zebrafishes and only from 10.6 months in *fb*l^{+/+} tp53^{M214K/M214K} zebrafishes. In homozygous tp53^{M214K} mutant zebrafish models, the heterozygous depletion of *fb*l induced appearance of the first tumors about 3 months before the wild-type *fb*l expression that corresponded to 1/10^o of normal zebrafish life. These data demonstrated that reduction of *FBL* expression, and thus of ribosome biogenesis, accelerates appearance of spontaneous tumors *in vivo*, supporting a role of *FBL* reduction in tumorigenesis.

Discussion

Improvement of early breast cancer patients' management will arise from identification of markers, susceptible to pinpoint as soon as diagnosis patients with low-risk of recurrence that will benefit from adjustment of treatment protocols². Due to the recent advances in the ribosome biogenesis field, the rRNA methyltransferase *FBL*, a pivotal regulator of ribosome biogenesis, could present a true opportunity^{6,11}. Using 3,500 non-metastatic primary breast tumors mainly corresponding to non-invasive cancers, we assessed the clinical values of *FBL* in early breast cancers.

The recurrence of breast cancer disease was measured using different measurable events, including death or local, invasive and distant progression, depending on the series. Indeed, our samples divided in 6 independent series exhibited different clinical annotations but also insufficient event numbers for some parameters, thus rendering difficult the strict comparison between the series. In addition, the samples came from three different European cancer centres, each centre having their one treatment protocols. Finally, samples corresponded to distinct biological materials, including total mRNAs and TMA. Nevertheless, although these disparities among the series, all the data converged to reproducible conclusion. It indeed appeared that *FBL* expression is significantly associated with poor outcome in breast cancer. Such association was observed using distinct statistical approaches in both test and validation series, but also using distinct technics for *FBL* mRNA quantification (RT-qPCR and whole transcriptomic), thus reinforcing our conclusion. Interestingly, analysis of these 3,500 breast tumors revealed that *FBL* remains an independent marker of poor prognosis in early breast cancer even after adjustment to the routinely used clinical gold-standards, tumor size, lymph node invasion and breast cancer subtypes. Such observations suggested that *FBL* could drastically improve the stratification of patients. For example in combination with tumor size, *FBL* expression allowed the identification of patients with the poorest outcome although they carry small tumor usually synonymous of low-risk breast cancer patients.

One of the most intriguing results issued from this study remains the identification of aggressive tumors expressing low levels of *FBL*. Although definition of normal tissues regarding breast cancer disease is still a matter of controversy (Aran et al, Nat Com 2017), comparison of tumor samples with mastectomies issued from healthy donors suggested that "low" *FBL* expressing tumors corresponded to underexpression of *FBL*. The existence of breast tumors underexpressing *FBL* identified at mRNA levels that might have arise from aberrant definition of cut-offs values, was supported by data issued from *FBL* immunostaining in TMA: similar proportion of breast tumors exhibiting no *FBL* detection in both the CLB and IGR series (n=424 and n=1779, respectively); preservation of nucleoli during sample processing; and significant reduction of *FBL* mRNA levels in these tumors compared to *FBL*

stained ones. The fact that heterozygous depletion of *FBL* contributes in spontaneous tumor development in zebrafishes, definitively sustains the existence of such tumors in real-life.

Up to date, all studies including ours demonstrated that *FBL* is overexpressed in breast tumors and its association with poor patients' outcome^{14,15}. These data were accumulated in regards of the molecular mechanisms available at that time. Indeed, we showed that *FBL* overexpression altered rRNA 2'-O-Me profiles thus affecting intrinsic activity of ribosomes and translational efficiency of some oncogenic mRNAs such IGF1R or CMYC¹⁴. Moreover, *FBL* overexpressing breast cancer cell lines exhibited increased cell proliferation and chemotherapy resistance, comforting the association of *FBL* overexpression with poor survivals¹⁴. By performing a non-hypothesis-driven study using large sample set, we identified unexpected alteration of *FBL*. At clinical and molecular levels, breast tumors overexpressing and underexpressing *FBL* exhibited distinct characteristics. Underexpressing *FBL* tumors were characterized by a reduction of ribosomal proteins compared to overexpressing *FBL* ones, as expected due to the pivotal role of FBL in ribosome biogenesis¹¹. Of note, heterozygous *fbf* depleted zebrafish embryos displayed reduced ribosome biogenesis²⁴, supporting the notion that tumorigenesis associated with *FBL* underexpression involves ribosome biogenesis defects. Two hypotheses could be draw regarding the contribution of *FBL* reduction in tumorigenesis. First, several hereditary diseases are characterized by both increases in cancer susceptibilities and defects in ribosome biogenesis, termed ribosomopathies^{10,25}. In these patients, reduction of ribosome amount has been associated with increased cancer susceptibilities although the cellular and molecular mechanisms by which quantitative alteration of ribosomes contributes to neoplastic transformation remain a matter of debate. Second, reduced *FBL*-associated tumorigenesis might result from qualitative alteration of ribosomes. Indeed, we recently reported that reduction of *FBL* expression in HeLa cells alters rRNA 2'-O-Me profiles and thus translational regulation by ribosome¹⁶. Although rRNA 2'-O-Me profiles have not been compared in the same cell lines in response to alteration of FBL expression, it appeared that sites whose rRNA 2'-O-Me frequency varies in response to reduction or increased expression of FBL were different^{14,16}. Thus, overexpression and underexpression of FBL might differentially affect ribosome translational activities by differentially modulating rRNA 2'-O-Me profiles and promote development of tumours with distinct characteristics. Such hypotheses remain to be tested in the near future to sustain a dual role of *FBL* in tumorigenesis.

Finally, our data identified a novel independent marker of poor outcome in breast cancer that belongs to the emerging field of ribosome in oncology. Based on to the recent demonstration that targeting ribosome biogenesis mainly using DNA integrating molecules is a specific and efficient anti-cancer target^{5,6}, our discovery may open up novel therapeutic opportunities by

directly targeting *FBL*. Of course, one may be afraid of that reducing *FBL* expression in overexpressing *FBL* tumors may have no, if not worse, effect due to the association of reduced *FBL* expression with poor survival. However, the distinct characteristics of *FBL* overexpressing and underexpressing tumors are encouraging and it has to be tested.

Altogether our data showed a dual association of *FBL* expression with early breast cancer outcome and reveals for the first time the contribution of *FBL* reduction in tumorigenesis. These data suggest a dual role of *FBL*, but more largely of ribosome biogenesis, in mammary tumorigenesis.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This study was funded by PAIR Sein program (RiboTEM: ARC_INCa_LNCC_7625), PRT-K program (EMT-CoNCEPT: INCa), Fondation ARC (PJA 20161204686) and Ligue Contre le Cancer Comités Isère (PME 2017). FNVL was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer then from Fondation pour la Recherche Médicale.

Authors' contributions

FNVL, FC, AD, MM, PR, NP, DM, VS, ACV, LO and IT performed and analysed experiments. FNVL, ALC, DC, CR, EL, SC and DP performed statistical analyses. SB, DLB, IB, AD, LBJ, AMT, FJ, TD, IT, JCB, AP and FA provide human samples, fishes and cellular models. FNVL, IT, FA, JJD and VM analysed and interpreted the data. JJD and VM shaped the research question and coordinated the project. FNVL, IT, SC, SM and VM supervised the daily experiments. FNVL, JJD and VM wrote the first draft of the manuscript.

Acknowledgements

We thank platforms' staffs that have not been referred as co-authors: Tayside Tissue Bank (TTB, Dundee, Scotland, UK); CLB Biobank (PGEB-CLB, Lyon, France, Dir: Dr S. Tabone-Eglinger); CRCL Microscopy facilities (CRCL, Lyon, France, co-Dir: Dr C. Vanbelle); BioCOS Life Sciences (Bioinformatics, Bengalur, India); Zebrafish facilities (Animalerie Zebrafish-Rockefeller, Lyon, France, Dir: Prof G. Gillet and Dr O. Lohez); Animal histology facilities (CIQLE, Lyon, France, Dir: Dr R. Rimock and A. Bouchardon).

Reference

1. Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* **24**, S26–S35 (2015).
2. Cardoso, F. *et al.* Research needs in breast cancer. *Ann. Oncol.* **28**, 208–217 (2017).
3. Barna, M. *et al.* Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* **456**, 971–975 (2008).
4. Truitt, M. L. & Ruggero, D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat Rev Cancer* **16**, 288–304 (2016).
5. Pelletier, J., Thomas, G. & Volarevic, S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* **18**, 51–63 (2018).
6. Catez, F. *et al.* Biochemical Pharmacology. *Biochemical Pharmacology* **159**, 74–81

- (2019).
7. Bywater, M. J. *et al.* Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell* **22**, 51–65 (2012).
 8. Peltonen, K. *et al.* A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* **25**, 77–90 (2014).
 9. Bruno, P. M. *et al.* A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med* 1–13 (2017). doi:10.1038/nm.4291
 10. Penzo, M., Montanaro, L., Treré, D. & Derenzini, M. The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection. *Cells* **8**, (2019).
 11. Monaco, P., Marcel, V., Diaz, J.-J. & Catez, F. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules* **8**, 106 (2018).
 12. Tessarz, P. *et al.* Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* **505**, 564–568 (2014).
 13. Koh, C. M. *et al.* Alterations in Nucleolar Structure and Gene Expression Programs in Prostatic Neoplasia Are Driven by the MYC Oncogene. *The American Journal of Pathology* **178**, 1824–1834 (2011).
 14. Marcel, V. *et al.* p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* **24**, 318–330 (2013).
 15. Su, H. *et al.* Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* **33**, 1348–1358 (2014).
 16. Eroles, J. *et al.* Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **8**, 201707674 (2017).
 17. Ciriello, G. *et al.* Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* **163**, 506–519 (2015).
 18. Bourdon, J.-C. *et al.* p53 mutant breast cancer patients expressing p53 γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **13**, R7 (2011).
 19. Maire, V. *et al.* TTK/hMPS1 is an attractive therapeutic target for triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* **8**, e63712 (2013).
 20. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2008).
 21. Dalla Venezia, N., Vincent, A., Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J.-J. Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control. *IJMS* **20**, (2019).
 22. White, R., Rose, K. & Zon, L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer* **13**, 624–636 (2013).
 23. Berghmans, S. *et al.* tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 407–412 (2005).

24. Bouffard, S. *et al.* Fibrillarin is essential for S-phase progression and neuronal differentiation in zebrafish dorsal midbrain and retina. *Dev. Biol.* **437**, 1–16 (2018).
25. Mills, E. W. & Green, R. Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science* **358**, eaan2755 (2017).

Figure Legends

Figure 1. Association between *FBL* mRNA levels and survivals in two independent breast cancer series. Using the cut-off identified in Supplementary figure 2 for *FBL* mRNA expression, association between *FBL* mRNA levels and overall (A-B) and disease-free (C-D) survivals was determined using Kaplan-Meier analyses in Dundee (n = 216 ; A,C) and TCGA (n = 661 ; B,D) series. An association between *FBL* mRNA expression and overall and disease-free survivals was observed in the two independent breast cancer series. Patients bearing breast tumors expressing either low or high *FBL* mRNA levels exhibit poor survivals compared to that with tumors expressing intermediate *FBL* mRNA levels. Low *FBL* mRNA levels: [0 % - 20 %] of the complete population; intermediate *FBL* mRNA levels: [20 % - 80 %]; high *FBL* mRNA levels: [80 % - 100%]. Significance was assessed using the Log-Rank (Mantel-Cox) test. *: $P \leq 0.05$.

Figure 2. Association between FBL immunostaining and survivals in two independent breast cancer series. (A) In the two TMA series, the FBL staining presented 4 different organizations based on the number of dots per nucleus: “single FBL staining” corresponded to the presence of a single dot per nucleus; “multiple FBL staining” to the presence of several dots per nucleus; “heterogeneous FBL staining” to the distinction of cells exhibiting either single or multiple dots per nucleus; and “no detection of FBL staining”. (B-F) Association between FBL immunostaining and overall (B,D), disease-free (C,E) and distant disease-free (F) survivals was assessed using Kaplan-Meier analyses in CLB (n = 389 ; B-C) and IGR (n = 1759 ; D-F) series. Patients carrying tumors with “no detection of FBL staining” exhibited the poorest overall, disease-free and distant disease-free survivals compared to patients with tumors that displayed FBL staining (i.e. tumors with “single” or “multiple” or “heterogeneous” FBL staining). *: $P \leq 0.05$; scale bar: 528 μm .

Figure 3. Differential gene expression profiles between the three *FBL* mRNA levels-related groups using the TCGA series. Heatmap was generated using transcriptomic data from the 661 primary breast tumors of TCGA series. The columns corresponded to the groups of tumors that were stratified according to *FBL* expression and the rows to genes that were grouped in ten clusters using the k-means approach. Low and high *FBL* expressing tumors exhibited distinct gene expression profiles for some clusters (i.e., 0, 3, 4 and 5). Blue: reduced expression level; red: increased expression level; orange: clusters with different signatures in low and high *FBL* expressing tumors.

Figure 4. Increase of tumor incidence induced by heterozygous depletion of *fb1* in tumor prone p53mt/mt zebrafishes. (A) In p53mt/mt zebrafishes, tumor incidence was monitored in two different *fb1* genotypes (*fb1*+/- and *fb1*+/) for 18 months and represented using Kaplan-Meier curve from the identification of the first tumor. Tumors developed in *fb1*+/-;p53mt/mt zebrafishes appeared earlier than tumors developed in *fb1*+;p53mt/mt zebrafishes. (B) Tumors were identified at three different locations, eyes abdomens and skin, and validated by hematoxylin/eosin staining.

Tables

Table 1 - Association of the rRNA 2'-O-ribose methylations complex factors with overall survival and progression-free survival by univariate Cox regression analyses

Dundee Series						
Variables	Overall survival			Disease-free survival		
	HR	CI 95%	P-value	HR	CI 95%	P-value
<i>FBL-1</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low	2.01	[1.25-3.23]	0.0150	2.06	[1.30-3.27]	0.0065
High	1.40	[0.84-2.34]		1.51	[0.93-2.45]	
<i>FBL-2</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low	1.69	[1.04-2.75]	0.0615	1.58	[0.99-2.53]	0.0815
High	1.53	[0.92-2.54]		1.52	[0.94-2.46]	
<i>NHP2L1</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low	1.67	[1.05-2.66]	0.0763	1.74	[1.11-2.72]	0.0538
High	1.05	[0.63-1.75]		1.20	[0.74-1.93]	
<i>NOP56</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low			ns	1.46	[0.90-2.36]	0.0604
High				1.67	[1.07-2.61]	
<i>NOP58</i>						
High	1.00			1.00		
Low	2.01	[1.27-3.20]	0.0031	1.84	[1.17-2.88]	0.0078

HR, Hazard Ratio ; CI 95%, 95% of Confidence Interval ; ns, non significant

Table 2 – Multivariate Cox regression analyses for overall survival and progression-free survival using significant univariate variables

Dundee Series						
Variables	Overall survival			Disease-free survival		
	HR	CI 95%	P-value	HR	CI 95%	P-value
<i>FBL</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low	2.35	[1.41 - 3.92]	0.0042	2.25	[1.40 - 3.60]	0.0032
High	1.27	[0.72 - 2.24]		1.49	[0.91 - 2.44]	
<i>NOP58</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low			ns			ns
High						
Tumor size						
< 30 mm	1.00			1.00		
≥ 30mm	2.77	[1.77 - 4.33]	<0.0001	2.14	[1.44 - 3.18]	0.0002
Lymph node invasion status						
N = 0	1.00			1.00		
N ≥ 1	1.61	[1.01 - 2.55]	0.0443	1.64	[1.09 - 2.48]	0.0174
Intrinsic breast cancer subtypes						
ER+ PR+/- HER2-	1.00			1.00		
ER+/- PR+/- HER2+	1.06	[0.63 - 1.79]	0.0463			ns
ER- PR- HER2-	1.94	[1.12 - 3.35]				

HR: Hazard Ratio ; CI95%: 95% of Confidence Interval.

Supplementary Figure Legends

Supplementary figure 1. Association between gold-standard prognostic factors and survivals in three breast cancer series. Association between overall survival or distant disease-free survival with gold-standard prognostic factors, including tumor size (**A-C**), lymph node invasion status (**D-F**) and intrinsic breast cancer subtypes (**G-I**), were determined by Kaplan-Meier analyses in three independent breast cancer series for which total RNA were available, named Dundee (n = 216 ; **A, D, G**), IGR (n = 198 ; **B, E, H**) and TCGA (n = 661 ; **C, F, I**) series. (**A-F**) Patients carrying large tumors (A: ≥ 30 mm; **B-C**: ≥ 20 mm) or diagnosed with invaded lymph node (D-F: $N \geq 1$) had significant poor overall or distant disease-free survivals compared to patients with smaller or no invaded lymph node tumors. (**G-I**) Patients bearing ER+ PR+/- HER2- tumors (i.e., luminal breast cancer subtype) had better overall survival compared to patients with ER+/- PR+/- HER2+ tumors (i.e., HER2-enriched breast cancer subtype) and ER- PR- HER2- tumors (i.e., triple-negative breast cancer subtype). No significant difference in distant-disease free survival was found in IGR series (H). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$; N: number of invaded lymph nodes; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: ERBB2 receptor.

Supplementary figure 2. Determination of *FBL* mRNA levels cut-off using the Dundee breast cancer series. (**A**) In Dundee breast cancer series, patients were divided into groups according to *FBL* mRNA levels expressed in their tumors using either the quartile or the tercile distribution as cut-offs. (**B-C**) Association of *FBL* mRNA levels with overall survival using quartile (B) and tercile (C) distributions as cut-offs was assessed by Kaplan Meier analyses. Patients who bore tumors expressing the highest (B: Q4; and **C**: T3) and the lowest (B: Q1; and C: T1) mRNA levels of *FBL* tended to have poor overall survival compared to patients carrying tumors expressing intermediate levels of *FBL* (B: Q2-Q3; and C: T2). T: tercile; Q: quartile.

Supplementary figure 3. Comparison of *FBL* mRNA levels between healthy donors and breast cancer patients. *FBL* mRNA levels were quantified in mastectomy tissues from healthy donors by medium throughput RT-qPCR and compared to ones of the three *FBL*-related tumor groups from the Dundee series. The “high” and “intermediate” tumors expressed significantly increased *FBL* mRNA levels compared to healthy donors, while the “low” tumors expressed

significantly reduced *FBL* mRNA levels compared to healthy donors. ***: $P \leq 0.001$; n= number of patients.

Supplementary figure 4. Association between *FBL* mRNA levels with survivals using a second set of primers in the Dundee breast cancer series. Using the cut-off identified in the Dundee series for *FBL* mRNA expression using the first set of *FBL* primers, association of *FBL* mRNA levels and overall (A) and disease-free (B) survivals was determined using Kaplan-Meier analyses on data issued from the second set of *FBL* primers. Similar trend for association between *FBL* mRNA levels and overall and disease-free survivals was observed using a second set of primers. Low *FBL* mRNA levels: [0 % - 20 %] of the complete population; intermediate *FBL* mRNA levels: [20 % - 80 %]; high *FBL* mRNA levels: [80 % - 100%]. *: $P \leq 0.05$.

Supplementary figure 5. Improvement of the breast cancer patients' stratification derived from tumor size and lymph node invasion status using *FBL* expression in the Dundee breast cancer series. Association of tumor size (A-B) or lymph node invasion status (C-D) with overall survival (A,C) or disease-free survival (B,D) was determined using Kaplan-Meier analyses. (A-B) Patients carrying large tumors ($L \geq 30$ mm) and expressing low mRNA levels of *FBL* exhibited the poorest survivals, while patients with smallest tumors ($S < 30$ mm) and expressing intermediate mRNA levels of *FBL* had the best survivals. Others patients presented similar intermediate survivals. (C-D) Patients carrying tumors with invaded lymph nodes ($N \geq 1$) and expressing low mRNA levels of *FBL* had the poorest survivals, while patients with tumors in which no lymph node were invaded ($N = 0$) and expressing intermediate mRNA levels of *FBL* exhibited the best survivals. **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$; N: number of invaded lymph nodes; S: small tumor size; L: large tumor size; Low: low *FBL* mRNA levels; Int.: intermediate *FBL* mRNA levels; high: high *FBL* mRNA levels.

Supplementary figure 6. Association between rRNA 2'-O-ribose methylation complex components and survivals in the Dundee breast cancer series. (A-F) Association between overall (A,C,E) and disease-free (B,D,F) survivals and mRNA levels of additional protein components of the rRNA 2'-O-ribose methylation complex, including *NOP58* (A-B), *NOP56* (C-D) and *NHP2L1* (E-F) was assessed by Kaplan Meier analyses. Significant association with low mRNA levels of *NOP58* and poor overall and disease-free survivals was observed, as well as with *NOP56* and *NHP2L1* with disease-free and overall survivals respectively. (G)

Correlation between *NOP58* and *FBL* mRNA levels was assessed using the non-parametric Spearman test. mRNA levels of *NOP58* were strongly and significantly correlated with *FBL* mRNA levels in the Dundee breast cancer series. Low *NOP58*: [0 %; 50 %] of population and high *NOP58*: [80 % ; 100%] of population. Low *NOP56* and *NHP2L1* mRNA levels: [0 % - 20 %] of the complete population; intermediate *NOP56* and *NHP2L1* mRNA levels: [20 % - 80 %]; high *FBL* mRNA levels: [80 % - 100%]. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

Supplementary figure 7. Association between *FBL* mRNA levels and survivals according to the intrinsic breast cancer subtypes in the Dundee breast cancer series.

Association between *FBL* mRNA levels and overall (**A-C**) and disease-free (**D-F**) survivals was analysed in three intrinsic breast cancer subtypes, ER+ PR+/- HER2- (i.e., luminal subtype; **A,D**), ER+/- PR+/- HER2+ (i.e., HER-2 enriched subtype; **B,E**) and ER- PR- HER2- (i.e., triple-negative subtype; **C,F**). No significant association was observed between *FBL* mRNA levels and survivals in patients carrying HER2-enriched tumors although tendency was observed between *FBL* mRNA levels and survivals in patients carrying either luminal and triple-negative tumors, low and high *FBL* mRNA levels exhibiting the poorest survivals.

Supplementary figure 8. Association of *FBL* mRNA levels with distant disease-free survival in the IGR series.

Using the cut-off identified in the Dundee series for *FBL* mRNA expression in Supplementary figure 2, association between *FBL* mRNA levels and distant disease-free survival was assessed using Kaplan-Meier analyses using the IGR series. A significant association between *FBL* mRNA levels and distant disease-free survival was observed. Low *FBL* mRNA levels: [0 % - 20 %] of the complete population; intermediate *FBL* mRNA levels: [20 % - 80 %]; high *FBL* mRNA levels: [80 % - 100%]. *: $P \leq 0.05$.

Supplementary figure 9. Association between gold-standard prognostic factors and overall survival in two breast cancer series.

Association between overall survival and gold-standard prognostic factors, including tumor size (**A**), lymph node invasion status (**B,E**) and intrinsic breast cancer subtypes (**C,F**) was determined by Kaplan-Meier analyses in two independent tissue microarray breast cancer series, CLB (n = 389 ; **A-C**) and IGR (n = 1759 ; **D-F**) series. (**A-C**) Patients carrying large tumors (A: $\geq 30\text{mm}$) or diagnosed with invaded lymph nodes (B-C: $N \geq 1$) presented significant poor overall survival compared to patients with small or no invaded lymph node tumors. (**D-E**) Patients bearing ER- PR- HER2- tumors (i.e., triple-negative breast cancer subtype) had significant poor overall survival in the CLB and IGR

series. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$; N: number of invaded lymph nodes; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: ERBB2 receptor.

Supplementary figure 10. Validation of FBL antibodies used for immunostaining. (A) HeLa cells were transfected for 96 hrs with either a siRNA control (siCTRL) or a FBL siRNA (siFBL) before validating the decreased expression of *FBL* by siRNA at mRNA levels using RT-qPCR. Compared to siCTRL condition, a 5-fold decrease in *FBL* mRNA expression was observed in siFBL condition. **(B-C)** Specificity and efficiency of FBL protein detection by the antibodies used for immunostaining was assessed by western blot in siCTRL and siFBL conditions. Two different FBL antibody lots were tested, one lot corresponding to the one used to stain the TMA CLB series (B) and second lot corresponding to the one used to stain the TMA IGR series (C). For the two lots, only one band was observed even at 600 sec exposure that corresponds to the predicted size of FBL protein and that showed decreased signal in siFBL compared to siCTRL condition. Error bars represent a standard deviation of four independent experiments. ***: $P \leq 0.001$; KDa: Kilo Daltons.

Supplementary figure 11. Association between FBL immunostaining and survivals in two independent breast cancer series. (A) Distribution of the four groups showing different organisation of the FBL immunostaining (i.e., single FBL staining, multiple FBL staining, heterogeneous FBL staining and no detection of FBL staining) were compared between the CLB ($n = 389$) and IGR ($n = 1759$) TMA series. In two independent series, the four groups exhibited almost similar proportion. **(B-C)** Association between FBL immunostaining and overall (B) and disease-free (C) survivals in the CLB series was assessed using Kaplan-Meier analyses. Patients carrying tumors with “no detection of FBL staining” exhibited the poorest survivals compared to patients with tumors presenting the other types of FBL staining.

Supplementary figure 12-15. Reproducibility of FBL immunostaining in tumor replicates and in the two independent breast cancer series. Different tumors (Tumor) as well as their individual triplicate (Replicate 1 to 3) were presented for the CLB series **(A)** and the IGR series **(B)**. The four groups of FBL immunostaining were shown: “single FBL staining” that presented one dot per nucleus (Supplementary figure 12); “multiple FBL staining” that exhibited several dots per nucleus (Supplementary figure 13); “heterogeneous FBL staining” that shown cells with either a single or multiple dots per nucleus (Supplementary figure 14); and “no detection

of FBL staining” that corresponded to tumors where FBL immunostaining was absent (Supplementary figure 15).

Supplementary Figure 16. Signification of “no detection of FBL staining” in breast tumors. (A-C) Comparison of FBL immunostaining and Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS) used to identify cellular nucleoli was performed in TMA of the CLB series. One example of each FBL staining-related tumor group (A) was presented with the corresponding HPS staining (B) as well as the global data (C). While no FBL was detected in the “no detection of FBL staining” groups (tumor 4), nucleoli were present in those tumors according to HPS staining. (D) *FBL* mRNA levels were quantified by RT-qPCR in 41 breast tumors from the CLB series that displayed different organisation of FBL immunostaining. Patients carrying tumors with “no detection of FBL staining” expressed a significantly lower levels of *FBL* mRNA than patients having tumors displaying any type of FBL staining. **: $P \leq 0.01$; black arrow: HPS stained nucleolus.

Supplementary figure 17. Characterization of the three tumor groups expressing different *FBL* mRNA levels. (A-B) Using the TCGA series (n= 661), comparison between the three tumor groups exhibiting different *FBL* mRNA levels (i.e., low, intermediate, high) and copy number alterations (A) and number of mutations (B) was performed. Tumors expressing high levels of *FBL* mRNA presented a significantly higher copy number of alterations and mutational counts and mRNA expression of ribosomal proteins than tumors expressing either intermediate or low *FBL* mRNA levels. (C) Mediane expression of mRNAs encoding the 80 ribosomal proteins was compared in the three FBL-related groups of tumors in the TCGA series. A dose dependent relationship was observed between FBL mRNA levels and mediane expression of the 80 ribosomal proteins. ns: non significant; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

Supplementary figure 18. Gene ontology analysis of the gene clusters expressing different profiles between tumors expressing low and high mRNA levels of *FBL*. Gene ontology (GO) functional annotation clustering was performed using DAVID tools on the four clusters presenting difference in gene expression profiles between tumors expressing low or high *FBL* mRNA levels (Clusters 0, 3, 4 and 5). For each cluster, the top three functional annotation clusters (FAC) ordered by their enrichment score as well as the top three annotation terms are shown. Enrichment of genes involved in translation was observed for the cluster 0

(A), in glycosylation for the cluster 3 **(B)** and in transcription for the clusters 4 and 5 **(C-D)**. For complete GO analysis see Supplementary table 19.

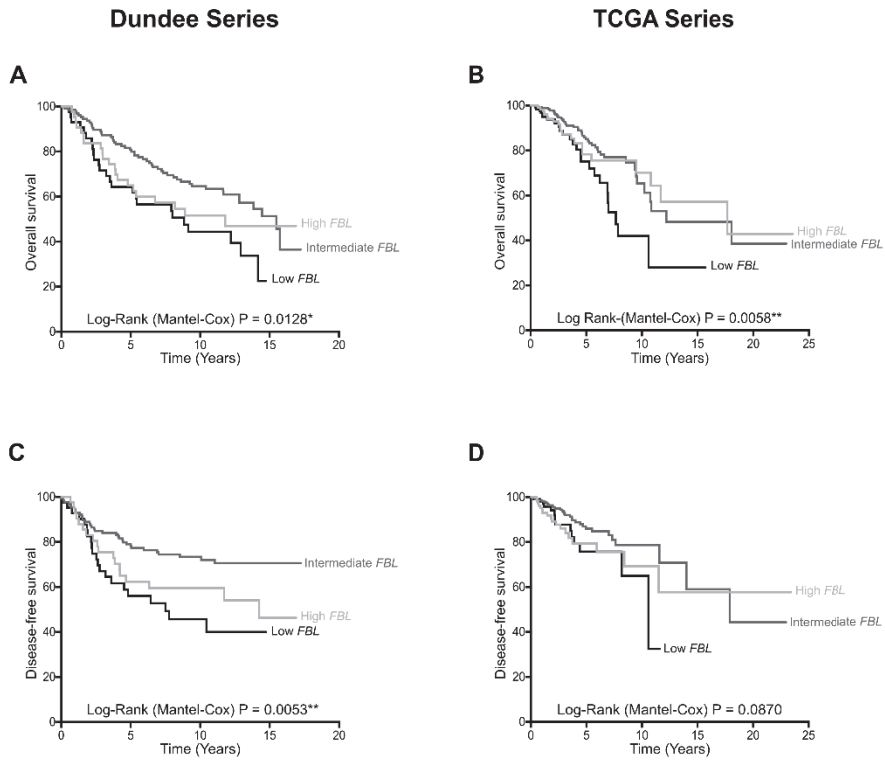


Figure 1

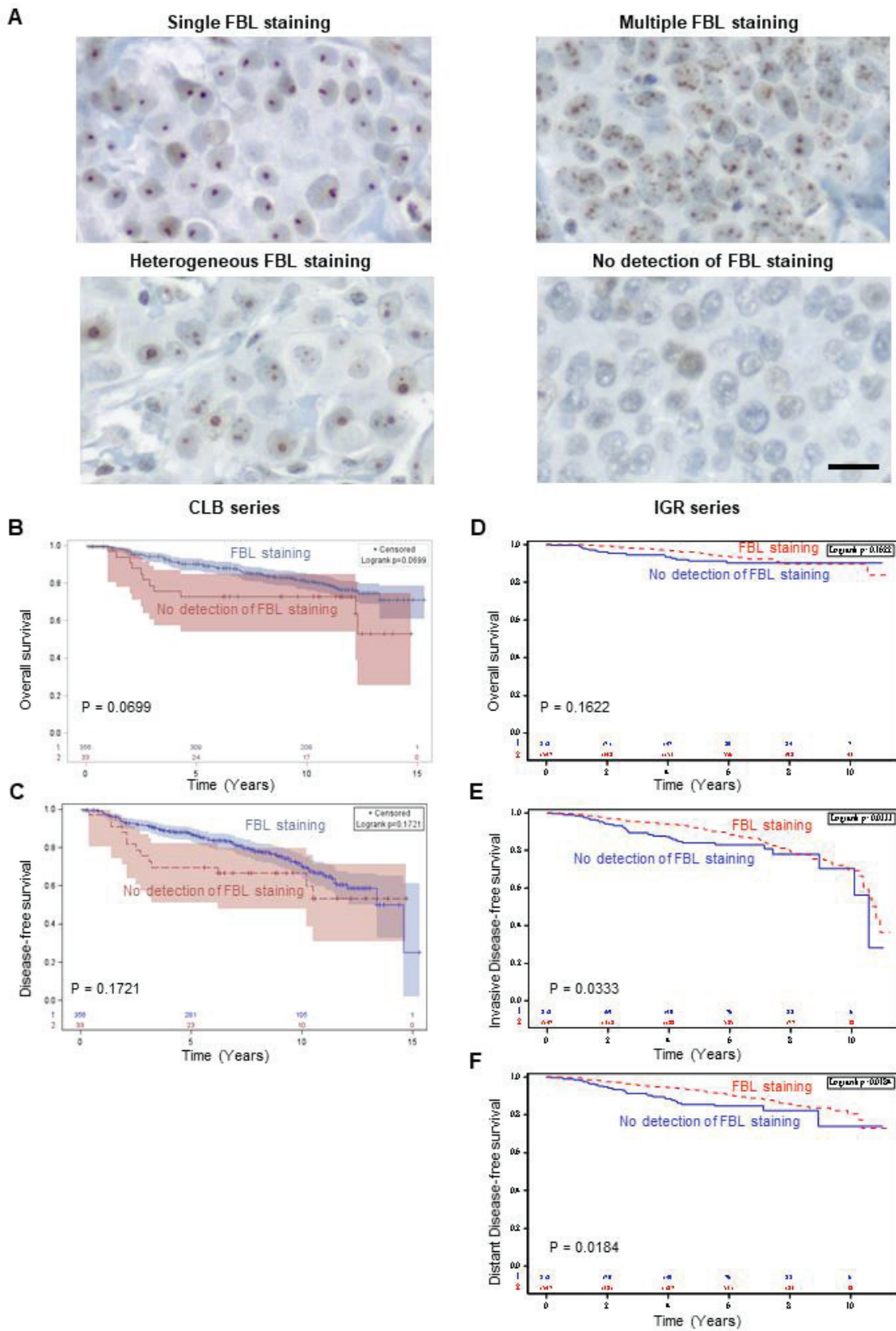


Figure 2

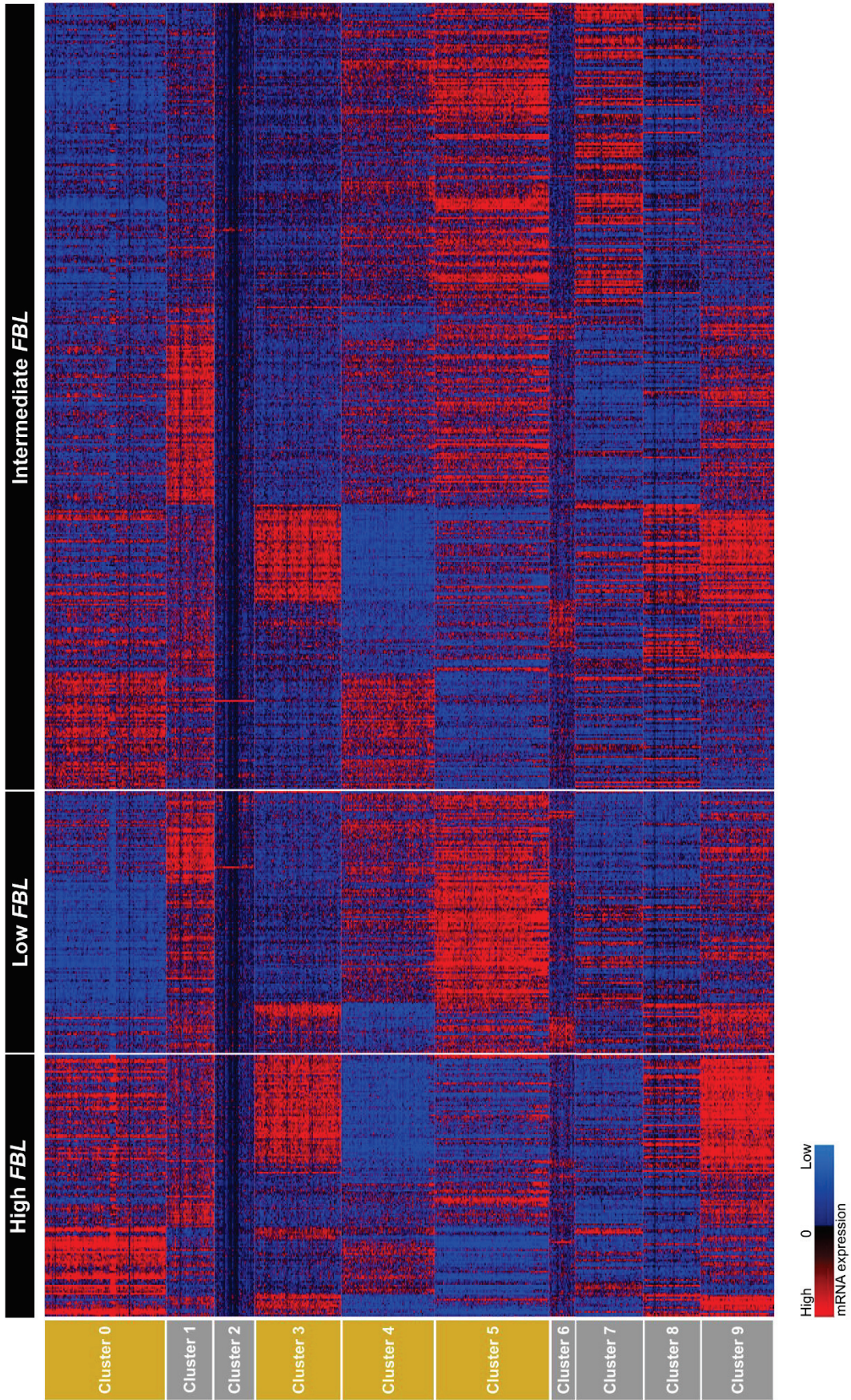
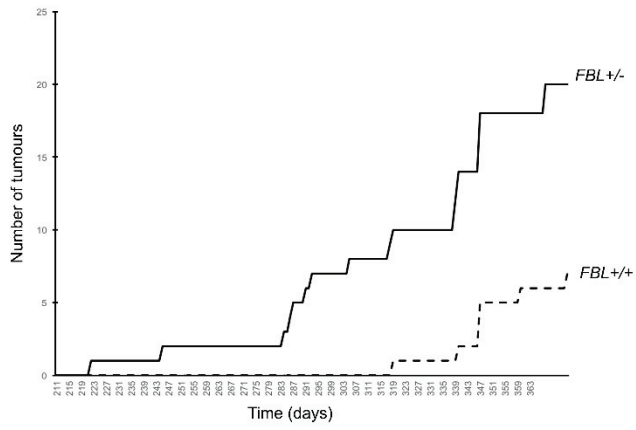


Figure 3

A



23 tumours / 39 tumours

B

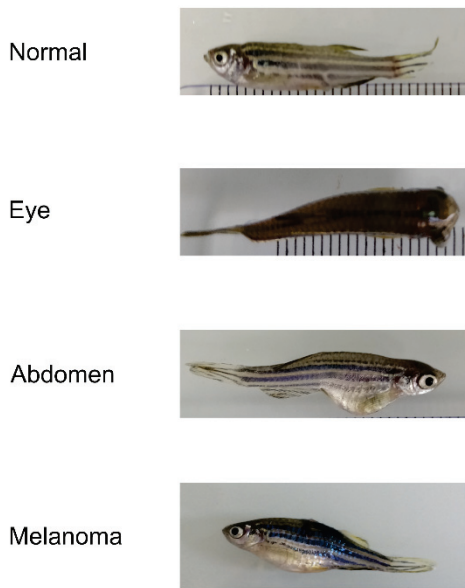
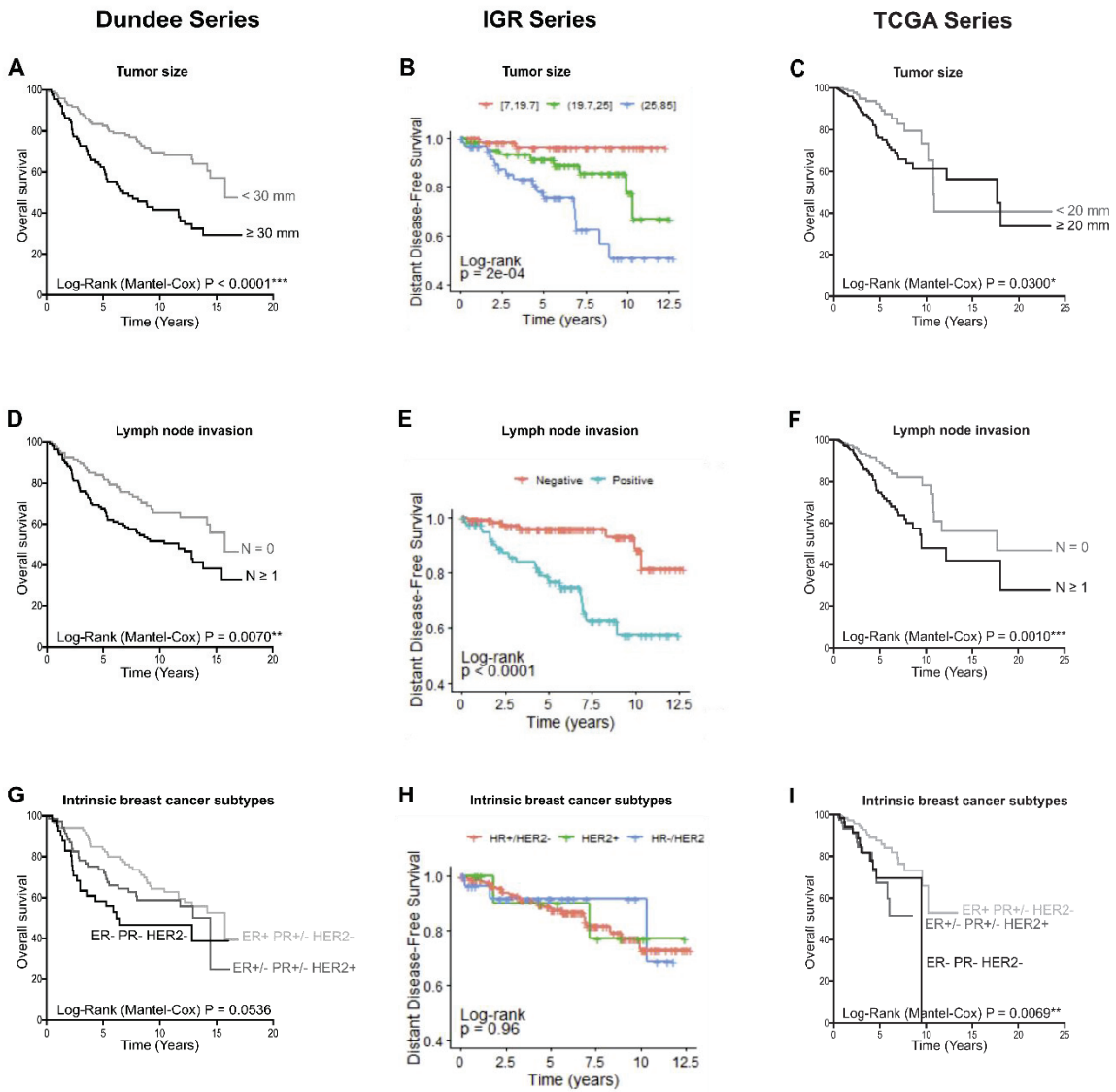
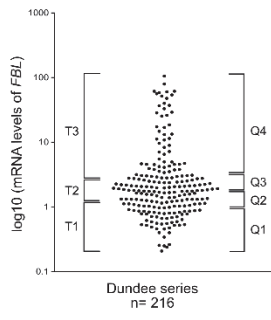
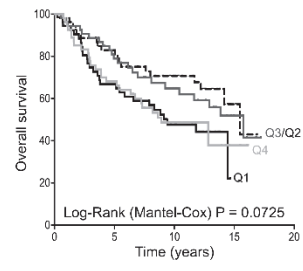
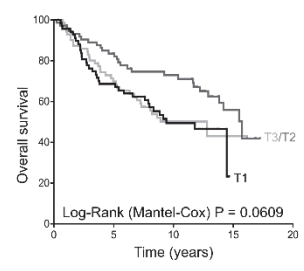


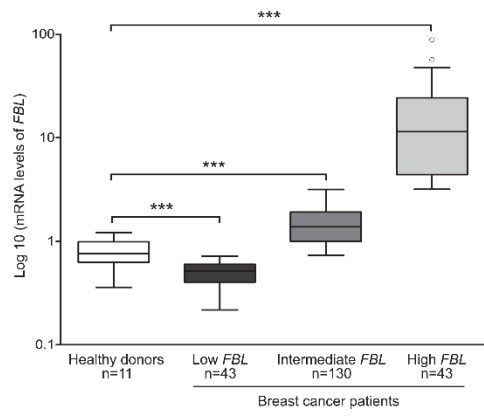
Figure 4



Supplementary figure 1

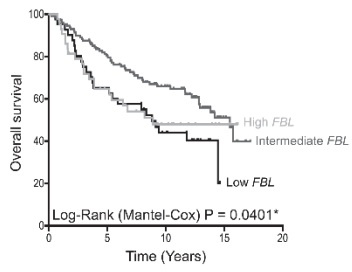
A**B****C**

Supplementary figure 2

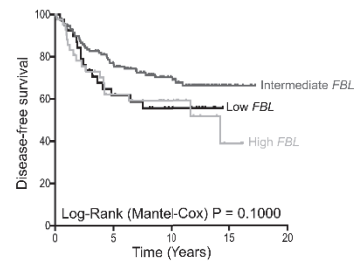


Supplementary figure 3

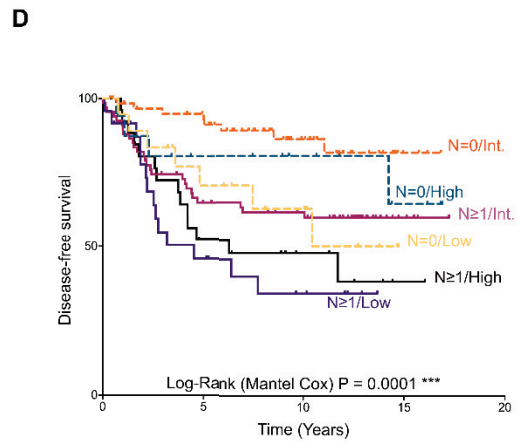
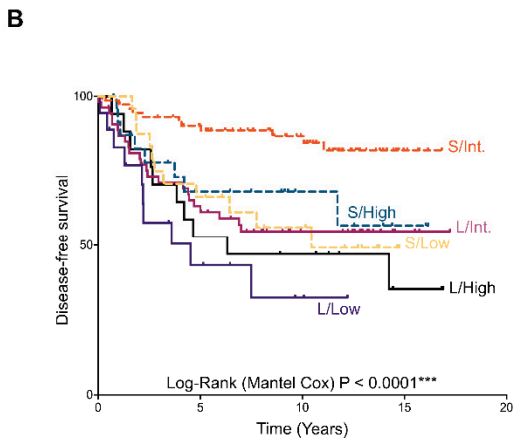
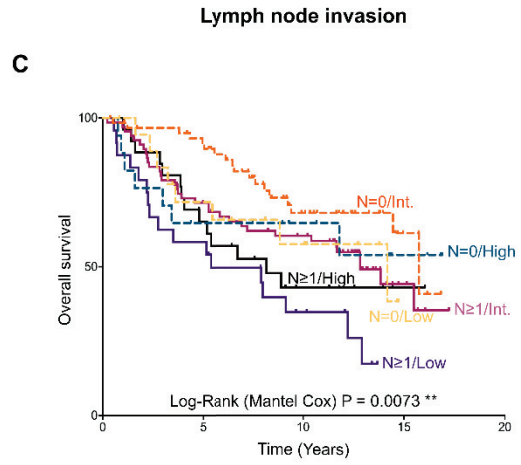
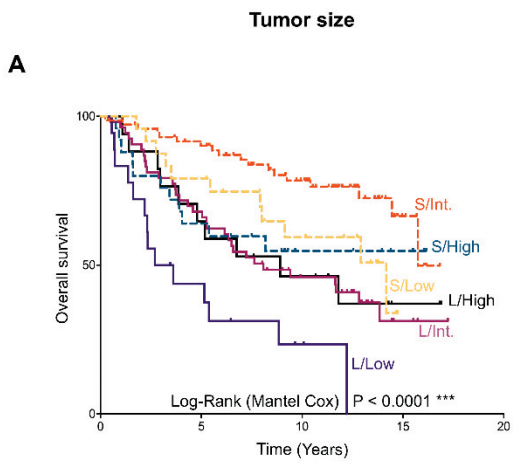
A



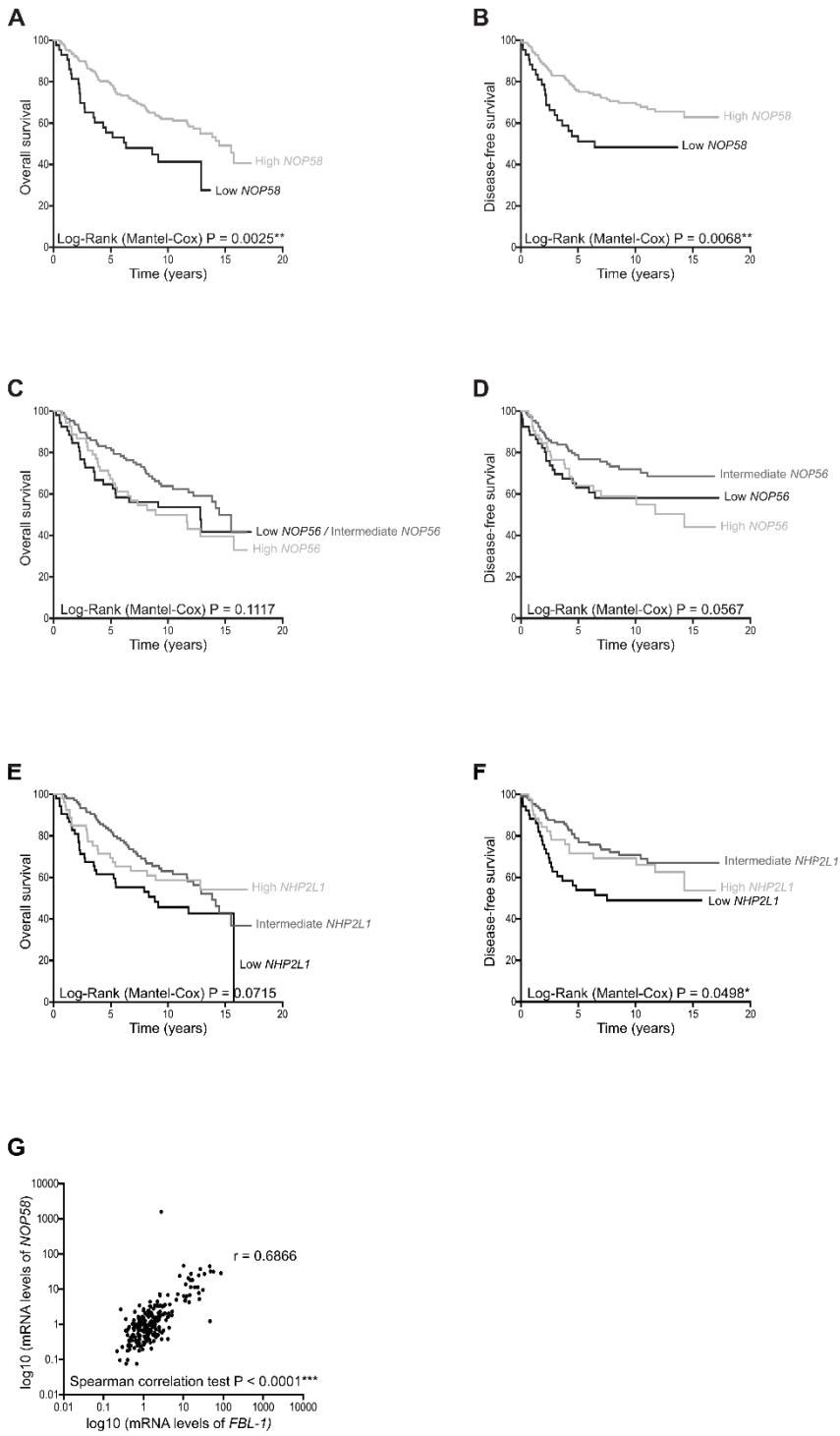
B



Supplementary figure 4



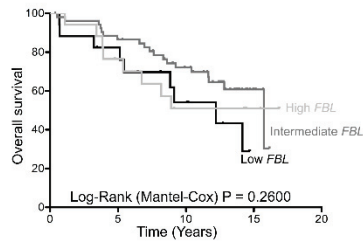
Supplementary figure 5



Supplementary figure 6

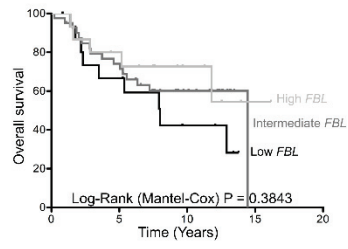
A

ER+ PR+/- HER2-



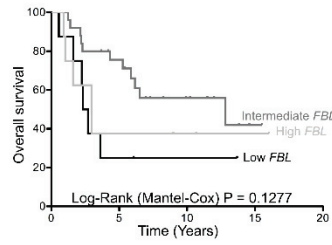
B

ER+/- PR+/- HER2+

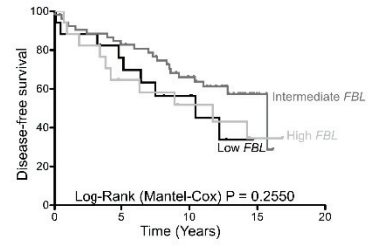


C

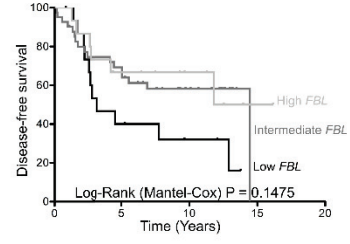
ER- PR- HER2-



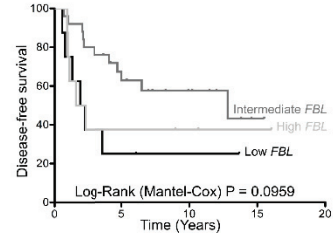
D



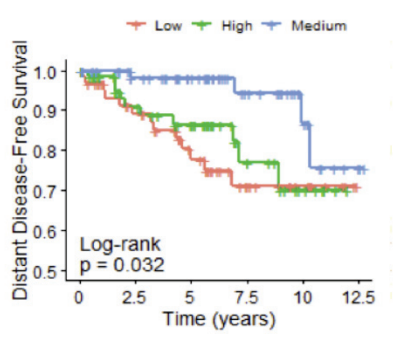
E



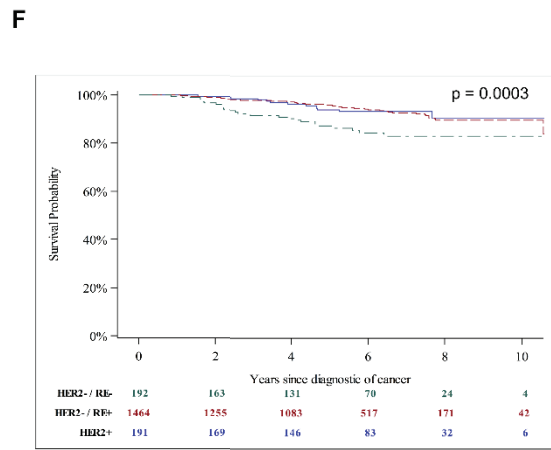
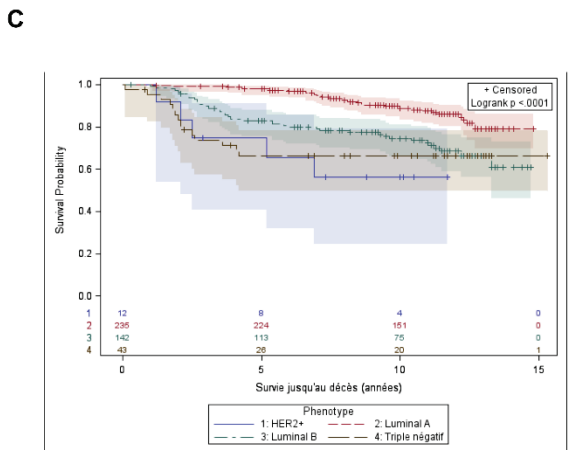
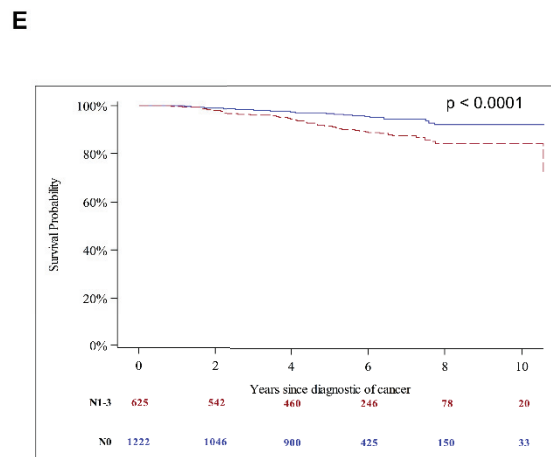
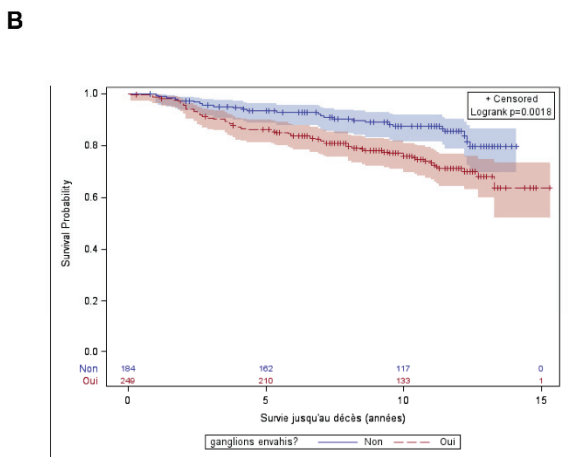
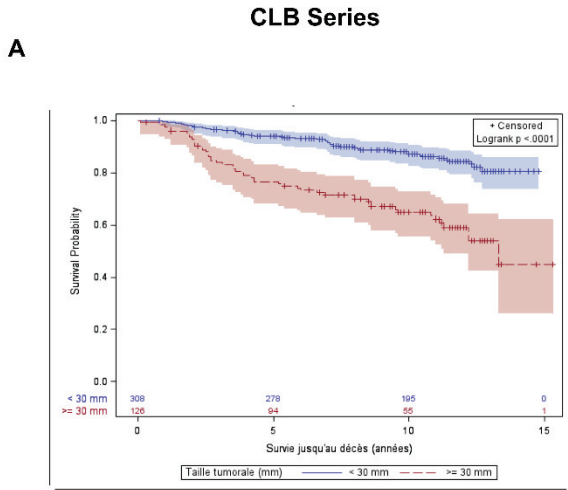
F



Supplementary figure 7

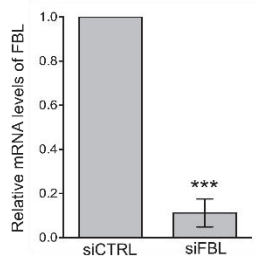


Supplementary figure 8

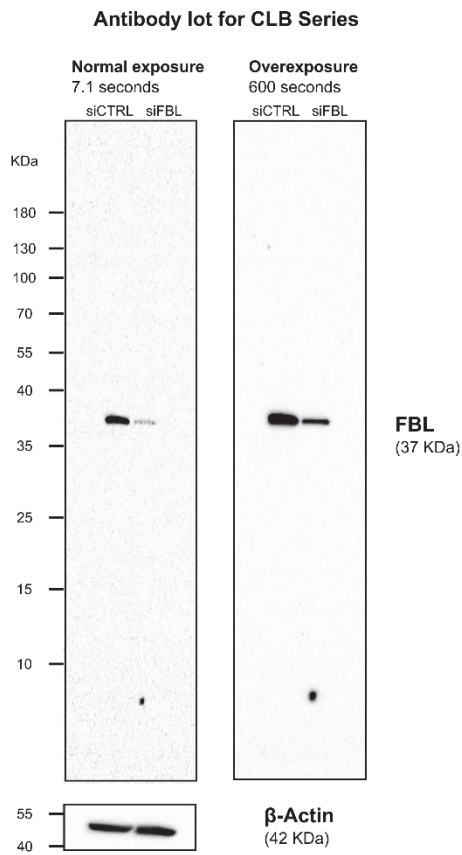


Supplementary figure 9

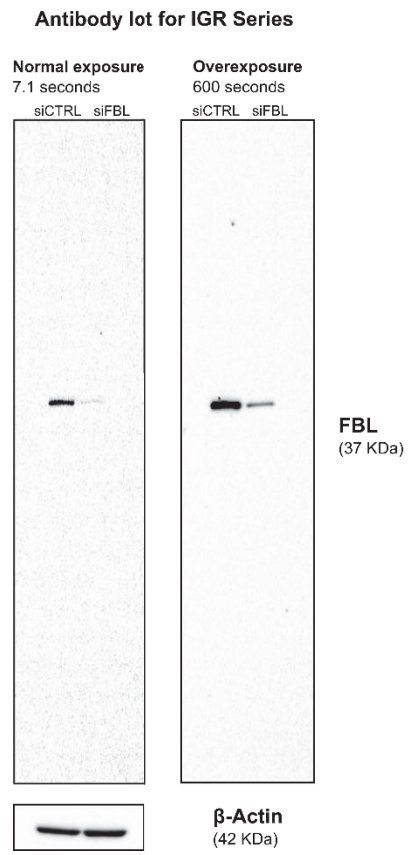
A



B

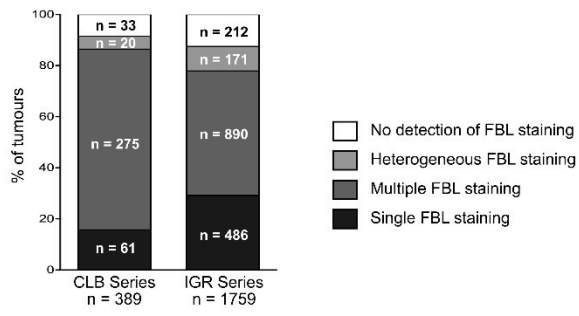


C

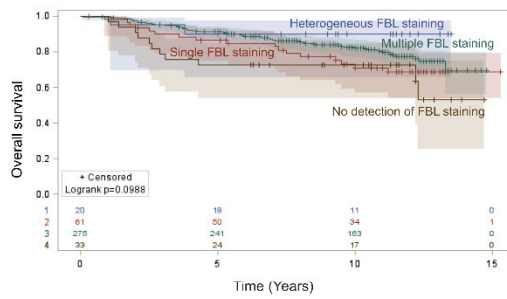


Supplementary figure 10

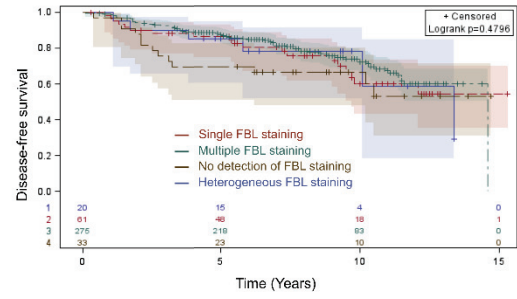
A



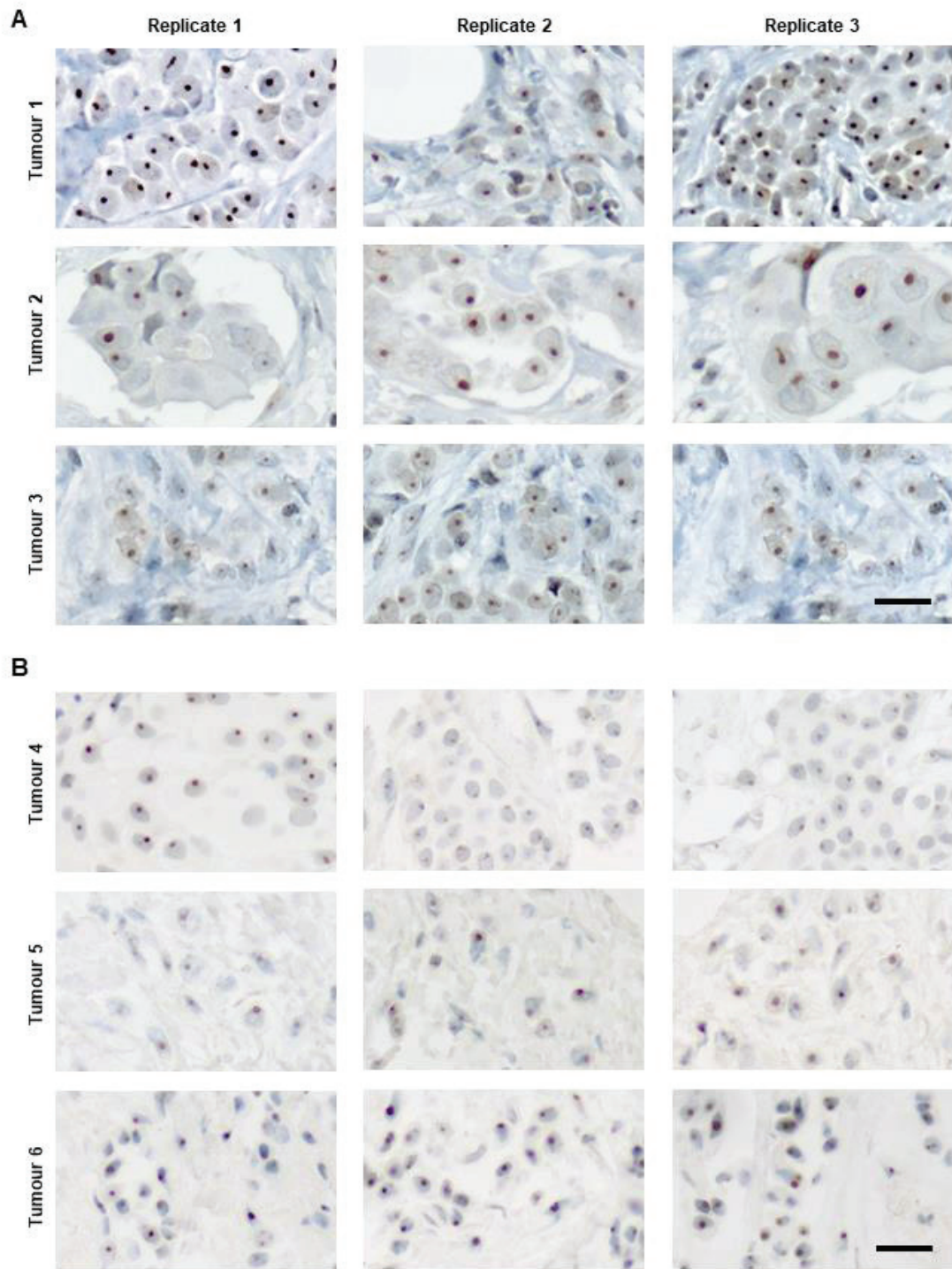
B



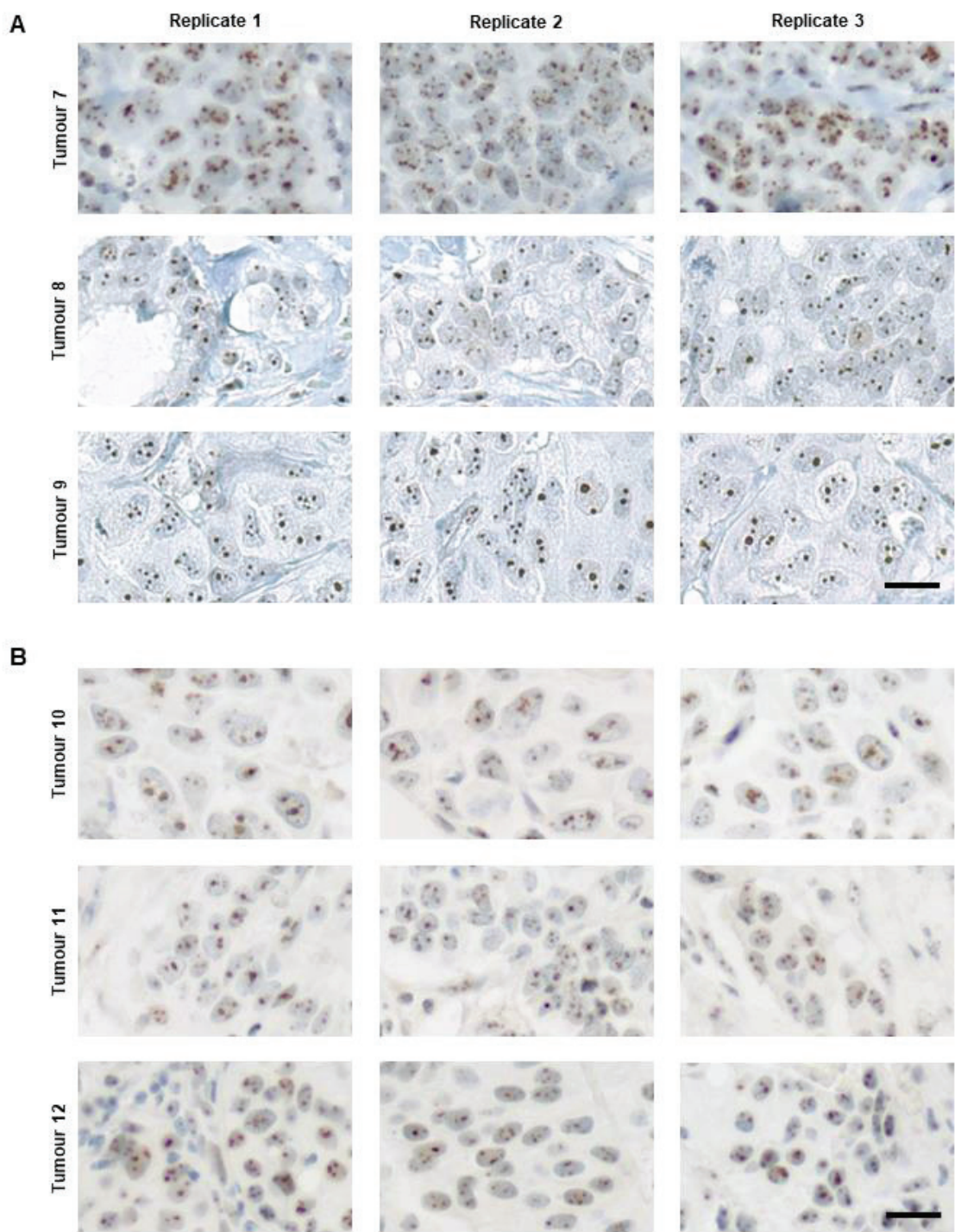
C



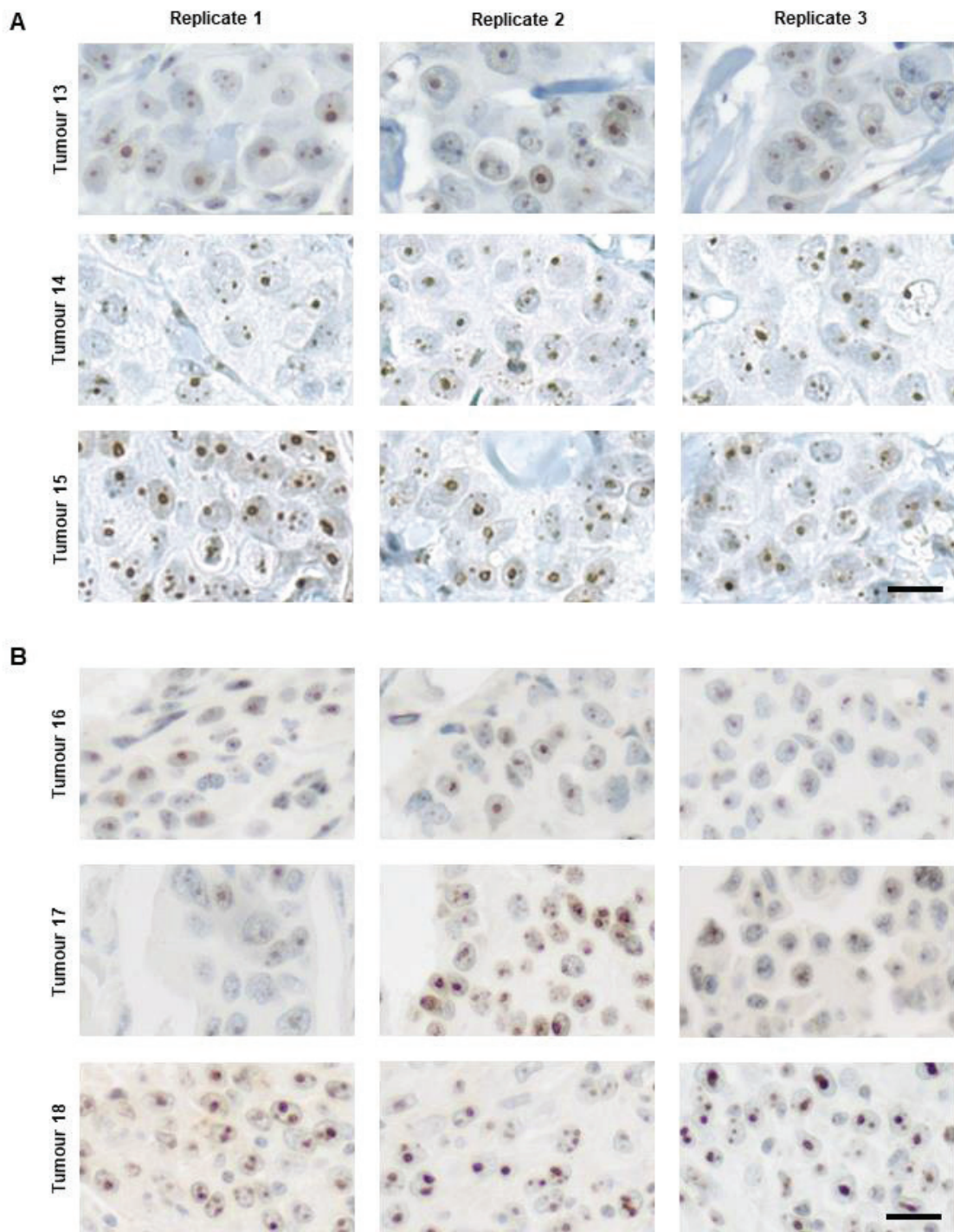
Supplementary figure 11



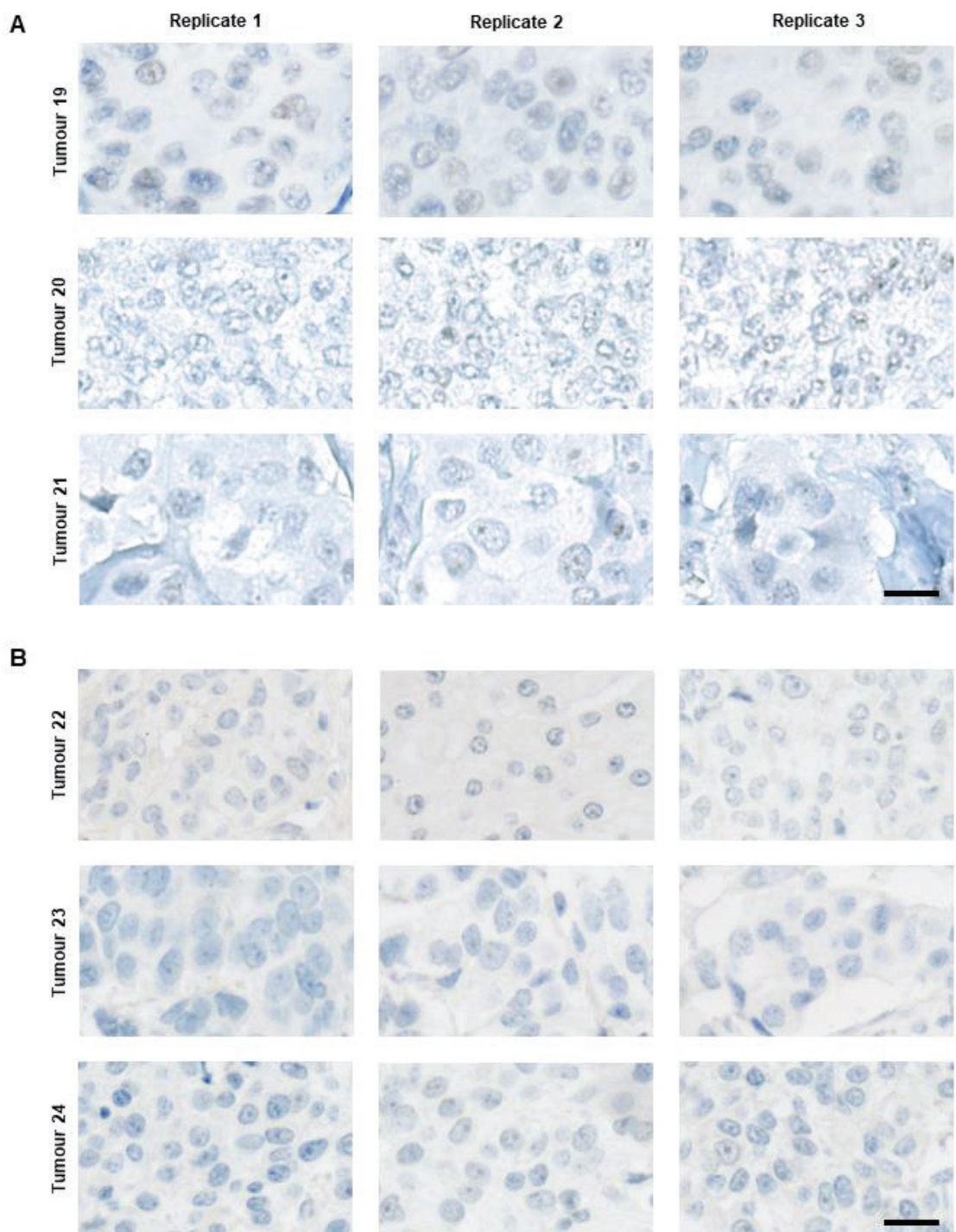
Supplementary Figure 12



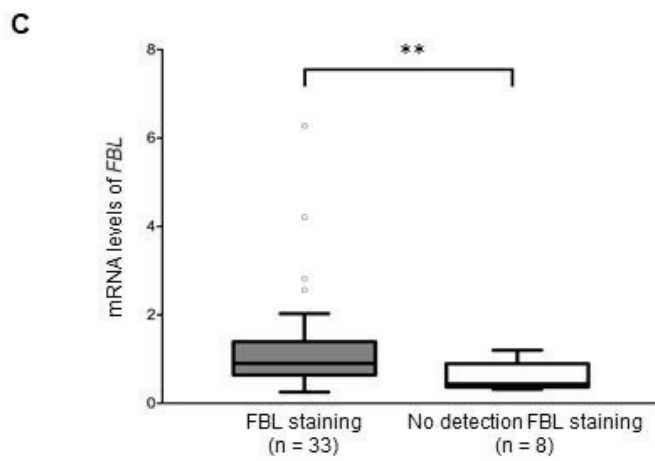
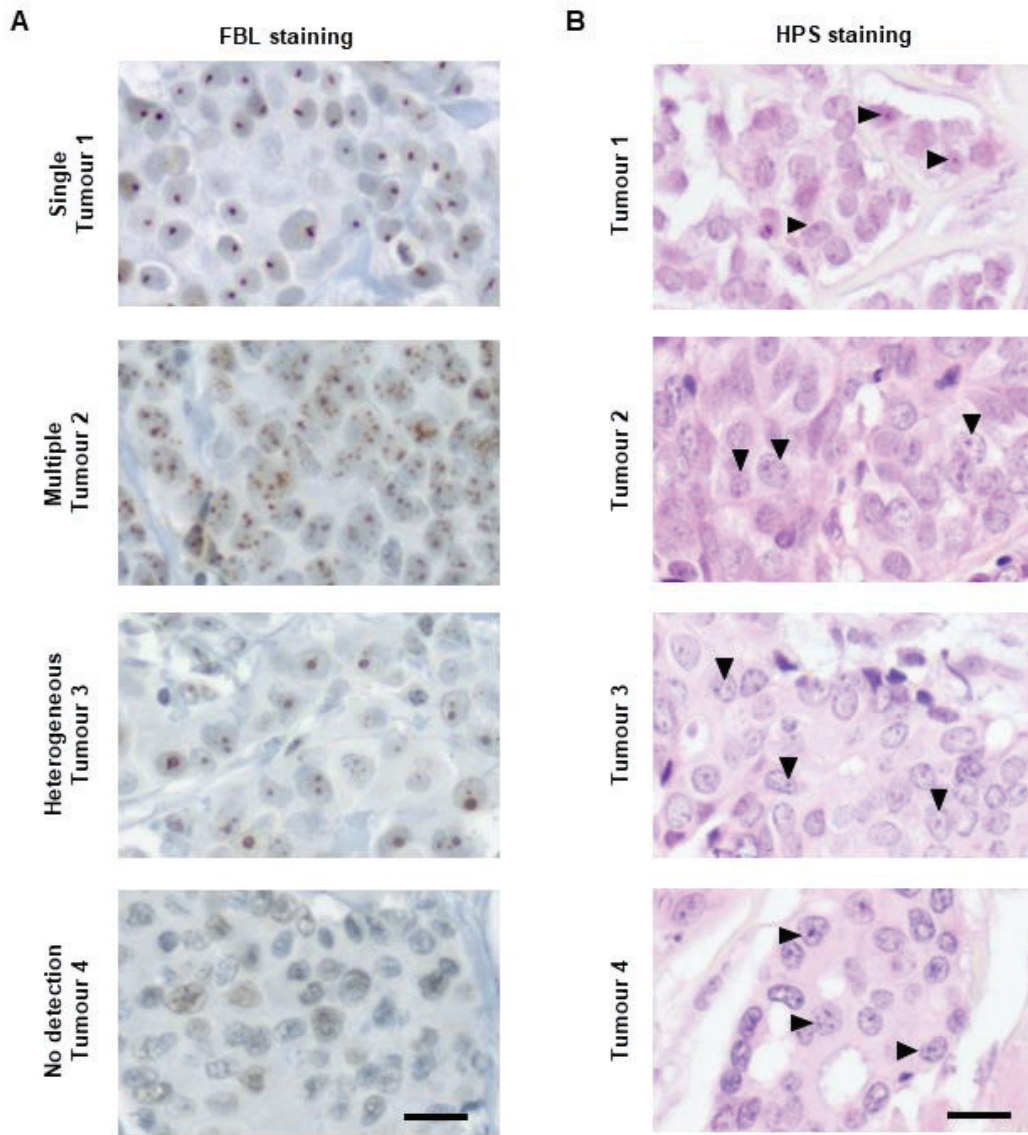
Supplementary Figure 13



Supplementary Figure 14

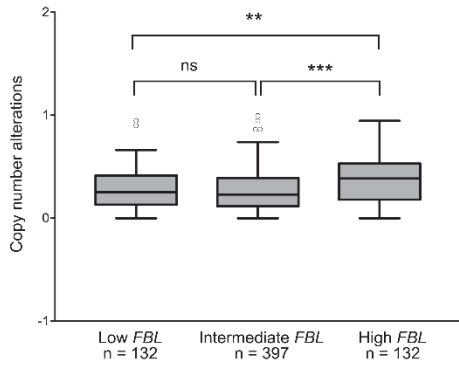


Supplementary Figure 15

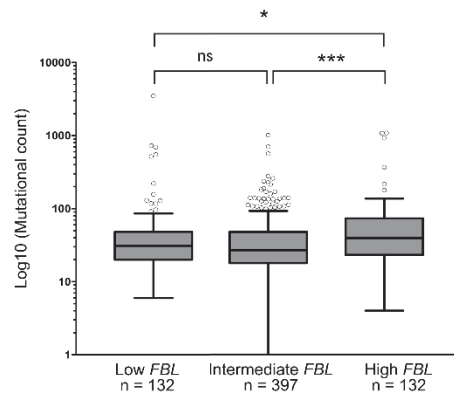


Supplementary figure 16

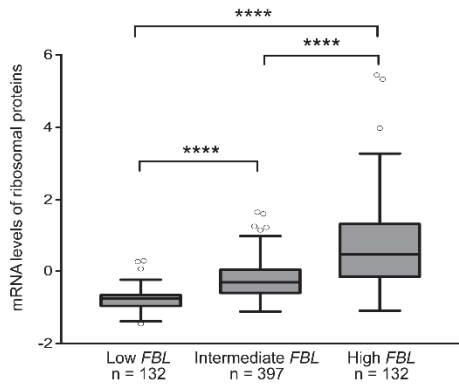
A



B

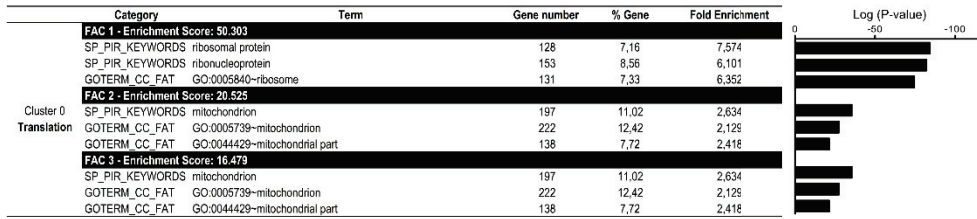


C

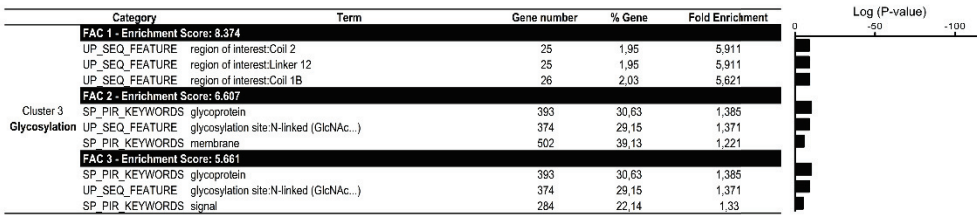


Supplementary figure 17

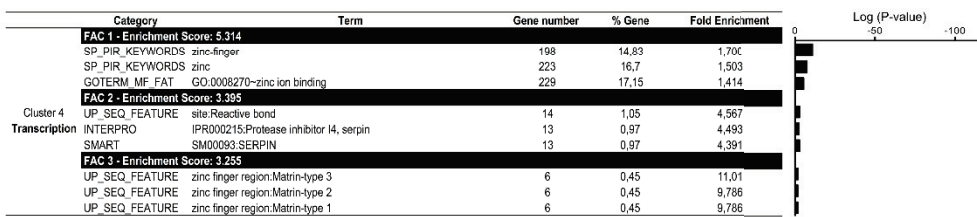
A



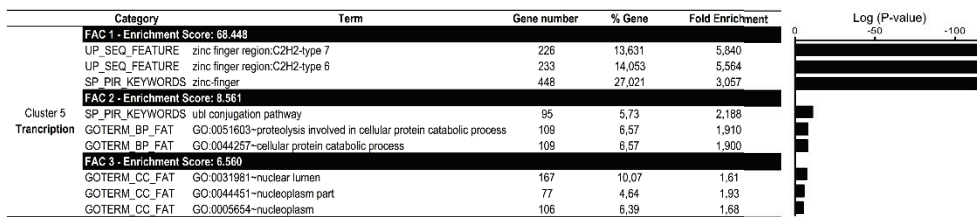
B



C



D



Supplementary figure 18

Supplementary Tables

Supplementary table 1 – List of human samples series

Series number	Institution	Sample numbers (n=)	Sample type
1	Tayside Tissue Bank of Dundee	216	Total RNA
2	The Cancer Genome Atlas	661	Total RNA
3	Centre Léon Bérard	434	Tissue MicroArray
4	Centre Léon Bérard	40	Total RNA Tissue
5	Institut Gustave Roussy	1773	MicroArray
6	Institut Gustave Roussy	199	Total RNA
7	Institut Curie	11	Total RNA

Supplementary table 2 – Patients characteristics of Dundee, IGR and TCGA RNA breast cancer series

	Dundee Series	IGR Series	TCGA Series
n	216	199	661
Age (years)			
Min	28	23	26
Max	90	93	90
Mean (SD)	60.2 (13.7)	63.3 (14.6)	58.1 (13.1)
Tumor size *			
Missing data	12	N/A	1
Small	117 (57.4%)		180 (27.3%)
Large	87 (42.6%)		480 (72.7%)
Lymph node invasion status			
Missing data			7
N = 0	98 (45.4%)	122 (61.3%)	334 (51.1%)
N > 1	118 (54.6%)	77 (38.7%)	320 (48.9%)
Tumor grade			
Missing data	5	1	
Grade 1	14 (6.6%)	30 (15.2%)	N/A
Grade 2	59 (28.0%)	83 (41.9%)	
Grade 3	138 (65.4%)	85 (42.9%)	
Tumor stage			
Missing data			8
Stage I	N/A	N/A	125 (19.1%)
Stage II			385 (59.0%)
Stage III			143 (21.9%)
Breast cancer histological subtypes			
Missing data	2		1
IDC	37 (17.2%)	N/A	501 (75.9%)
IDC + DCIS	141 (65.9%)		
ILC	4 (1.9%)		101 (15.3%)
ILC + LCIS	4 (1.9%)		
Others	28 (13.1%)		58 (8.8%)
ER status			
Missing data	2		42
Negative	70 (32.7%)	N/A	153 (24.7%)
Positive	144 (67.3%)		466 (75.3%)

	Dundee Series	IGR Series	TCGA Series
PR status			
Missing data	2		46
Negative	117 (54.7%)	N/A	205 (33.3%)
Positive	97 (45.3%)		410 (66.7%)
HER2 status			
Missing data	16		226
Negative	127 (63.5%)	N/A	342 (78.6%)
Positive	73 (36.5%)		93 (21.4%)
Intrinsic breast cancer subtypes			
Missing data	16		235
ER+ PR+/- HER2-	87 (43.5%)	160 (80.4%)	265 (62.2%)
ER+/- PR+/- HER2+	73 (36.5%)	13 (6.5%)	93 (21.8%)
ER- PR- HER2-	40 (18.5%)	26 (13.1%)	68 (16.0%)
Breast cancer molecular subtypes			
Missing data			
Normal-like			19
Luminal A	N/A	N/A	247 (38.5%)
Luminal B			200 (31.2%)
HER2 enriched			76 (11.8%)
Basal-like			119 (18.5%)

N/A, not applicable, when information were not available. * tumors considered as small when tumors size were inferior to 30 mm (Dundee series) and 20 mm (TCGA series); tumors considered as large when tumors size were superior to 30 mm (Dundee series) and 20 mm (TCGA series)

Supplementary table 3 – Association of standard prognostic factors with overall survival and disease-free survival by univariate Cox regression analyses

Dundee Series						
Variables	Overall survival			Disease-free survival		
	HR	CI 95%	P-value	HR	CI 95%	P-value
Tumor size						
< 30 mm	1.00		<0.0001	1.00		0.0002
≥ 30 mm	2.46	[1.61-3.73]		2.13	[1.43-3.17]	
Lymph node invasion status						
N = 0	1.00		0.0079	1.00		0.0034
N ≥ 1	1.77	[1.16-2.70]		1.82	[1.22-2.72]	
Intrinsic breast cancer subtypes						
ER+ PR+/- HER2-	1.00		0.0585	1.00		ns
ER+/- PR+/- HER2+	1.31	[0.80-2.13]		1.31	[0.82-2.07]	
ER- PR- HER2-	1.93	[1.12-3.32]		1.63	[0.96-2.77]	

HR, Hazard Ratio ; CI 95%, 95% of Confidence Interval ; ns, non significant

Supplementary table 4 – Nucleotide sequences of primers used for RT-qPCR experiments

Gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
β-Actin	TCCATCACGATGCCAGTG	CCAACCGCGAGAAGATGA
FBL-1	CCTGGGGAATCAGTTTATGG	CCAGGCTCGGTACTCAATTTT
FBL-2	CCTGCGTAATGGAGGACACT	GCTGAGGCTGTGGAGTCAAT
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
NHP2L1	GCTACTGGACCTCGTTCAGC	ACTCAGAGATGCCCTGTTG
NOP56	GAGGTGCCACGAGTGTATT	TGCTTCCTTCATGACATCCA
NOP58	CGGTTTCATGGGCTTCTTTTA	TGATGGAGGGCAAATCAAT
PGK1	AAGTGAAGCTCGGAAAGCTTCTAT	AGGGAAAAGATGCTTCTGGG
PPIA	GTCAACCCACCGTGTTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT

Supplementary table 5 - Multivariate-Cox analyses of *FBL* expression and standard prognostic factors with overall survival and disease-free survival using a second couple of primers for *FBL*

Variables	Dundee Series					
	Overall survival			Disease-free survival		
	HR	CI 95%	P-value	HR	CI 95%	P-value
<i>FBL-2</i>						
Intermediate	1.00			1.00		
Low	2.10	[1.27-3.47]	0.0066	1.83	[1.13-2.96]	0.0215
High	1.82	[1.07-3.11]		1.69	[1.02-2.80]	
Tumor size						
< 30 mm	1.00		<0.0001	1.00		<0.0001
≥ 30 mm	2.71	[1.77-4.17]		2.27	[1.51-3.40]	
Lymph node invasion status						
N = 0	1.00		0.0409	1.00		0.0201
N ≥ 1	1.58	[1.02-2.42]		1.63	[1.08-2.46]	

HR, Hazard Ratio ; CI 95%, 95% of Confidence Interval

Supplementary table 6 - Multivariate-Cox analyses of *Nop58* expression and standard prognostic factors with overall survival and disease-free survival

Dundee Series						
Variables	Overall survival			Disease-free survival		
	HR	CI 95%	P-value	HR	CI 95%	P-value
<i>NOP58</i>						
High	1.00		0.0179	1.00		0.0494
Low	1.78	[1.10-2.86]		1.59	[1.00-2.52]	
Tumor size						
< 30 mm	1.00		0.0001	1.00		0.0009
≥ 30 mm	2.28	[1.49-3.47]		1.97	[1.32-2.51]	
Lymph node invasion status						
N = 0	1.00		0.0296	1.00		0.0145
N ≥ 1	1.61	[1.05-2.48]		1.67	[1.11-2.51]	

HR, Hazard Ratio ; CI 95%, 95% of Confidence Interval

Supplementary table 7 – Association of *FBL* expression with distant disease-free survival by univariate Cox regression analyses

IGR Series			
Distant disease-free survival			
Variables	HR	CI 95%	P-value
<i>FBL</i>			
Intermediate	1.00		
Low	4.04	[1.32-12.40]	0.0150
High	3.14	[0.98-10.02]	0.0540

HR, Hazard Ratio ; CI 95%, 95% of Confidence Interval

Supplementary table 8 - Multivariate-Cox analyses of *FBL* expression and standard prognostic factors with distant disease-free survival

IGR Series			
Distant disease-free survival			
Variables	HR	CI 95%	P-value
<i>FBL</i>			
Intermediate	1.00		
Low	3.89	[1.07-14.11]	0.0390
High	3.92	[1.11-13.91]	0.0344
Tumor size			
[7.0-19.7]	1.00		
[19.7-25.0]	3.34	[0.65-17.20]	0.1497
[25.0-85.0]	5.91	[1.15-30.41]	0.0340
Lymph node invasion status			
N = 0	1.00		
N ≥ 1	2.56	[0.77-8.59]	0.1268
Tumor grade			
1	1.00		
2	3.28	[0.37-29.22]	0.2880
3	5.11	[0.56-46.70]	0.1481
Intrinsic breast cancer subtypes			
ER+ PR+/- HER2-	1.00		
ER+/- PR+/- HER2+	0.89	[0.17-4.66]	0.8890
ER- PR- HER2-	1.65	[0.31-8.85]	0.5594
Age (years)			
[22.6-56.5]	1.00		
[56.5-73.2]	0.26	[0.07-1.01]	0.05242
[73.2-93.4]	2.29	[0.87-5.99]	0.09219

HR, Hazard Ratio ; CI 95%, 95% of Confidence Interval

Supplementary table 9 – Patients characteristics of CLB and IGR tissues breast cancer series

	CLB Series		IGR Series	
n	434		1773	
Age				
Min	26		27	
Max	91		95	
Mean (SD)	58.6	(12.3)	60.6	(12.5)
Tumor size *				
Missing data				
Small	308	(71.0%)	1168	(65.9%)
Large	126	(29.0%)	605	(34.1%)
Lymph node invasion status				
Missing data	1		2	
N = 0	184	(42.5%)	1169	(66.0%)
N > 1	249	(57.5%)	602	(34.0%)
Tumor grade				
Missing data			2	
Grade 1	81	(18.7%)	444	(25.1%)
Grade 2	206	(47.5%)	823	(46.5%)
Grade 3	147	(33.9%)	504	(28.5%)
ER status				
Negative	56	(12.9%)	259	(14.6%)
Positive	378	(87.1%)	1514	(85.4%)
PR status				
Missing data			1	
Negative	109	(25.1%)	558	(31.5%)
Positive	325	(74.9%)	1214	(68.5%)
HER2 status				
Missing data	2		2	
Negative	396	(91.7%)	1588	(89.7%)
Positive	36	(8.3%)	183	(10.3%)
Intrinsic breast cancer subtypes[§]				
Missing data	2		2	
Luminal	377	(87.3%)	1401	(79.1%)
HER2 enriched	12	(2.8%)	183	(10.3%)
Triple Negative	43	(10%)	187	(10.6%)

* Tumors: small when tumors size < 30 mm (Dundee series) and 20 mm (IGR series); large when tumors size > 30 mm (Dundee series) and 20 mm (TCGA series)

§ Breast cancer intrinsic subtypes: CLB according to ER, PR, HER2 and SBR grade ; IGR according to ER, PR and HER2, luminal : ER+ PR+/- HER2-, HER2 enriched : ER+/- PR+/- HER2+, Triple Negative : ER- PR- HER2-

Supplementary table 10 – Comparison of patients characteristics between tumors with different *FBL* mRNA expression in Dundee breast cancer series

	All samples		Low FBL		Intermediate FBL		High FBL		P-value
n	216		44		129		43		
Age									
Min	28		28		30		35		0.251 ^Y
Max	90		84		88		90		
Mean (SD)	60	(13.7)	64	(13.5)	59	(13.0)	61	(15.5)	
Tumor Grade									
Missing data	5		1		3		1		0.522 ^Ψ
Grade 1	14	(6.6%)	1	(2.3%)	11	(8.7%)	2	(4.8%)	
Grade 2	59	(28%)	11	(25.6%)	38	(30.2%)	10	(23.8%)	
Grade 3	138	(65.4%)	31	(72.1%)	77	(61.1%)	30	(71.4%)	
Tumor size									
Missing data	12		1		10		1		0.940 ^δ
< 30 mm	117	(57.4%)	24	(55.8%)	68	(57.1%)	25	(59.5%)	
≥ 30 mm	87	(42.6%)	19	(44.2%)	51	(42.6%)	17	(40.5%)	
Lymph node invasion status									
N = 0	98	(45.4%)	19	(43.2%)	62	(48.1%)	17	(39.5%)	0.591 ^δ
N ≥ 1	118	(54.6%)	25	(56.8%)	67	(57.1%)	26	(60.5%)	
ER status									
Missing data	2		0		2		0		0.559 ^δ
Negative	70	(32.7%)	17	(38.6%)	41	(32.3%)	12	(27.9%)	
Positive	144	(67.3%)	27	(61.4%)	86	(67.7%)	31	(72.1%)	
PR status									
Missing data	2		0		2		0		0.053 ^δ
Negative	117	(54.7%)	27	(61.4%)	61	(48.0%)	29	(67.4%)	
Positive	97	(45.3%)	17	(38.6%)	66	(52.0%)	12	(32.6%)	
HER2 status									
Missing data	16		2		11		3		0.949 ^δ
Negative	127	(63.5%)	26	(61.9%)	76	(64.4%)	25	(62.5%)	
Positive	73	(36.5%)	16	(38.1%)	42	(35.6%)	15	(37.5%)	
Intrinsic breast cancer subtypes									
Missing data	16		2		11		3		0.991 ^δ
ER+ PR+/- HER2-	87	(43.5%)	17	(40.5%)	53	(44.9%)	17	(42.5%)	
ER+/- PR+/- HER	73	(36.5%)	16	(38.1%)	42	(35.6%)	15	(37.5%)	
ER- PR- HER2-	40	(20.0%)	9	(21.4%)	23	(19.5%)	8	(20.0%)	

P-value was assessed by Y : Kruskal-Wallis test ; Ψ : Fischer Exact test ; δ : Chi-2 test ; § : Wilcoxon test

Supplementary table 11 – Comparison of patients characteristics between tumors with FBL staining and low FBL staining in CLB breast tumors series

	All samples		Low FBL staining		FBL staining		P-value
n	389		33		356		
Age							
Min	26		42		26		0.012[§]
Max	91		91		91		
Mean (SD)	58.6	(12.5)	64.4	(12.5)	58.1	(12.4)	
Tumor Grade							
Grade 1	65	(16.7%)	3	(9.1%)	62	(17.4%)	0.184 ^ψ
Grade 2	189	(48.6%)	14	(42.4%)	175	(49.2%)	
Grade 3	135	(34.7%)	16	(48.5%)	119	(33.4%)	
Tumor size							
< 30 mm	275	(70.7%)	18	(54.5%)	257	(72.2%)	0.033^δ
≥ 30 mm	114	(29.3%)	15	(45.5%)	99	(27.8%)	
Carcinoma in situ							
Yes	324	(83.3%)	21	(63.6%)	303	(85.1%)	0.002^δ
No	65	(16.7%)	12	(36.4%)	53	(14.9%)	
Nervous invasion							
No	328	(84.3%)	23	(69.7%)	305	(85.7%)	0.016^δ
Yes	61	(15.7%)	10	(30.3%)	51	(14.3%)	
ER status							
Negative	50	(12.9%)	7	(21.2%)	43	(12.1%)	0.134 ^δ
Positive	339	(87.1%)	26	(78.8%)	313	(87.9%)	
PR status							
Negative	98	(25.2%)	11	(33.3%)	87	(24.4%)	0.260 ^δ
Positive	291	(74.8%)	22	(66.7%)	269	(75.6%)	
HER2 status							
Negative	358	(92.0%)	29	(87.9%)	329	(92.4%)	0.319 ^ψ
Positive	31	(8.0%)	4	(12.1%)	27	(7.6%)	
Intrinsic breast cancer subtypes							
Luminal A	207	(53.2%)	13	(39.4%)	194	(54.5%)	
Luminal B	132	(33.9%)	13	(39.4%)	119	(33.4%)	
HER2 enriched	12	(3.1%)	3	(9.1%)	9	(2.5%)	
Triple Negative	38	(9.8%)	4	(12.1%)	34	(9.6%)	

P-value was assessed by Y : Kruskal-Wallis test ; ψ : Fischer Exact test ; δ : Chi-2 test ; § : Wilcoxon test

Supplementary table 12 – Comparison of patients characteristics between tumors with FBL staining and low FBL staining in IGR breast tumors series

	All samples		Low FBL staining		FBL staining		P-value*
n	1759		212		1547		
Menopause							
No	452	(26%)	49	(23.6%)	403	(26.4%)	0.3851
Yes	1284	(74%)	159	(76.4%)	1125	(73.6%)	
Tumor Grade							
Grade 1	441	(25.1%)	45	(21.4%)	396	(25.6%)	0.0869
Grade 2	815	(46.4%)	92	(43.8%)	723	(46.7%)	
Grade 3	501	(28.5%)	73	(34.8%)	428	(27.7%)	
ER status							
Negative	257	(14.6%)	56	(26.4%)	201	(13.0%)	<0.0001
Positive	1502	(85.4%)	156	(73.6%)	1346	(87.0%)	
PR status							
Negative	554	(31.5%)	93	(43.9%)	461	(29.8%)	<0.0001
Positive	1204	(68.5%)	119	(56.1%)	1085	(70.2%)	
HER2 status							
Negative	1575	(89.6%)	191	(90.1%)	1384	(89.6%)	0.8175
Positive	182	(10.4%)	21	(9.9%)	161	(10.4%)	
Intrinsic breast cancer subtypes							
ER+ PR+/- HER2-	1390	(79.1%)	149	(70.3%)	1241	(80.3%)	<0.0001
ER+/- PR+/- HER2+	182	(10.4%)	21	(9.9%)	161	(10.4%)	
ER- PR- HER2-	185	(10.5%)	42	(19.8%)	143	(9.3%)	

* P-value assessed by Chisq test

II. Article 2 : Druggable Nucleolin Identifies Breast Tumours Associated with Poor Prognosis That Exhibit Different Biological Processes

Druggable Nucleolin Identifies Breast Tumours Associated with Poor Prognosis That Exhibit Different Biological Processes. Nguyen Van Long F, Lardy-Cleaud A, Bray S, Chabaud S, Dubois T, Diot A, Thompson AM, Bourdon JC, Perol D, Bouvet P, Diaz JJ, Marcel V. **Cancers (Basel).** 2018 Oct 22;10(10).

1. Contexte

En plus d'une altération de la qualité des ribosomes, la quantité des ribosomes est altérée dans les cancers (Pelletier et al., 2017). Cette altération de la production des ribosomes résulte généralement d'une hyperactivation de la synthèse des ARNr et donc de la biogenèse des ribosomes qui permet aux cellules cancéreuses de maintenir leur croissance et leur prolifération cellulaire (Barna et al., 2008; Bruno et al., 2017). La Nucléoline (NCL) est une protéine nucléolaire dont le rôle dans la biogenèse est aujourd'hui bien connue (Ugrinova et al., 2018). La protéine NCL est importante dans la régulation de la synthèse des ARNr. En effet, elle favorise l'accès de l'ARN Pol I aux ADNr soit par l'activation du remodelage de la chromatine soit par la stabilisation des structures G-quadruplexes des ADNr (Angelov et al., 2006; Cong et al., 2012; Drygin et al., 2009). Ainsi, la NCL pourrait être utilisée comme substitut de la variation de production des ribosomes.

L'utilisation de la technique de qPCR moyen-débit (Fluidigm) m'a permis de quantifier l'expression de 16 facteurs impliqués dans la production et/ou la composition des ribosomes, dont *FBL* et *NCL*. Parmi les différents facteurs analysés et en plus de *FBL*, *NCL* présentait des altérations d'expression au niveau ARNm dans les tumeurs mammaires suggérant une dérégulation de la synthèse des ARNr. Ainsi, pour démontrer l'existence d'altérations de la production des ribosomes dans les tumeurs mammaires, nous avons déterminé si :

les altérations d'expression de *NCL* dans les tumeurs mammaires sont associées à des caractéristiques cliniques particulières




Dans ce projet, comme pour l'article 1, j'ai mis au point la technique de qPCR moyen-débit, et généré les différentes données d'expression issues de l'analyse des cohortes. J'ai suivi et

participé aux prises de décision concernant les analyses statistiques effectuées par les collaborateurs biostatisticiens. Et j'ai participé au montage des figures de ce papier.

2. Version PDF de l'article publié

Article

Druggable *Nucleolin* Identifies Breast Tumours Associated with Poor Prognosis That Exhibit Different Biological Processes

Flora Nguyen Van Long ¹, Audrey Lardy-Cleaud ², Susan Bray ³, Sylvie Chabaud ², Thierry Dubois ⁴, Alexandra Diot ⁵, Lee B. Jordan ⁶, Alastair M. Thompson ^{5,7}, Jean-Christophe Bourdon ⁵, David Perol ², Philippe Bouvet ^{1,8} , Jean-Jacques Diaz ^{1,*,†}  and Virginie Marcel ^{1,*,†} 

¹ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, CEDEX 08, 69373 Lyon, France; floranvl@gmail.com (F.N.V.L.); philippe.bouvet@ens-lyon.fr (P.B.)

² Department of Clinical Research, Léon Bérard Cancer Centre, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France; audrey.lardy-cleaud@lyon.unicancer.fr (A.L.-C.); sylvie.chabaud@lyon.unicancer.fr (S.C.); david.perol@lyon.unicancer.fr (D.P.)

³ Tayside Tissue Bank, Ninewells Hospital and Medical School, NHS Tayside, Dundee DD1 9SY, Scotland, UK; s.e.bray@dundee.ac.uk

⁴ Breast Cancer Biology Group, Translational Research Department, PSL Research University, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; thierry.dubois@curie.fr

⁵ Division of Cancer Research, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee DD1 9SY, Scotland, UK; A.Z.Diot@dundee.ac.uk (A.D.); alastair.thompson@bcm.edu (A.M.T.); j.bourdon@dundee.ac.uk (J.-C.B.)

⁶ Department of Pathology, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee DD1 9SY, UK; l.jordan@dundee.ac.uk

⁷ Olga Keith Wiess Chair of Surgery, Dan L. Duncan Breast Center, Division of Surgical Oncology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

⁸ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, CEDEX 07, 69342 Lyon, France

* Correspondence: JeanJacques.DIAZ@lyon.unicancer.fr (J.-J.D.); virginie.marcel@lyon.unicancer.fr (V.M.); Tel.: +33-42655-2819 (J.-J.D.); +33-42655-6745 (V.M.)

† Co-senior authors.

Received: 31 July 2018; Accepted: 18 October 2018; Published: 22 October 2018



Abstract: *Background:* Nucleolin (NCL) is a multifunctional protein with oncogenic properties. Anti-NCL drugs show strong cytotoxic effects, including in triple-negative breast cancer (TNBC) models, and are currently being evaluated in phase II clinical trials. However, few studies have investigated the clinical value of *NCL* and whether *NCL* stratified cancer patients. Here, we have investigated for the first time the association of *NCL* with clinical characteristics in breast cancers independently of the different subtypes. *Methods:* Using two independent series ($n = 216$; $n = 661$), we evaluated the prognostic value of *NCL* in non-metastatic breast cancers using univariate and/or multivariate Cox-regression analyses. *Results:* We reported that *NCL* mRNA expression levels are markers of poor survivals independently of tumour size and lymph node invasion status ($n = 216$). In addition, an association of *NCL* expression levels with poor survival was observed in TNBC ($n = 40$, overall survival (OS) $p = 0.0287$, disease-free survival (DFS) $p = 0.0194$). Transcriptomic analyses issued from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database ($n = 661$) revealed that breast tumours expressing either low or high *NCL* mRNA expression levels exhibit different gene expression profiles. These data suggest that tumours expressing high *NCL* mRNA levels are different from those expressing low *NCL* mRNA levels. *Conclusions:* *NCL* is an independent marker of prognosis in breast cancers. We anticipated that anti-NCL is a promising therapeutic strategy that could rapidly be evaluated in high *NCL*-expressing tumours to improve breast cancer management.

Keywords: nucleolin; breast cancer; prognostic marker; triple-negative breast cancer

1. Introduction

The expression level of hormonal and growth receptors remains one of the strongest prognostic biomarkers driving management of breast cancer. The identification of breast cancer subtypes, which present distinct prognosis associated with particular expression patterns of receptors, has indeed allowed the development of efficient anti-cancer therapies targeting the differentially expressed receptors [1]. However, triple-negative breast cancers that exhibit reduced expression of *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2)* and hormonal oestrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), are still an on-going challenge since the standard chemotherapy-based treatment has shown only limited objective response and elevated relapse events. Novel stratification's markers and druggable targets are urgently needed for such breast cancer patients.

One opportunity could arise from nucleolin (NCL), a multifunctional protein. *NCL* is involved in several molecular processes, including regulation of ribosome biogenesis, transcription by RNA polymerase II, DNA repair or centrosome formation [2]. *NCL* is hence involved in numerous biological functions controlling cellular homeostasis through modulation of cell proliferation, apoptosis, and cell survival. Recent studies also demonstrated the role of *NCL* in angiogenesis, epithelial-to-mesenchymal transition, and stemness [3,4]. In agreement with *NCL* properties, several in vitro and in vivo studies had reported an oncogenic effect of *NCL* that appears to be multifactorial, reflecting its multiple functions [4].

Several drugs targeting *NCL* have been developed that specifically induced cell death of tumour cells [2,5,6]. Among them, two anti-*NCL* have been evaluated in clinical trials. Since the toxico-kinetic evaluation of the antagonistic peptide N6L showed accurate results on solid tumours during a phase I/IIa clinical trial (NCT01711398), a phase II is currently under preparation. In contrast, the *NCL*-targeted DNA aptamer AS1411 has shown only limited efficacy in a phase II clinical trial on unselected patients with advanced stage of renal cell carcinoma: only one patient out of the 35 enrolled ones showed dramatic reduction of tumour burden [7]. Interestingly, most of the anti-*NCL* therapies have been evaluated in vitro and in vivo using triple-negative breast cancer models and showed strong cytotoxic effects, making *NCL* a powerful candidate for future evaluation of anti-*NCL* in breast cancer [6]. Indeed, the antibody 4LB5 inhibiting *NCL* activity decreased MDA-MB-231 cell viability, clonogenicity, and tumour growth in xenografts while inducing apoptosis [8]. In addition, the peptides F3 and HB19 have been shown to significantly reduce tumour growth using MDA-MB-435 and MDA-MB-231 xenografts models, respectively [9,10]. Anti-*NCL* therapies could thus represent a novel opportunity for breast cancer, and in particular for triple-negative breast cancer patients.

At present, the role of *NCL* in cancer is supported only by few studies using human samples that showed the association of *NCL* expression with poor overall survival both in solid and liquid cancers [6,11–13]. In breast cancer, only two studies investigated *NCL* expression. It has been reported that *NCL* is often overexpressed in breast tumours compared to normal tissues and that *NCL* overexpression is associated with poor overall survival in HER2-amplified breast cancer [14,15]. Additional studies are required to evaluate more extensively the clinical value of *NCL* expression in order to understand the role of *NCL* in breast cancer.

2. Results

2.1. Association of *NCL* mRNA Levels with Overall and Disease-Free Survival in Breast Cancer

To evaluate the prognostic value of *NCL* in non-metastatic breast cancer, we quantified *NCL* mRNA expression levels by RT-qPCR in the Dundee series of 216 primary breast tumours (Table 1, All samples). Since we decided to perform survival association's study without initial hypothesis

regarding alteration of *NCL* in breast tumours, we performed preliminary study to determine a cut-off based on the distribution of *NCL* expression. The quartile distribution was first analysed (Figure S1A). We observed three groups of quartiles (Q2, Q3/Q4, and Q1). We thus used tercile distribution and confirmed a *NCL*-based stratification in three groups (Figure S1B). Finally, since we would like to identify only the true “low” and the true “high”, we thus divided patients in three groups bearing tumours expressing either low (0–20%), intermediate (20–80%), or high *NCL* levels (80–100%).

Table 1. Population distribution of Dundee series regarding nucleolin (*NCL*) expression levels.

Characteristics	All Samples (<i>n</i> = 216)	Low <i>NCL</i> (<i>n</i> = 44)	Intermediate <i>NCL</i> (<i>n</i> = 129)	High <i>NCL</i> (<i>n</i> = 43)	<i>p</i> -Value
Age					
Median	59.0	58.5	59.0	60.0	0.557 #
(min–max)	(28–90)	(28–78)	(31–90)	(35–88)	
Invasive grade					
No data	5	2	2	1	0.013 §
Grade 1	14 (6.6%)	0 (0.0%)	8 (6.3%)	6 (14.3%)	
Grade 2	59 (28.0%)	7 (16.7%)	42 (33.1%)	10 (23.8%)	
Grade 3	138 (65.4%)	35 (83.3%)	77 (60.6%)	26 (61.9%)	
Tumour size (mm)					
<i>n</i>	204	42	120	42	0.641 #
Median	28.0	28.5	28.0	26.0	
(min–max)	(5–110)	(11–80)	(7–110)	(5–110)	
Invaded lymph node					
No (<i>n</i> = 0)	98 (45.4%)	21 (47.7%)	58 (45.0%)	19 (44.2%)	0.936 †
Yes (<i>n</i> ≥ 1)	118 (54.6%)	23 (52.3%)	71 (55.0%)	24 (55.8%)	
ER status					
No data	2	0	2	0	<0.001 †
Negative	70 (32.7%)	25 (56.8%)	34 (26.8%)	11 (25.6%)	
Positive	144 (67.3%)	19 (43.2%)	93 (73.2%)	32 (74.4%)	
PR status					
No data	2	0	2	0	0.005 †
Negative	117 (54.7%)	31 (70.5%)	58 (45.7%)	28 (65.1%)	
Positive	97 (45.3%)	13 (29.5%)	69 (54.3%)	15 (34.9%)	
HER2 status					
No data	16	2	11	3	0.579 †
Negative	127 (63.5%)	24 (57.1%)	78 (66.1%)	25 (62.5%)	
Positive	73 (36.5%)	18 (42.9%)	40 (33.9%)	15 (37.5%)	
Intrinsic breast cancer subtype					
No data	16	2	11	3	0.105 †
ER+ PR+/- HER2-	87 (43.5%)	11 (26.2%)	58 (49.2%)	18 (45.0%)	
ER+/- PR+/- HER2+	73 (36.5%)	18 (42.9%)	40 (33.9%)	15 (37.5%)	
ER- PR- HER2-	40 (20.0%)	13 (31.0%)	20 (16.9%)	7 (17.5%)	

Kruskal-Wallis test, § Fisher exact test, † Chi-2 test. PR: progesterone receptor; ER: oestrogen receptor.

Using Kaplan–Meier survival curves and Log-rank tests, we observed that the expression levels of *NCL* were associated to overall and disease-free survivals (Log-rank: overall survival (OS) $p = 0.0068$; disease-free survival (DFS) $p = 0.0023$) (Figure 1A,B). Patients with tumours expressing high *NCL* levels had poorer overall and disease-free survival than patients with tumours expressing intermediate *NCL* levels. Unexpectedly, we also observed that patients with tumours expressing low *NCL* levels had poorer overall and disease-free survivals than patients with tumours expressing intermediate *NCL* levels. Similar significant associations were observed with both overall and disease-free survivals using univariate Cox regression models ($p = 0.0083$ and $p = 0.0030$, respectively) (Table S3). Importantly, the low *NCL*-expressing group was associated with a higher hazard ratio compared to the intermediate *NCL*-expressing group (Low: OS hazard ratio (HR) = 2.13, 95% confidence interval (95% CI) = (1.30–3.48); DFS HR = 2.20, 95% CI = (1.37–3.52)). A same tendency even if not significant is observed for the high-versus intermediate *NCL*-expressing group (High: OS HR = 1.49, 95% CI 95% = (0.90–2.46); DFS HR = 1.60, 95% CI = (1.00–2.58)) (Table S3). However, it has to be noted that these observations relied on a limited number of samples.

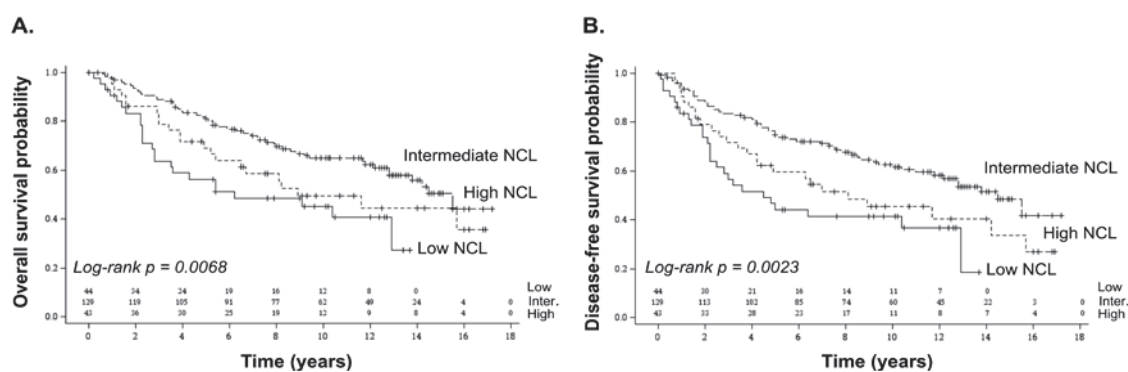


Figure 1. Association of *NCL* expression levels with poor prognosis in breast cancer using Dundee series. A significant association was observed between *NCL* expression levels and overall (A) as well as disease-free survivals (B). Association between *NCL* expression levels and survival was analysed using Kaplan–Meier representation. Number of subjects at risk is indicated on the graph for the three *NCL* groups (low; intermediate; high). Log-rank p -value ≤ 0.05 was used to determine significant association.

When compared to 11 healthy mammary tissues, *NCL* mRNA expression levels of the healthy donors were not significantly different from the low *NCL*-expressing group, while they were significantly lower than in the high *NCL*-expressing groups (Figure S2). It suggests that high *NCL* expression levels corresponded to *NCL* overexpression compared to normal tissues (Figure S2). A second independent series corresponding to a TCGA dataset of 661 primary breast tumours was used (Table S1). Since the TCGA dataset corresponds to RNA-seq data and Dundee dataset to RT-qPCR data, we could not compare their expression values nor use an absolute cut-off. Thus, cut-off defined using Dundee series was used for TCGA series. As for Dundee series, a similar tendency was observed, low and high *NCL* expression levels being associated with poor overall and disease-free survival (OS $p = 0.1084$; DFS $p = 0.2658$) (Figure S3). The lack of significance could arise from the short follow-up median of TCGA series (2.81 years; minimum (min): 0; maximum (max): 23.6) compared to the one of Dundee series (12.4 years; min: 0; max: 17.2) as well as from the difference in clinical characteristics, such as the variation of tumours proportion in intrinsic breast cancer subtypes (Tables 1 and S1).

To definitively assess whether *NCL* is a prognostic marker in non-metastatic breast cancer, we performed multivariate Cox regression models using Dundee series on *NCL* mRNA expression levels and robust clinical prognostic factors, including tumour size, lymph node invasion status and intrinsic breast cancer subtypes. While the “intrinsic breast cancer subtypes” parameter remained non-significant, the other parameters (*NCL*, size, and lymph node invasion) remained in the model. *NCL* levels therefore remained associated with both overall and disease-free survivals even after adjustment on tumour size and lymph node invasion (Table 2). Interestingly, in overall survival, *NCL* allowed for discriminating the most aggressive breast tumours exhibiting large size at diagnosis (Figure S4). Indeed, this analysis suggests that patients who carry small breast tumours (<30 mm) expressing high *NCL* levels had a poorer overall survival compared to patients who carry small breast tumours but expressing intermediate *NCL* levels for example. *NCL* thus allows for improving the current breast cancer patient stratification based on tumour size. These data indicated that *NCL* mRNA expression level is an independent marker of prognosis, even when compared to the most robust clinical prognostic factors (tumour size and lymph node invasion status).

Table 2. Multivariate Cox models in Dundee series.

Variable		Overall Survival			Disease-Free Survival		
		HR	95% CI	p-Value	HR	95% CI	p-Value
NCL	Intermediate	1.00			1.00		
	Low	2.31	(1.39–3.85)		2.32	(1.43–3.78)	
	High	1.55	(0.93–2.58)	0.0044	1.67	(1.03–2.71)	0.0019
Tumour size	<30 mm	1.00			1.00		
	≥30 mm	2.53	(1.66–3.85)	<0.0001	2.17	(1.46–3.23)	0.0001
Invaded lymph nodes	n = 0	1.00			1.00		
	n ≥ 1	1.60	(1.04–2.46)	0.0320	1.68	(1.12–2.53)	0.0130

HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval.

2.2. Characterization of Breast Tumours Expressing Either Low or High NCL mRNA Levels

Distribution of clinical parameters between the three groups of NCL expression was then compared to determine whether the breast tumours expressing low or high NCL levels, both associated with the poorest survivals, shared common traits (Table 1). While mean age, tumour size and invaded lymph node status at diagnosis showed no significant change in distribution among the three NCL groups, invasive grade and ER/PR status were significantly different. We noticed that tumours expressing low levels of NCL mRNA corresponded to 80% to grade 3 tumours, indicative of aggressive tumours with a high proliferation rate and poorly differentiated. In contrast, tumours expressing intermediate and high NCL levels corresponded to only 60% to grade 3 tumours. We also observed that the low NCL-expressing group mainly corresponded to patients carrying ER-negative tumours (about 57% compared to 26% for the intermediate- and high NCL-expressing groups). Finally, both low and high NCL-expressing groups mainly corresponded to patients with PR-negative tumours compared to the intermediate-NCL-expressing group (70.5% and 65.1% respectively compared to 46%). From the clinical point of view, low- and high NCL-expressing breast tumours appeared different.

To further compare tumours expressing low and high NCL levels, we analysed gene expression profiles in these different tumours. Although survival association with NCL expression was not significant in TCGA series but nevertheless showed the same tendency than Dundee series, we used TCGA series for such analysis since the whole transcriptome datasets are available. Clustering approaches revealed that four out of 10 gene-based clusters exhibited different expression profiles between tumours expressing low or high NCL levels (Figure S5). Among them, one cluster was enriched in transcription-related genes, whose expression was higher in tumours expressing high NCL levels compared to the ones expressing low NCL levels. This was expected knowing the role of NCL in regulating transcription and proliferation (Cluster 8, Figures S5 and S6, Table S4). Moreover, low NCL tumours expressed higher levels of genes involved in immunity and cell adhesion compared to high NCL tumours (Clusters 6 and 7, Figures S5 and S6, Table S4). Overall, these clinical and biological data suggested that tumours with low and high NCL expression levels corresponded to distinct types of tumours.

2.3. Prognostic Value of NCL in Breast Cancer Subtypes

Since NCL mRNA expression level was associated with hormonal status, we investigated whether NCL prognostic value was dependent upon breast cancer subtype. Using Dundee series, Kaplan–Meier curves were plotted for the three main intrinsic breast cancer subtypes (ER+ PR+ / – HER2– corresponding to the luminal subtype; ER+ / – PR+ / – HER2+ to a HER2-amplified subtype; and ER– PR– HER2– to a triple-negative subtype). The affiliation of each tumour to one of the three NCL-expressing groups (low, intermediate, high) was not re-evaluated for each subtype but conserved regarding the entire population. No significant association were observed between NCL expression levels and both overall and disease-free survivals in the ER– PR+ / – HER2– and ER+ / – PR+ / –

HER2+ breast cancer subtypes (Figure 2A–D). In contrast, a significant association, however based on a small number of TNBC patients ($n = 40$), was observed in ER– PR– HER2– breast cancer subtype (Figure 2E,F). Patients carrying ER– PR– HER2– breast tumours expressing high NCL levels had poorer overall and disease-free survivals compared to the ones carrying ER– PR– HER2– breast tumours expressing intermediate NCL levels. A similar tendency was observed for tumours expressing low NCL mRNA levels. Altogether, these data suggest that NCL could be a prognostic marker in triple-negative breast cancers.

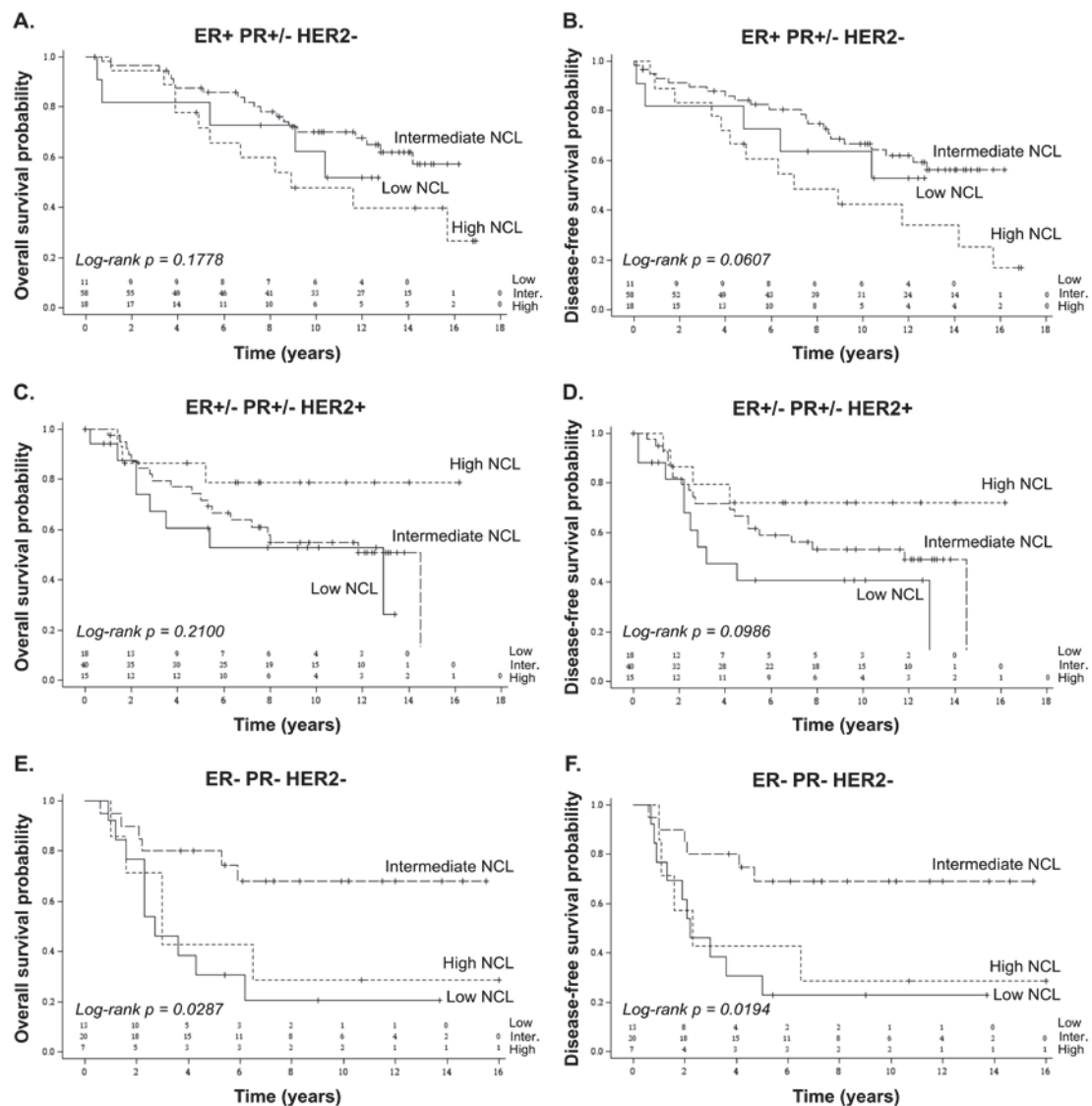


Figure 2. Association of NCL expression levels with poor prognosis in breast cancer subtypes using Dundee series. Overall (A,C,E) and disease-free survivals (B,D,F) in relation to NCL expression levels were analysed in tumours exhibiting different hormonal status: ER+ PR+/- HER2- (equivalent to the luminal subtype, A,B); ER+/- PR+/- HER2+ (equivalent to the HER2 subtype, C,D); and ER- PR- HER2- (equivalent to the triple-negative subtype, E,F). While NCL expression levels were not associated with survivals in patients carrying ER+ PR+/- HER2- and ER+/- PR+/- HER2+ tumours, associations were observed between NCL expression levels and both overall and disease-free survivals in patients bearing ER- PR- HER2- tumours. The association between NCL expression levels and survival was analysed using Kaplan–Meier representation. Number of subjects at risk is indicated on the graph for the three NCL groups (low; intermediate; high). Log-rank p -value ≤ 0.05 was used to determine significant association.

3. Discussion

Although most of studies dedicated to determine the clinical value of *NCL* have been performed in neuroepithelial tumours, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), hepatocellular carcinoma (HCC), and leukaemia, few have been performed in breast cancer. Here, we show that *NCL* expression level is an independent marker of prognosis in breast cancer. Patients bearing tumours expressing high *NCL* mRNA levels, but also unexpectedly the ones expressing low *NCL* mRNA levels, had poorer overall and disease-free survivals than other breast cancer patients even when adjusted to two robust clinical factors, tumour size and lymph node invasion status. Moreover, it appears that tumours expressing low or high *NCL* levels corresponded to distinct tumours both from the clinical and biological point of views.

Up to now and as far as we know, only one study reported an association between *NCL* expression and overall survival in breast cancer. Using the TCGA dataset, Wolfson and colleagues showed that patients carrying HER2-amplified tumours with high *NCL* expression levels had shorter overall and disease-free survivals than the ones carrying HER2-amplified tumours with low *NCL* expression levels [14]. In our hand, no association was observed in HER2-amplified breast cancers in Dundee series. This discrepancy could first be explained by difference in clinical characteristics between Dundee and TCGA series, in particular regarding repartition of intrinsic breast cancer subtypes (ER+/- PR- HER2+: Dundee 36.5% vs. TCGA 21.8%) (Tables 1 and S1), and choice of cut-off. Second, HER2 status in TCGA dataset was lacking or uncertain for several patients (about 226, Table S1). It might thus induce a bias regarding this specific cancer subtype in TCGA series. This is why we did not use TCGA series to determine whether *NCL* prognostic value was dependent upon breast cancer subtype.

A second study reported that *NCL* expression level was over-expressed in mammary tumours compared to normal tissues using both immunohistochemistry (IHC) in a panel of eight normal/tumour pairs and NanoString-quantified mRNA levels in 57 normal vs. 183 triple-negative breast cancer [15]. A recent review reported similar observations on small series [6]. These data are concordant with our observation that tumours of the high *NCL*-expressing group expressed more *NCL* mRNA levels than healthy mammary tissues. Interestingly, Pichiorri and colleagues also observed in a panel of 70 triple-negative breast cancers using IHC that, in addition to the 30% of tumours showing high *NCL* staining, *NCL* was not detected in about 20% of tumours [15]. Although we did not know why *NCL* was not detected in this study, this observation nevertheless supported the existence of tumours with low expression of *NCL*. We observed that low *NCL* breast tumours express similar mRNA levels than normal mastectomy tissues issued from a small cohort ($n = 11$). From this point of view, *NCL* exhibits the same characteristics as ER, PR, and HER2 biomarkers, for which negative scoring corresponds to expression similar to the that of normal tissue even though they are essential for clinical stratification of breast cancer. Pichiorri and colleagues did not analyse the survival of patients carrying mammary tumours expressing these different *NCL* protein expression levels, thus preventing comparison with our conclusion on survival association. Due to the limit of our data that only focused on *NCL* mRNA level but also on the limited numbers of breast tumour samples, further clinical studies will be required to analyse correlation of *NCL* mRNA and protein expression levels in breast tumours. In particular, additional studies will be required to demonstrate the existence of tumours lacking *NCL* expression and the association between low *NCL* mRNA levels and poor survival.

As observed in our data, it has been reported in a series of 69 stage II PDACs that low level of nucleoli *NCL* expression was a marker of poor prognosis independently of age at diagnosis, tumour size, differentiation, and lymph node invasion status [16]. These data support the association of low *NCL* expression levels with poor survival after adjustment with robust prognostic factors, at least in some cancer types. Indeed, in other cancer types, such as HCC, neuroepithelial cancers, lung cancers, and acute myeloid leukaemia, high *NCL* expression levels have been associated with poor survival [11,12,17,18]. Overall, it suggests that low and high *NCL* expression levels can be marker of poor prognosis depending on the biological context. Interestingly, the series used in our study are

enriched in early breast cancer. Indeed, more than 85% of the breast cancer patients present a tumour size that is inferior to 50 mm size which is generally used to define early breast cancers. Altogether, it suggests that low and high *NCL* expression levels could be a prognostic marker of early breast cancer able to identify at early stage, patients with poor prognosis.

In vitro and in vivo studies revealed that oncogenic effects of *NCL* can have multimodal origins reflecting the multifunctional properties of *NCL* in the different subcellular compartments [4]. Following this line, it has been reported that decrease of *NCL* mRNA levels mainly reduced expression of surface and cytoplasmic *NCL* protein without affecting the one of nuclear *NCL* [5], suggesting that depending on *NCL* expression levels distinct functions of *NCL* could be involved. Our data indicated that mammary tumours expressing low or high *NCL* levels had different clinical characteristics (i.e., tumour grade and ER/PR hormonal status), supporting association with distinct *NCL*-dependent functions. Transcriptomic analysis indeed revealed that low *NCL* tumours expressed high levels of genes involved in immunity and cell adhesion compared to high *NCL* tumours. Interestingly, we recently reported that *NCL* silencing was associated with an up-regulation of genes involved in inflammation response in HeLa cells and with increased number of centrosome-like structures in U2OS cells [19,20].

Overall, our data open up interesting opportunities in clinics. First, several promising anti-*NCL* drugs have been developed to fight liquid and solid cancers that are currently evaluated in clinical trials phase II [2,5–10]. Compared to intermediate and low *NCL*-expressing tumours, tumours expressing high *NCL* are the most prone to respond to anti-*NCL* drugs. Identifying high *NCL*-expressing tumours could thus be viewed as an indispensable companion test for anti-*NCL* drugs, in particular in TNBC for which efficient therapy is still lacking. Based on the poor survival rate associated with low *NCL*-expressing tumours, one could be afraid that reducing *NCL* activity in tumours would have deleterious effects. However, our data suggest that tumours expressing low and high *NCL* levels exhibit not reverse but distinct clinical characteristics and gene expression patterns. Thus, we can expect that inhibition of *NCL* activity in high *NCL*-expressing tumours will not promote acquisition of a “low *NCL*-expressing tumour”-like phenotype but rather cell death, as reported in numerous studies. Second, the discovery that *NCL* is an independent marker of prognosis even after adjustment on the current gold-standard factors used in clinics for prognosis suggests that *NCL* could be an interesting biomarker for treatment decisions. Indeed, one of the remaining issues in breast cancer is to identify patients that exhibit poor survival even when presenting the “good” prognostic factors at diagnosis (i.e., small tumour size, no lymph node, or non-TNBC breast cancer subtypes). Such patients could benefit from treatment protocols usually reserved to more aggressive tumours. In this line, our multivariate analyses suggest that *NCL* could be used as a marker to improve treatment decision. For example, patients with small tumour size at diagnosis exhibit different survival rates depending on the *NCL* expression levels (Figure S4). Patients expressing low or high *NCL* levels showed a poorer survival rate than the ones expressing intermediate *NCL* levels, suggesting that the former could benefit from treatment protocol usually reserved for large tumours. In combination with the current gold-standard markers, the usage of *NCL* as biomarker could improve the current patient management. Moreover, since tumours expressing low *NCL* levels showed an increased expression in genes involved in inflammation and immunity, these tumours might benefit from the emerging immuno-therapies.

4. Materials and Methods

4.1. Human Breast Cancer and Healthy Donor Samples

A series of 216 total RNA issued from primary breast tumours were collected at diagnosis from untreated female patients without metastasis and snap-frozen after macrodissection by a breast cancer pathologist (Tayside Tissue Bank (TTB), Dundee, Scotland, UK) [21]. Histological tumour grades and lymph node invasion were determined by breast cancer pathologists (Table 1). Hormonal status were determined by immunohistochemistry on sections of FFPE tumours [21]. Clinical data were

collected and maintained by the TTB (last update 2016) that received ethical approval (REC Reference 07/S1402/90). A second series of 661 samples was extracted from the “Breast Invasive Carcinoma (TCGA, *Cell* 2015)” dataset of the public database cBioPortal on the basis of the following characteristics: female patients, primary breast cancer, no metastasis at diagnosis, no family history, no neoadjuvant treatment, and availability of RNA expression profile (Table S1) [22]. A third series of 11 healthy mammary tissues obtained from plastic surgery has been collected [23]. This series was approved by the Bioethic Law No. 2004-800, the Ethic Charter from the French National Institute of Cancer (INCa), and the ethics committee of Institut Curie.

4.2. RT-qPCR Analyses

RT was carried out using M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Invitrogen, Waltham, MA, USA). *NCL* expression levels were quantified by real-time qPCR using BioMark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) (Table S2) (See Supplementary Materials and Methods for more details). Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, using Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen, Hilden, Germany) as control sample and *GAPDH* as housekeeping gene (Figure S7). Expression levels were measured on two independent sets of triplicates.

4.3. Statistical Analyses

Cut-offs of *NCL* expression levels were determined using quartile/tercile-based overall survival. Descriptive statistics were used to summarize patients' initial characteristics. Between-group comparisons were performed using a Chi-2's or Fisher's exact test for categorical data and *t*-test or nonparametric Kruskal–Wallis' test for continuous data. Overall survival (OS) corresponded to timing from date of diagnosis to either death or last follow-up for censored patients. Disease-free survival (DFS) corresponded to timing from date of diagnosis to either relapse, death (if no relapse had been observed) or last follow-up for censored patients. Survival curves for OS and DFS with associated log-rank tests were generated using the Kaplan Meier method. Cox proportional hazards model was used to investigate confounding factors predicting for OS and DFS. In order to adjust for confounding factors a multivariate Cox models was performed. Variables sufficiently informed (less than 10% missing value) and significant at a 10% level in univariate analyses were included in a backward selection procedure to keep factors significant at a 5% level in the final multivariate model. All *p*-values corresponded to two-tailed *p*-values. A *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using either SAS v9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) or GraphPad Prism v7.0a softwares (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4.4. Transcriptomic Analyses

In addition to the clinical data and *NCL* expression extracted from the TCGA database, mRNA expression z-scores (RNA Seq V2 RSEM) were extracted from database cBioPortal for Cancer Genomics for the 661 identified breast tumours then divided in the three groups based on *NCL* expression (low, intermediate and high). Two-rounds of clustering analyses were performed using k-means clustering approach (See Supplementary Materials and Methods for additional details). A first clustering was performed independently in the three groups of *NCL* expression to identify tumours within the three *NCL*-based groups that exhibit similar expression profiles. A second clustering was performed on the three groups by conserving the previously identified tumour clustering to identify putative difference in gene expression between the three *NCL*-based breast tumours. Finally, gene ontology was performed on gene list issued from each cluster identified in this double k-mean clustering using DAVID tools (functional annotation clustering) [24].

5. Conclusions

Although breast cancer management has greatly improved in the last decade, a successful therapeutic strategy is still lacking for some breast cancer patients. In this study, we report that

NCL is an independent prognostic marker in non-metastatic breast cancers. Our data bring the first clinical clue that *NCL* could be not only an useful biomarker to better stratify breast cancer patients when combined with the current gold-standard biomarkers, but also a promising target for *NCL*-overexpressing breast tumours to improve breast cancer management.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/10/390/s1>, Figure S1: Cut-off determination for *NCL* expression using the Dundee series, Figure S2: Comparison of *NCL* expression levels in tumours and healthy donors, Figure S3: Association of *NCL* expression levels with survivals of breast cancer patients using the TCGA series, Figure S4: Discrimination of the most aggressive breast tumours with large size at diagnosis using *NCL* expression, Figure S5: Comparison of gene expression profiles between the three *NCL* expressing groups of breast tumours in TCGA series, Figure S6: Gene ontology analysis on the clusters for which gene expression is different between low and high *NCL*-expressing breast tumours, Figure S7: Determination of the most stable housekeeping gene in our study to normalize RT-qPCR analyses, Table S1: Characteristics of patients issued from the TCGA dataset, Table S2: Nucleotide sequences of primers used in the study, Table S3: Univariate Cox regression models for survival in the Dundee series, Table S4: Full gene ontology analysis.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.; Acquisition of data, collection, Analysis and interpretation of data: L.B.J.; Data curation, F.N.V.L. and S.B.; Formal analysis, A.L.-C.; S.C.; and D.P.; Funding acquisition, P.B.; J.-J.D. and V.M.; Investigation, F.N.V.L.; Project administration, V.M.; Resources, S.B.; T.D.; A.D.; A.M.T. and J.-C.B.; Supervision, S.C.; D.P.; J.-J.D.; and V.M.; Visualization, F.N.V.L.; A.L.-C.; and V.M.; Writing—original draft, F.N.V.L.; J.-J.D. and V.M.; Writing—review and editing, F.N.V.L.; A.L.-C.; S.B.; S.C.; T.D.; A.D.; A.M.T.; J.-C.B.; D.P.; P.B.; J.-J.D. and V.M.

Funding: This research was funded by PAIR Sein program (ARC_INCa_LNCC_7625), Fondation ARC (20161204686 and 20171206356) and Ligue Contre le Cancer Comités Allier and Saône-et-Loire (PPE 2016). F.N.V.L. was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). A.D. and J.-C.B. are supported by Breast Cancer Now fellowship (2012MaySF127). The Tayside Tissue Bank is supported by the Chief Scientist Office (CSO), NHS, and Dundee University.

Acknowledgments: We thank BioCOS Life Sciences for bioinformatics. We gratefully acknowledge the contribution to this publication made by the Tayside Tissue Bank (TTB, Dundee, Scotland, UK).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Cardoso, F.; Harbeck, N.; Barrios, C.H.; Bergh, J.; Cortés, J.; El Saghir, N.; Francis, P.A.; Hudis, C.A.; Ohno, S.; Partridge, A.H.; et al. Research needs in breast cancer. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 208–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Berger, C.M.; Gaume, X.; Bouvet, P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* **2015**, *113*, 78–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gilles, M.-E.; Maione, F.; Cossutta, M.; Carpentier, G.; Caruana, L.; Di Maria, S.; Houppé, C.; Destouches, D.; Shchors, K.; Prochasson, C.; et al. Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 7181–7193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ugrinova, I.; Petrova, M.; Chalabi-Dchar, M.; Bouvet, P. Multifaceted Nucleolin Protein and Its Molecular Partners in Oncogenesis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2018**, *111*, 133–164. [[PubMed](#)]
- Hovanessian, A.G.; Soundaramourty, C.; El Khoury, D.; Nondier, I.; Svab, J.; Krust, B. Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gregório, A.C.; Lacerda, M.; Figueiredo, P.; Simões, S.; Dias, S.; Moreira, J.N. Meeting the needs of breast cancer: A nucleolin's perspective. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2018**, *125*, 89–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rosenberg, J.E.; Bambury, R.M.; Van Allen, E.M.; Drabkin, H.A.; Lara, P.N.; Harzstark, A.L.; Wagle, N.; Figlin, R.A.; Smith, G.W.; Garraway, L.A.; et al. A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 178–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Palmieri, D.; Richmond, T.; Piovan, C.; Sheetz, T.; Zanesi, N.; Troise, F.; James, C.; Wernicke, D.; Nyei, F.; Gordon, T.J.; et al. Human anti-nucleolin recombinant immunoagent for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 9418–9423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Christian, S.; Pilch, J.; Akerman, M.E.; Porkka, K.; Laakkonen, P.; Ruoslahti, E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 871–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Destouches, D.; El Khoury, D.; Hamma-Kourbali, Y.; Krust, B.; Albanese, P.; Katsoris, P.; Guichard, G.; Briand, J.P.; Courty, J.; Hovanessian, A.G. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Guo, X.; Xiong, L.; Yu, L.; Li, R.; Wang, Z.; Ren, B.; Dong, J.; Li, B.; Wang, D. Increased level of nucleolin confers to aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Diagn. Pathol.* **2014**, *9*, 175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Marcel, V.; Catez, F.; Berger, C.M.; Perrial, E.; Plesa, A.; Thomas, X.; Mattei, E.; Hayette, S.; Saintigny, P.; Bouvet, P.; et al. Expression Profiling of Ribosome Biogenesis Factors Reveals Nucleolin as a Novel Potential Marker to Predict Outcome in AML Patients. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Qiu, W.; Zhou, F.; Zhang, Q.; Sun, X.; Shi, X.; Liang, Y.; Wang, X.; Yue, L. Overexpression of nucleolin and different expression sites both related to the prognosis of gastric cancer. *APMIS* **2013**, *121*, 919–925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wolfson, E.; Goldenberg, M.; Solomon, S.; Frishberg, A.; Pinkas-Kramarski, R. Nucleolin-binding by ErbB2 enhances tumorigenicity of ErbB2-positive breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 65320–65334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pichiorri, F.; Palmieri, D.; De Luca, L.; Consiglio, J.; You, J.; Rocci, A.; Talabere, T.; Piovan, C.; Lagana, A.; Cascione, L.; et al. In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 951–968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Peng, L.; Liang, J.; Wang, H.; Song, X.; Rashid, A.; Gomez, H.F.; Corley, L.J.; Abbruzzese, J.L.; Fleming, J.B.; Evans, D.B.; et al. High levels of nucleolar expression of nucleolin are associated with better prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3734–3742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ridley, L.; Rahman, R.; Brundler, M.-A.; Ellison, D.; Lowe, J.; Robson, K.; Prebble, E.; Lockett, I.; Gilbertson, R.J.; Parkes, S.; et al. Children’s Cancer and Leukaemia Group Biological Studies Committee Multifactorial analysis of predictors of outcome in pediatric intracranial ependymoma. *Neuro Oncol.* **2008**, *10*, 675–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhao, H.; Huang, Y.; Xue, C.; Chen, Y.; Hou, X.; Guo, Y.; Zhao, L.; Hu, Z.H.; Huang, Y.; Luo, Y.; et al. Prognostic significance of the combined score of endothelial expression of nucleolin and CD31 in surgically resected non-small cell lung cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kumar, S.; Gomez, E.C.; Chalabi-Dchar, M.; Rong, C.; Das, S.; Ugrinova, I.; Gaume, X.; Monier, K.; Mongelard, F.; Bouvet, P. Integrated analysis of mRNA and miRNA expression in HeLa cells expressing low levels of Nucleolin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gaume, X.; Tassin, A.-M.; Ugrinova, I.; Mongelard, F.; Monier, K.; Bouvet, P. Centrosomal nucleolin is required for microtubule network organization. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 902–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bourdon, J.-C.; Khoury, M.P.; Diot, A.; Baker, L.; Fernandes, K.; Aoubala, M.; Quinlan, P.; Purdie, C.A.; Jordan, L.B.; Prats, A.-C.; et al. p53 mutant breast cancer patients expressing p53 γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ciriello, G.; Gatza, M.L.; Beck, A.H.; Wilkerson, M.D.; Rhie, S.K.; Pastore, A.; Zhang, H.; McLellan, M.; Yau, C.; Kandoth, C.; et al. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* **2015**, *163*, 506–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Maire, V.; Baldeyron, C.; Richardson, M.; Tesson, B.; Vincent-Salomon, A.; Gravier, E.; Marty-Prouvost, B.; De Koning, L.; Rigai, G.; Dumont, A.; et al. TTK/hMPS1 is an attractive therapeutic target for triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Supplementary Materials: Druggable *Nucleolin* Identifies Breast Tumours Associated with Poor Prognosis that Exhibit Different Biological Processes

Flora Nguyen Van Long, Audrey Lardy-Cleaud, Susan Bray, Sylvie Chabaud, Thierry Dubois, Alexandra Diot, Alastair M. Thompson, Jean-Christophe Bourdon, David Perol, Philippe Bouvet, Jean-Jacques Diaz and Virginie Marcel

1. Supplementary Materials and Methods

1.1. Human Breast Cancer and Healthy Donor Samples

The first series (termed Dundee series) corresponds to a series of 216 primary breast tumours issued from the Tayside Tissue Bank (TTB, Dundee, Scotland, UK). Tumours were collected at diagnosis from untreated female patients without metastasis and snap-frozen after macrodissection by breast cancer pathologists [1]. At diagnosis, these patients showed no family history. Histological tumour grades and lymph node invasion were determined by breast cancer pathologists (Table 1). Grades were assigned from 1 to 3 based on their differentiation and proliferative status. Lymph node invasion was assigned as positive when at least one invaded lymph node was identified at diagnosis. Hormonal status (ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor) and HER2 receptor were determined by immunohistochemistry on sections of FFPE tumour samples [1]. Hormonal status was used to identify the three intrinsic breast cancer subtypes: ER+ PR+/- HER2-, considered as equivalent to luminal subtype; ER+/- PR+/- HER2+, equivalent to HER2-amplified subtype; and ER- PR- HER2-, as triple-negative subtype (TNBC). Clinical data were collected and maintained by the TTB (last update 2016). The Dundee series exhibited expected clinical characteristics, in particular association of overall survival with tumour size, lymph node invasion and intrinsic breast cancer subtypes, as already described [1]. TTB has received ethical approval for samples and data collection (REC Reference 07/S1402/90). Total RNA were extracted from frozen tissues as already described by TTB services [1]. RNA quality was determined using the Bioanalyzer 2100™ (Agilent Technologies): samples for which the 28S/18S ratio was inferior to 1.2 were not included in this study as already reported [1].

The second series (termed TCGA series) corresponds to a series extracted from the “Breast Invasive Carcinoma (TCGA, *Cell* 2015)” dataset of the public database cBioPortal for Cancer Genomics [2]. From the 818 available samples in the dataset, we compiled a series of 661 tumours with the following characteristics: female patient, primary breast cancer, no metastasis at diagnosis, no family history, no neoadjuvant treatment and availability of RNA expression profiles (determined by RNA-seq analysis). However, among the 661 samples, some data were missing regarding hormonal status and relapse for example, explaining the difference of total sample number in Kaplan-Meier curves (Table S1 and Figure S3). For RNA expression, mRNA expression z-scores (RNA Seq V2 RSEM) was used as normalized quantification.

A series of 11 healthy mammary tissues obtained from plastic surgery, have been collected [3]. Total RNA were extracted from frozen tissues as previously described.

1.2. RT-qPCR Analyses

200ng of total RNA were retro-transcribed (RT) using M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Invitrogen, Waltham, MA, USA). *NCL* expression levels were quantified by real-time qPCR using BioMark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA). A multiplex PCR was first performed on cDNA using genes of interest primers (Table S2) and Pre-Amp Master Mix (Fluidigm), followed by an Exonuclease I treatment (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) according to the Fluidigm instructions. After this first step of pre-amplification, cDNA were diluted at 1:5 in Tris-EDTA buffer 1× (Promega, Fitchburg, WI, USA). Gene expression was quantified using

Master Mix 2× EvaGreen (BioRad, Hercules, CA, USA), GE 48.48 Dynamic Array DNA Binding Dye Sample & Assay Loading Reagent kit (Fluidigm) and primers detailed in Table S2, as already described [4]. Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method by the Fluidigm Real-Time PCR analysis software (v3.1.3, Fluidigm), using Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen, Hilden, Germany) as control sample for inter-run normalization and *GAPDH* as housekeeping gene. RefFinder tool was used to identify the most stable gene among three potential housekeeping genes [5]. Each sample was subjected to two independent rounds of RT and each RT products were quantified in triplicate in two independent runs of qPCR. Statistical analyses were performed using mean values.

1.3. Statistical Analyses and Graphical Representations

Cut-offs of *NCL* expression levels were determined using population distribution-based overall survival in the Dundee series of 216 patients. To perform an analysis without hypothesis regarding the association of *NCL* expression with survival association and identify cut-off, the quartile distribution was first analysed. Since we observed 3 groups (Q2, Q3/Q4 and Q1), a tercile distribution was used. Furthermore, the tercile distribution allowed to gain into statistical power, thus allowing to reinforce our conclusion. Finally, since we would like to identify only the true “low” and the true “high”, we used the population distribution based on 3 groups: tumours expressing low *NCL* expression levels that corresponds to [0–20%] of *NCL* expression levels; tumours expressing intermediate *NCL* expression levels that corresponds to]20–80%] of *NCL* expression levels; and tumours expressing high *NCL* expression levels that corresponds to]80–100%] of *NCL* expression levels. The same cut-off was applied on the TCGA series. Descriptive statistics were used to summarize patients’ initial characteristics. Between-group comparisons were performed using a Chi-2’s or Fisher’s exact test for categorical data and *t* test or non-parametric Kruskal-Wallis’ test for continuous data. Overall survival (OS) corresponded to the timing from date of diagnosis to either death or last follow-up for censored patients. Disease-free survival (DFS) corresponded to the timing from date of diagnosis to either relapse, death (if no relapse had been observed) or last follow-up for censored patients. Survival curves for OS and DFS with associated log-rank tests were generated using the Kaplan-Meier method (“Proc lifetest” function of SAS9.4 software). Survival median has been estimated using the inverted Kaplan-Meier method. Cox proportional hazards model was used to investigate confounding factors predicting for OS and DFS. The variables included in the model were: lymph node invasion status, tumour size and intrinsic breast cancer subtype. Variables sufficiently informed (less than 10% missing value in univariate analyses) and significant at a 10% level were included in a backward selection procedure to keep factors significant at a 5% level in the final multivariate model. Comparison of *NCL* expression levels between the three *NCL*-based groups of breast tumours with healthy donors was performed using non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests

All *p*-values corresponded to two-tailed *p*-values. A *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using either SAS v9.4 (SAS Institute) or GraphPad Prism v7.0a softwares (GraphPad Software, Inc). Graphical representations were depicted using GraphPad Prism software.

1.4. Transcriptomic Analyses

In addition to the clinical data and *NCL* expression extracted from the TCGA database, mRNA expression z-scores (RNA Seq V2 RSEM) for all genes were extracted from database cBioPortal for Cancer Genomics for the 661 identified breast tumours then divided in the three groups based on *NCL* expression (“low”, “intermediate” and “high”). K-mean clustering has been done in two steps on these three *NCL* expression-based groups. First, k-mean clustering has been performed on each group (“low”, “intermediate”, “high”) individually on both column wise (“samples”) and row wise (“genes”). Number of clusters used were 5 for samples and 10 for genes. In-house R script (<https://www.r-project.org/>) was written for k-mean clustering using “K-mean” function of the “amap” package (<https://cran.r-project.org/web/packages/amap/index.html>) with the distance

calculation as Pearson correlation (parameters: method = “pearson”, number of clusters = 10 for genes and 5 for samples). Second, these k-mean clustered on both samples and genes of the first step were concatenated as high, low and intermediate *NCL* groups. On these concatenated data, a second k-mean clustering was performed but only on genes with number of clusters as 10. Other parameters were equivalent to the ones used in the first step. Z-scores of the k-mean clusters issued from the second step were then arranged in cluster wise using the perl script. This clustered z-scores of the samples was used to plot an heatmap using the heatmap.2 function of the R packages gplots and RColorBrewer. Finally, gene ontology was performed on gene list issued from each identified clustered in this double k-mean clustering using DAVID tools (functional annotation clustering) [6].

2. Supplementary Figures

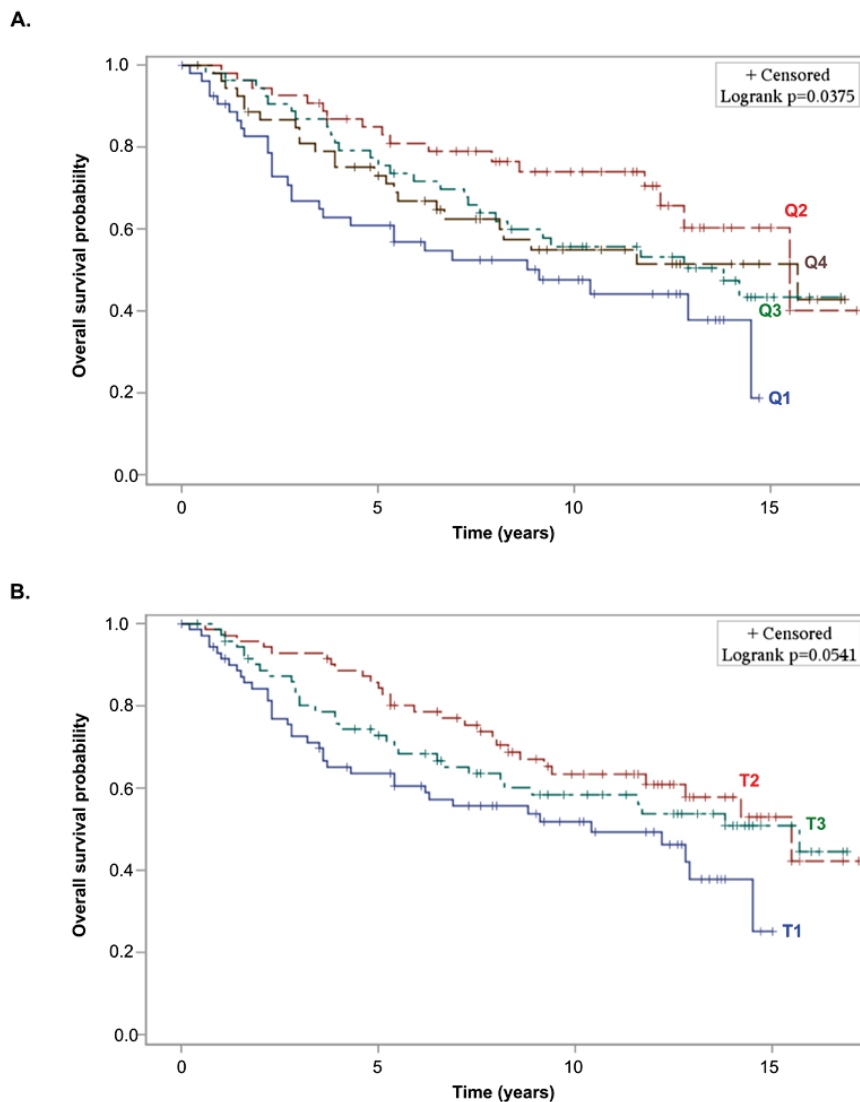


Figure S1. Cut-off determination for *NCL* expression using the Dundee series. Association between *NCL* mRNA expression levels and overall survival was analyzed in the Dundee series using Kaplan-Meier representation with two different cut-offs based either on quartile (**A**) or tercile (**B**) distribution. In the two conditions, patients carrying a tumour expressing either the lowest or the highest *NCL* mRNA levels had the poorest overall survival. Q: 4 groups based on quartile; T: 3 groups based on tercile. Log-rank p -value ≤ 0.05 was used to determine significant association.

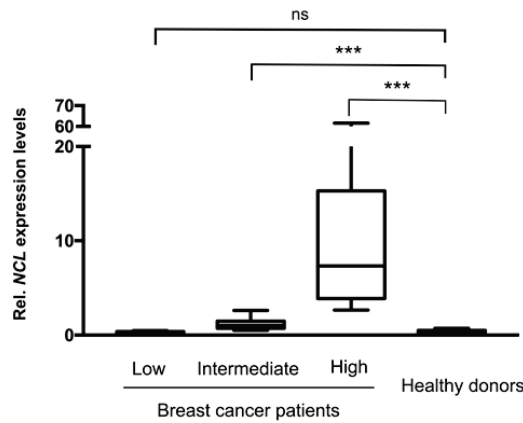


Figure S2. Comparison of *NCL* expression levels in tumours and healthy donors. Relative expression levels of *NCL* were compared in mammary tissues issued from healthy donors to that one of three groups of breast tumours identified as expressing different *NCL* expression levels (low, intermediate and high). *NCL* expression levels were significantly higher in “intermediate” and “high” groups, whereas no significant difference was observed between the “low” group and healthy donors. These data suggest that the “high” and “intermediate” groups, but not the “low” group, over-expressed *NCL* compared to healthy donors. ns: not significant. Kruskal-Wallis test p -value < 0.0001. ***: Mann-Whitney test p -value < 0.0001.

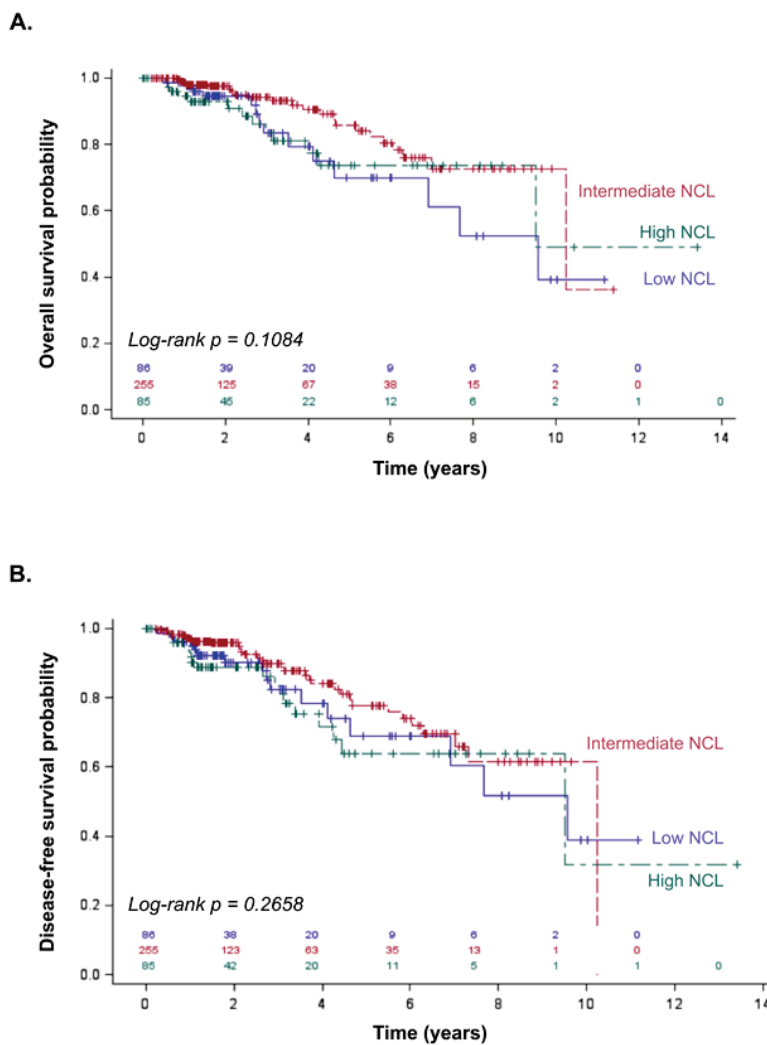
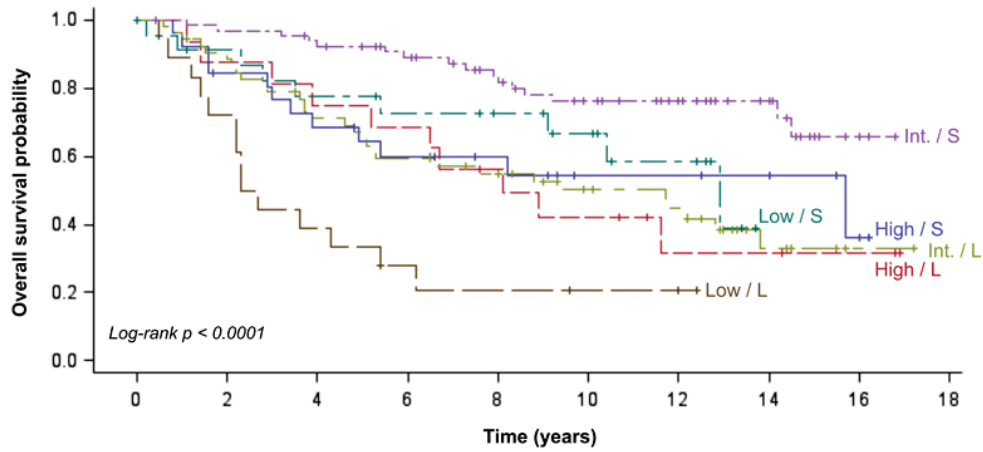


Figure S3. Association of *NCL* expression levels with survivals of breast cancer patients using TCGA series. Analyses of overall (A) and disease-free survivals (B) in all breast cancer patients. Using cut-off determined with the Dundee series, association between *NCL* expression levels and

survivals were analysed in the TCGA validation series. The curves' tendency suggests an association was observed between *NCL* expression levels and overall survival, while no association was observed in disease-free survival. Number of subjects at risk is indicated on the graph for the three *NCL* groups (low; intermediate; high). Log-rank p -value ≤ 0.05 was used to determine significant association.



NCL / Size

High / S	26	21	17	14	11	6	6	5	2	0
High / L	16	14	12	11	8	6	3	3	2	0
Low / S	24	20	17	15	13	10	6	0		
Low / L	18	13	7	4	3	2	2	0		
Int. / S	67	64	61	54	46	38	30	17	3	0
Int. / L	53	47	36	30	26	19	16	6	1	0

Figure S4. Discrimination of the most aggressive breast tumours with large size at diagnosis using *NCL* expression. Association between tumour size and *NCL* expression levels with overall survival was analysed in the Dundee series using Kaplan-Meier curves. Patients carrying large breast tumours (≥ 30 mm) and expressing low *NCL* expression levels presented a poorer overall survival compared to patients carrying large breast tumours but expressing either intermediate or high *NCL* expression levels. Number of subjects at risk is indicated on the graph for the six groups combining different *NCL* expression levels (low; inter.: intermediate; high) and tumour size (S: small, < 30 mm; L: large, ≥ 30 mm). Log-rank p -value ≤ 0.05 was used to determine significant association.

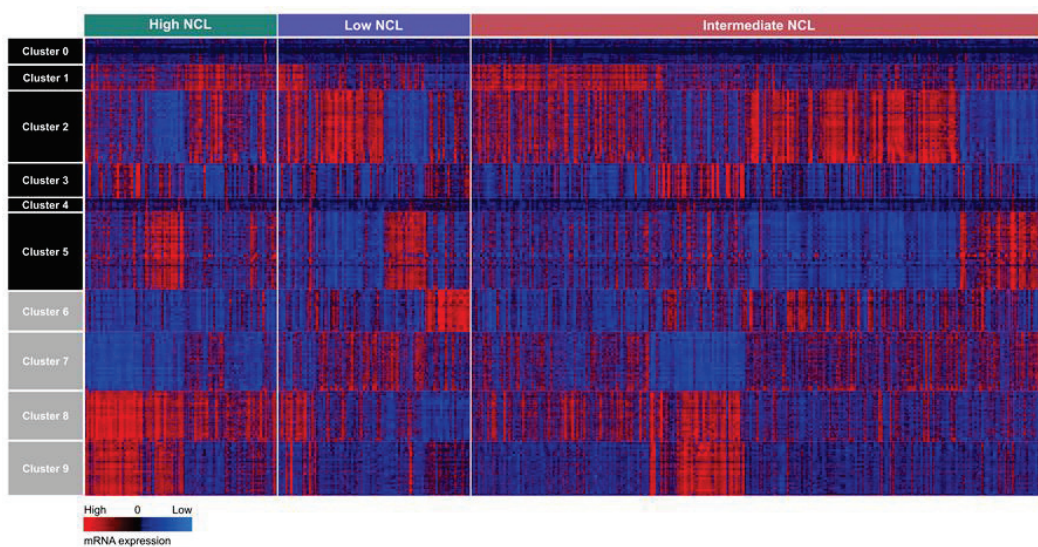


Figure S5. Comparison of gene expression profiles between the three *NCL* expressing groups of breast tumours in TCGA series. Heatmap was generated using transcriptome datasets extracted from the TCGA database for the 661 breast tumours. Columns correspond to breast tumour samples that have been grouped according to *NCL* expression (high, low and intermediate). Rows

correspond to genes that were assembled in ten clusters (from 0 to 9) using the k-means approach. Gene expression profiles between the low and high *NCL* expressing breast tumours showed difference in global mRNA levels in four clusters: 6, 7, 8 and 9 (grey). These data suggest that the *NCL* expressing breast tumours are different from each other. Gene expression scale is given at the bottom of the figure (Blue: low expression level; red: high expression level).

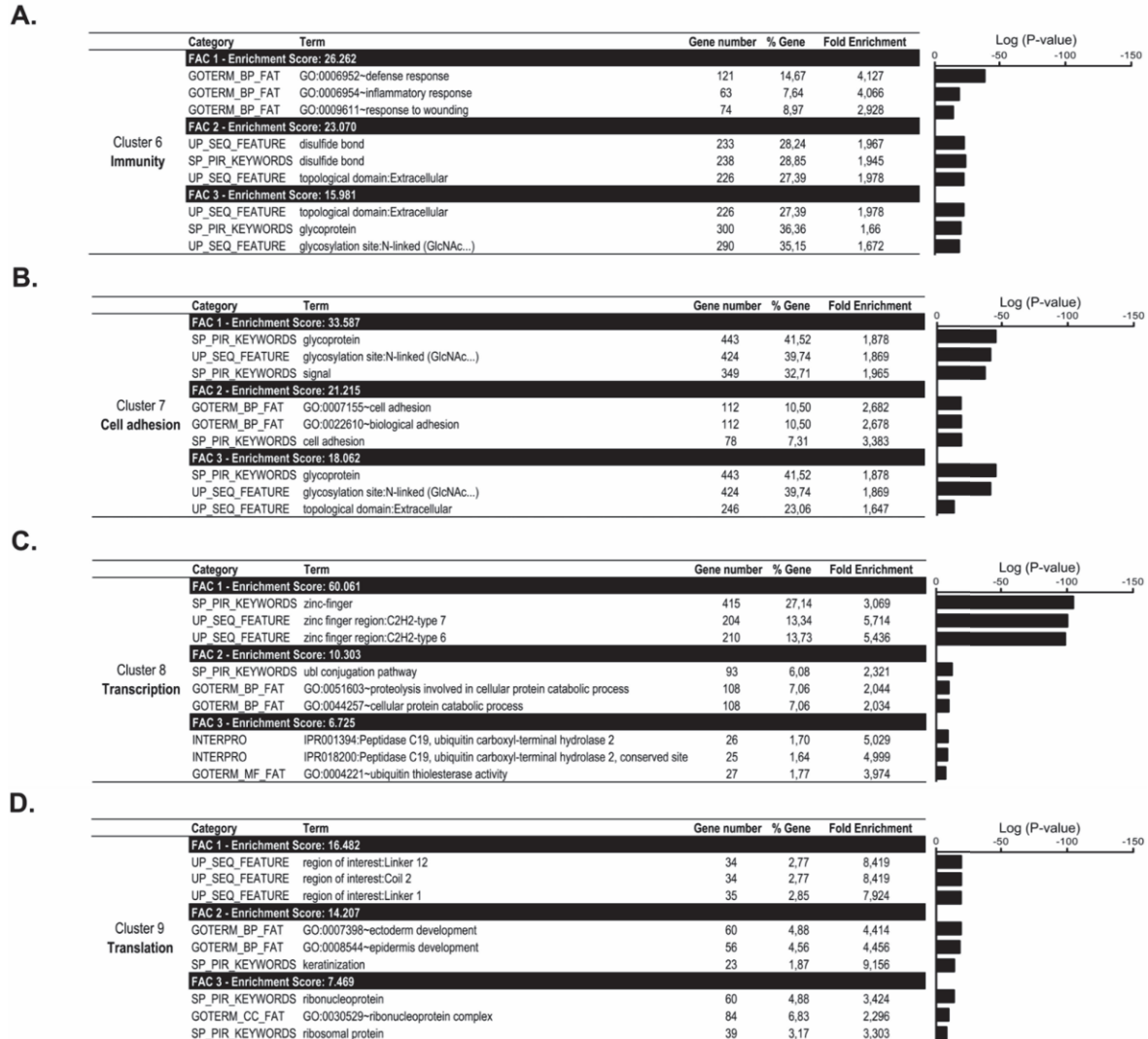
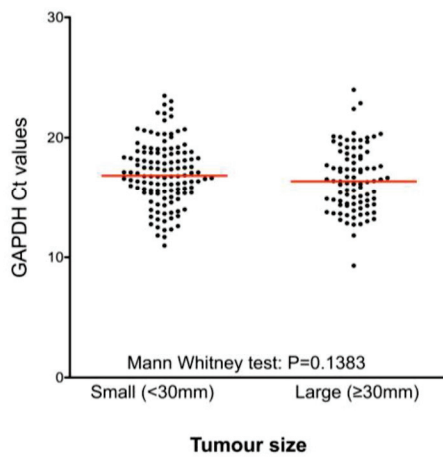


Figure S6. Gene ontology analysis on the clusters for which gene expression is different between low and high *NCL* expressing breast tumours. Gene ontology (GO) functional annotation clustering was performed using DAVID tools for annotation, visualization and integrated discovery. The GO analysis was restricted to the clusters 6 to 9 identified in Figure S5 that showed different expression profiles between low and high *NCL* expressing breast tumours. For each cluster, the top three functional annotation clusters (FAC) ordered by their enrichment score as well as the top three annotation terms are shown. Enrichment of genes involved in cell immunity was observed for the cluster 6 (A), in cell adhesion for cluster 7 (B), in transcription for cluster 8 (C) and in translation for cluster 9 (D). The low and high *NCL* expressing tumours express different gene profiling associated with distinct biological functions. For complete GO analysis see Supplementary table 4.

A

Methods	Gene Ranking Order	
	Most stable gene	Least stable gene
Delta CT	<i>GAPDH</i>	<i>ACTB</i>
BestKeeper	<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>
Normfinder	<i>GAPDH</i>	<i>ACTB</i>
GeNORM	<i>ACTB/GAPDH</i>	
Recommended comprehensive ranking	<i>GAPDH</i>	<i>ACTB</i>

B



C

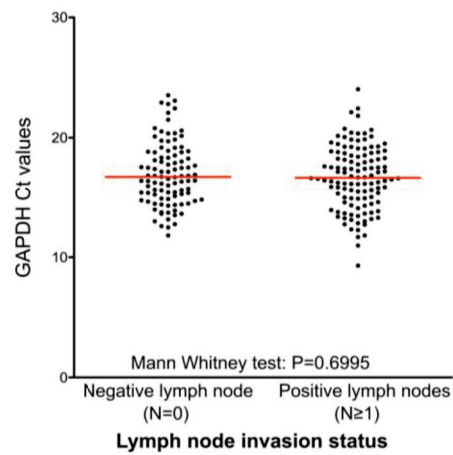


Figure S7. Determination of the most stable housekeeping gene in our study to normalize RT-qPCR analyses. (A) Stability ranking of *GAPDH* and *ACTB* genes in the 216 samples of Dundee series using RefFinder tool. *GAPDH* expression was determined as more stable than *ACTB* one. (B) Association of *GAPDH* expression stability with tumour size and lymph node invasion status. *GAPDH* expression was not significantly different in both small and large tumours or in lymph node non-invaded and invaded tumours.

3. Supplementary Tables

Table S1. Characteristics of patients issued from the TCGA dataset.

Characteristics	TCGA Series (<i>n</i> = 661)
Age	
Median	58
(min max)	(26–90)
Tumour size	
No data	1
≤20 mm	180 (27.3%)
>20 mm	480 (72.7%)
ER status	
No data	42
Negative	153 (24.7%)
Positive	466 (75.3%)
PR status	
No data	46
Negative	205 (33.3%)
Positive	410 (66.7%)
HER2 status	
No data	226
Negative	342 (78.6%)
Positive	93 (21.4%)
Intrinsic breast cancer subtype	
No data	235
ER+ PR+/- HER2-	265 (62.2%)
ER+/- PR+/- HER2+	93 (21.8%)
ER- PR- HER2-	68 (16.0%)
Histological breast cancer subtype	
No data	1
IDC	518 (78.5%)
ILC	101 (15.3%)
Others	41 (6.2%)

IDC: Infiltrating Ductal Carcinoma; ILC: Infiltrating Lobular Carcinoma.

Table S2. Nucleotide sequences of primers used in the study.

Gene Name	Forward (5' To 3')	Reverse (5' To 3')
<i>NCL</i>	CCA GAA CCA AAA TGG CAA AT	CTG ATT GCT CTG CCC TCA AT
<i>GAPDH</i>	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C

Table S3. Univariate Cox regression models for survivals in Dundee series.

Variable	Overall Survival			Disease-Free Survival			
	HR	CI 95%	<i>p</i> -Value	HR	CI 95%	<i>p</i> -Value	
<i>NCL</i>	Intermediate	1.00		1.00			
	Low	2.13	(1.30–3.48)	2.20	(1.37–3.52)		
	High	1.49	(0.90–2.46)	0.0083	1.60	(1.00–2.58)	0.0030
Tumour size	<30 mm	1.00		1.00			
	≥30 mm	2.46	(1.61–3.73)	<0.0001	2.13	(1.43–3.17)	0.0002
Invaded lymph node	<i>n</i> = 0	1.00		1.00			
	<i>n</i> ≥ 1	1.77	(1.16–2.70)	0.0079	1.82	(1.22–2.72)	0.0034
Intrinsic breast cancer subtype	ER+ PR+/- HER2-	1.00		1.00			
	ER+/- PR+/- HER2+	1.31	(0.80–2.13)		1.31	(0.82–2.07)	
	ER- PR- HER2-	1.93	(1.12–3.32)	0.0585	1.63	(0.96–2.77)	0.1789

HR: Hazard Ratio; CI 95%: 95% Confidence Interval.

Table S4. Full gene ontology analysis. It can be found in the appendix.**References**

1. Bourdon, J.-C.; Khoury, M.P.; Diot, A.; Baker, L.; Fernandes, K.; Aoubala, M.; Quinlan, P.; Purdie, C.A.; Jordan, L.B.; Prats, A.-C.; et al. p53 mutant breast cancer patients expressing p53 γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R7.
2. Ciriello, G.; Gatza, M.L.; Beck, A.H.; Wilkerson, M.D.; Rhie, S.K.; Pastore, A.; Zhang, H.; McLellan, M.; Yau, C.; Kandoth, C.; et al. TCGA Research Network; Perou, C.M. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* **2015**, *163*, 506–519.
3. Maire, V.; Baldeyron, C.; Richardson, M.; Tesson, B.; Vincent-Salomon, A.; Gravier, E.; Marty-Prouvost, B.; De Koning, L.; Rigai, G.; Dumont, A.; et al. TTK/hMPS1 is an attractive therapeutic target for triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63712.
4. Marcel, V.; Catez, F.; Berger, C.M.; Perrial, E.; Plesa, A.; Thomas, X.; Mattei, E.; Hayette, S.; Saintigny, P.; Bouvet, P.; et al. Expression Profiling of Ribosome Biogenesis Factors Reveals Nucleolin as a Novel Potential Marker to Predict Outcome in AML Patients. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170160.
5. Xie, F.; Xiao, P.; Chen, D.; Xu, L.; Zhang, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* **2012**, doi:10.1007/s11103-012-9885-2
6. Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

III. Article 3 : Translational reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition is associated with fine-optimization of ribosome composition

Translational reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition is associated with fine-optimization of ribosome composition. Flora Nguyen Van Long*, Agnès Baudin-Baillieu*, Laure Bidou, Nathalie Pion, Annie Adrait, Virginie Marchand, Janice Kielbassa, Akari Saku, Stephanie Gran-Ruaz, Frédéric Catez, Anne-Pierre Morel, Alain Viari, Yuri Motorin, Yohann Couté, Alain Puisieux, Olivier Namy*, Jean-Jacques Diaz*, Virginie Marcel*. **En préparation.**

1. Contexte

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus dynamique impliquée dans la tumorigenèse mammaire. L'EMT induit une résistance aux mécanismes de sauvegarde suite à l'activation d'oncogènes favorisant la tumorigenèse ou l'acquisition de propriétés souches favorisant la progression tumorale (Ansieau et al., 2008; Mani et al., 2008). Récemment, un nouveau sous-type de cancer du sein, les cancers Claudin-Low ont été identifiés et sont caractérisés par l'expression des différents marqueurs de l'EMT (Morel et al., 2012; Prat et al., 2010). L'EMT est induite par une reprogrammation de l'expression génique impliquant une régulation transcriptionnelle et épigénétique (Puisieux et al., 2014; Tam and Weinberg, 2013b). De plus, quelques études ont montré qu'une augmentation de la traduction de certains ARNm contenant des IRES, comme des EMT-TF ou des marqueurs mésenchymateux favorisaient l'EMT (Evdokimova et al., 2009; Petz et al., 2012a). Etant donné l'émergence du rôle du ribosome comme régulateur de la traduction, en particulier pour favoriser la traduction spécifique d'ARNm contenant des IRES (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013; Yoon et al., 2006), on pourrait supposer que durant l'EMT, la composition du ribosome est modifiée induisant une altération de la traduction pour favoriser l'EMT. Ainsi les objectifs de ce projet étaient de :

- Déterminer une éventuelle altération de la traduction entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses mammaires
- Identifier des altérations de composition au niveau des protéines ribosomiques et ARNr entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses mammaires.

Dans ce travail, j'ai été impliquée dans la réalisation des expériences visant à valider les modifications de composition au niveau protéique identifiées par spectrométrie de masse. J'ai également participé à la détermination des profils polysomiques des trois modèles cellulaires dérivées de l'EMT. Dans le cadre de ce projet, j'ai eu l'opportunité d'encadrer Akari Saku, une étudiante en Master 2 de l'Université de Tokyo qui a permis de caractériser les trois modèles cellulaires dérivées de l'EMT et de déterminer l'expression protéique des 13 protéines d'intérêts dans ces modèles.

2. Manuscrit en préparation

Translational reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition is associated with fine-optimization of ribosome composition

Flora Nguyen Van Long^{1,*}, Agnès Baudin-Baillieu^{2,*}, Laure Bidou², Nathalie Pion¹, Annie Adrait³, Virginie Marchand⁴, Janice Kielbassa⁵, Akari Saku¹, Stephanie Gran-Ruaz¹, Frédéric Catez¹, Anne-Pierre Morel⁶, Alain Viari⁵, Yuri Motorin⁵, Yohann Couté³, Alain Puisieux⁶, Olivier Namy^{2,*}, Jean-Jacques Diaz^{1,*}, Virginie Marcel^{1,*}

¹Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Nuclear domains and pathologies team, Lyon, France

²Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Université Paris-Sud, Paris, France

³Large scale laboratory of biology, UMR_S 1038 Inserm/CEA/Université de Grenoble Alpes, EDyP Laboratory, Grenoble, France

⁴NGS platform, Bioingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

⁵Synergie Lyon Cancer, Bio-Informatics Platform, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, EMT and cancer cell plasticity team, Lyon, France

*Co-authors

Correspondence to:

Virginie Marcel: virginie.marcel@lyon.unicancer.fr

Jean-Jacques Diaz: jean-jacques.diaz@lyon.unicancer.fr

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Cheney A, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08

Running title: Ribosome and translation in EMT

Keywords: EMT, ribosome, translation, epitranscriptomics, riboproteome, ribosome profiling

Abbreviations: epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), ribosomal RNA (rRNA), small subunit ribosomal protein (RPS), large subunit ribosomal protein (RPL), eukaryotic initiation factor (eIF)

Abstract

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) corresponds to the transdifferentiation of epithelial cells into mesenchymal ones that promotes tumorigenesis and cancer development. EMT is driven by a profound transcriptional reprogramming coupled to epigenetic events to maintain progress in EMT commitment during transition. However, it is now well established that translation, the last step of gene expression, plays key role in physio-pathological conditions, one of the most innovative regulators being the ribosomes themselves. Here, using hMEC-derived cellular models overexpressing the EMT transcription factor Zeb1, we performed genome-wide analyses to depict the translational landscape and the translational machinery rearrangements that occur during EMT. Ribosome profiling revealed that translation was as profoundly modulated as transcription during the EMT commitment. In parallel, composition of ribosome was finely rearranged during EMT, in particular changes affect the rRNA 2'-O-Me profile at some given sites, the ribosomal protein RPL36A and the associated eIF3 translational factors, as observed using RiboMETH-seq and RiboProteome approaches. Moreover, epithelial ribosomes showed higher defects in readthrough, the ability in recognizing stop codon, then mesenchymal ones. Overall, these data demonstrated for the first time that EMT is associated with a profound translational reprogramming associated with change in ribosome activity, which reflects change in ribosome composition.

Introduction

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a dynamic and reversible embryonic process that enables to generate mesenchymal cells with motile phenotype from polarized epithelial cells¹. In addition to contribute to the normal physiology during embryogenesis and adulthood, it has been shown that the aberrant reactivation of this transdifferentiation program facilitates later stages of cancer development². EMT has been indeed initially considered to be involved in invasion and metastatic spread based on the motile phenotype of EMT-derived cells. Later on, it has also been demonstrated that EMT contributes to neoplastic transformation by promoting the escape from oncogene-induced senescence, including in melanomas and triple-negative breast cancers³⁻⁶. It has recently been proposed that EMT drives a particular neoplastic transformation associated with a low rate of genomic aberrations, reconciling the concept of genomic instability-driven tumorigenesis and the existence of tumours lacking genomic abnormalities⁷. Interestingly, EMT also results in the acquisition of stem cell-like properties including slow proliferation and self-renewal potential, that may, at least in part, explain that EMT is associated with the most aggressive tumours and that the EMT-driven adaptability to selective pressures has been shown to confer tumour resistance to therapy^{1,2,8}.

EMT commitment is driven by a profound reprogramming of gene expression¹. EMT has been shown to be dependent upon an intricate network of EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs) that include different families, such as the ones of ZEB (Zeb1, Zeb2), TWIST (Twist1, Twist2) or SNAIL (Snail, Slug, Snai3), for examples. Reactivation of these EMT-TFs in adults induces a profound transcriptional reprogramming that favours cell plasticity with oncogenic consequences. In particular, EMT-TFs have been shown to repress *CDH1* (i.e., *E-cadherin*) inducing the loss of cell-cell contact of epithelial cells^{9,10}. This transcriptional regulation is associated with an epigenetic reprogramming that has been suggest to govern the stability of EMT by helping in defining the residency of cells in a given phenotypic state during the transition¹¹. Although change in gene expression is the driving force of EMT-induced cell plasticity, only scattered studies assessed the role of translation, one of the last step in gene expression, in EMT¹². It has indeed been shown that increased translation of EMT-TFs, such as Zeb2 or Snail, is sufficient to drive EMT commitment^{13,14}. In addition, regulation at translational level has been shown to favour expression of several mesenchymal effectors such as laminin B1, Dab2, ILEI or LEF¹⁵⁻²⁰.

It is now largely admitted that translation plays a key role in promoting cancer initiation and progression, translational impairments of oncogenes and tumour suppressors facilitating acquisition of cancer hallmarks²¹⁻²³. In cancers, translational alterations rely on modifications of expression and activity of the canonical translation factors, but also of numerous RNA-

binding proteins and microRNAs involved in specific translational regulation of mRNAs²⁴. In addition to these classical molecular mechanisms, a recent concept is emerging suggesting that the ribosome itself is a novel regulator of translation^{25,26}. Indeed, ribosomes with different composition at either ribosomal proteins or ribosomal RNA (rRNA), have been identified depending on the physio- and pathological conditions; each variant of ribosomes might favour the translation of specific subset of mRNAs. Regarding ribosomal proteins, it has been reported that RPL10A-containing ribosomes promote translation of mRNAs encoding extracellular matrix proteins, while RPS25-containing ribosomes coordinate that of mRNAs encoding proteins involved in the vitamin B12 signaling²⁷. In addition, alterations of chemical modifications of rRNA, in particular 2'-O-ribose methylation (2'-O-Me), have been identified during tumor initiation and progression and have been shown to directly affect translation of particular mRNA subsets²⁸⁻³⁰. To date, the relative part of change in gene expression during oncogenic EMT commitment corresponding to translation, as well as associated change in ribosome composition, has never been investigated. Here, we used genome-wide approaches to depict the translational landscape in light of the profound transcriptional reprogramming and the translational machinery rearrangements that occur during EMT.

Materials and methods

Cellular models

The primary human mammary epithelial cells (hMECs) were used to derive EMT-related cellular models³. The hMEC cell line corresponded to epithelial cells (Lonza) was immortalized by lentiviral transduction allowing hTERT overexpression. The hMEC cell line was transduced with lentiviral vector to induce stable over-expression of the murine EMT-TF Zeb1 and to promote EMT. The mesenchymal hMEC-mZeb1 cell line was then transduced with lentiviral vector to induce stable expression of an active mutant form of the oncogene K-ras (Kras^{V12}) and promote tumour initiation (hMEC-mZeb1-Kras^{V12}).

hMEC cellular models were maintained in DMEM-F12 (Gibo) supplemented with 0.5 µg/ml hydrocortisone, 10 ng/ml EGF, 0.3 U/ml insulin, 10% fetal calf serum, 100 µg/ml streptomycin and 100 units/ml of penicillin. Selective pressure was maintained with the corresponding antibiotic: hMEC-mZeb1, puromycin; hMEC-mZeb1-Kras^{V12}, neomycin. Cells were plate 24 hrs before harvest at 4.10⁶ cells per 10 cm dishes.

RNA extraction, rRNA quantification and RT-qPCR

Total RNA were purified using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) and RNA pellet resuspended in RNase-free water. To quantify ribosome quantity (i.e., rRNA), total RNA extraction was performed on increasing cell amount and three constant fractions of the purified RNA were loaded on 2% agarose gel revealed with ethidium bromide. 28S and 18S bands were quantified using the Image J software and normalized to the epithelial hMEC cells.

RNA expression levels by RT-qPCR. Reverse transcription was performed using 200 ng of purified total RNA using the PrimeScript RT kit (Takara) that allow reverse transcription of poly-A containing RNAs (2.5 μ M oligo dT primers) and non-poly-A containing RNAs, such as rRNA and snoRNAs (5 μ M random 6-mer primers). Gene expression levels were quantified by real-time qPCR using LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche). Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, using Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen) as control sample for inter-run normalization and *GAPDH* as housekeeping gene. Each sample was quantified in triplicate.

2'-O-methylation rRNA levels by RT-qPCR. 2'-O-Me rRNA levels were evaluated by RT-qPCR using differential dNTPs concentration, low dNTP concentration inducing RT stops in presence of 2'-O-Me in contrast to high dNTP concentration, as already described²⁹. Briefly, reverse transcription was performed using 500 ng of total RNA in presence of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in either low (10 μ M) or high (1 mM) dNTPs concentration prior qPCR using LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche). The levels of 2'-O-Me rRNA were calculated using the $2^{(CT_{low} - CT_{high})}$ equation. Each sample was quantified in triplicate.

Statistical analyses were performed using mean values and GraphPad Prism v7.0a software (GraphPad Software, Inc).

Western blotting, gel staining and microscopy

Cells were lysed in lysis buffer A (20 mM Hepes-KOH pH 7.2, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP40, 10 % Glycerol) supplemented with protease inhibitor (Complete EDTA free, Roche). Protein concentrations were determined using the Bradford procedure (BioRad). Proteins were subjected to SDS-PAGE on 12% gel, and blotted onto nitrocellulose membranes (Millipore). Membranes were blocked in TBS solution containing 0.05 % Tween 20 and 5 % non-fat milk and incubated with primary antibodies. Horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used for the detection of immunoreactive proteins by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare).

Gel staining. 1D electrophoresis of purified ribosome was stained after gel prefixation in methanol using either Coomassie blue coloration (0.25% Coomassie Blue R-250 solution) or silver staining (0.1% silver nitrate solution).

Immunofluorescent microscopy. Cells were grown on glass coverslips fixed in 4% of paraformaldehyde in PBS before permeabilization with 0.5% Triton X-100 in PBS. Primary antibodies were applied before secondary antibodies labelled with AlexaFluor488 or 555 (Molecular Probes). Coverslips were mounted using the Fluoromount G mounting medium (EMS). Image were acquired on a Zeiss confocal microscope (Zeiss LSM 780 NLO).

Primary antibodies. CDH1 (810181, BD Biosciences), VIM (M0725, Dako), Ku80 (ab3715, Abcam), FBL (ab1666630, Abcam), Nop58 (ab155969, Abcam), Nop56 (A302-720A-M, Bethyl), NHP2L1 (15802-1-AP, Proteintech), alpha-tubulin (CP06, Calbiochem), histone H3 (ab1791, Abcam), RPS6 (A300-557A, Bethyl), RPL19 (ab224592, Abcam), RPL36A (ab175016, Abcam), eiF3a (NBP1-18891, Novusbio), eiF3b (A301-761A, Bethyl), eiF3c (A300-377A, Bethyl), eiF3d (pab73778, Covalab), eiF3e (ab36766, Abcam), eiF3f (pab70099, Covalab), eiF3g (pab75515, Covalab), eiF3h (A301-754A, Bethyl), eiF3i (646701, Ozyme), eiF3k (NB100-93304, Novusbio), eiF3l (pab0859-P, Covalab), eiF3m (NBP1-56654, Novusbio).

Ribosome purification

Cytoplasmic fractions were obtained by mechanical lysis of cells using the PreCellys device (Ozyme) and centrifugation at 12,000 g for 10 min to pellet mitochondria³¹. Cytoplasmic fractions were loaded onto a 1 M sucrose cushion in buffer (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 2 mM DTT) and centrifugate for 2 hrs at 240,000 g. Ribosome pellet were resuspended (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl).

Ribosome profiling

Ribosome profiling was performed as previously described³⁰. Procedure was briefly described below.

Ribosome protected fragments preparation and sequencing. hMEC-derived cells were cultivated and 15.10⁶ cells were snap frozen in liquid nitrogen to stop translation. Cytoplasmic fractions were then separated using 15-50% sucrose gradients by ultracentrifugation and polysome profiles were collected using gradient device. For the Ribo-seq, the polysomal fractions were then digested with 15 U RNase I AMBION/OD260 for 1 h at 25 °C. Ribosome protected fragments (RPF) were purified by phenol-chloroform extraction, and suspended in Superase-IN AMBION solution (1 U/μL). 28- to 34-nt RNA fragments were then purified from

16% (vol/vol) acrylamide-bisacrylamide (19:1) / 7 M urea gel by passive diffusion. Ribosome footprints were depleted from ribosomal RNA with the Ribo-Zero Human kit (Illumina) following the manufacturer's recommendations. Sequencing libraries were prepared from an equal number of RPF with the TruSeq Small RNA library preparation kit (Illumina). Next generation sequencing was performed using a HiSeq. 2500 single read 75.

Bioinformatic analysis. Raw data were first trimmed to remove the 3' adapter sequence with CutAdapt 1.9.1 and then mapped against the rRNA sequences of hg38 human genome with Bowtie 1.1.2. These filtered reads were finally mapped against the complete genome (hg38 human genome) and against the coding sequences only with Bowtie 1.1.2.

The number of reads for each gene was calculated with the featureCounts 1.5.0-p2 program and normalized with DESeq2 method through SARTools R Package. To represent RNA-seq and RIBO-seq profiles, we used the cross graphic representation where we display log₂ fold-changes in both data. The data were directly taken from the tables generated by SARTools. The graphic was done using Bokeh v0.12.9 (<https://bokeh.pydata.org/en/0.12.9/>). Finally, gene ontology was performed using DAVID tools (functional annotation clustering). Bioinformatic analyses were performed using R.

Riboproteome

Five replicates of ribosomes from hMEC-derived EMT cellular models were purified before characterization by mass spectrometry-based proteomic analysis as described³⁰. Briefly, extracted proteins were stacked in the top of a 4-12% NuPAGE gel (Invitrogen) before in-gel digestion using modified trypsin (Promega). Resulting peptides were analyzed by nanoliquid chromatography coupled to tandem MS (Ultimate 3000 RSLCnano system coupled to Q-Exactive Plus, Thermo Scientific) using a 120-min gradient. RAW files were processed using MaxQuant³² version 1.5.8.3 and the SwissProt database (Homo sapiens taxonomy, June 2017 version). Intensity-based absolute quantification (iBAQ)³³ values were calculated from MS intensities of unique+razor peptides and used for statistical analyses using ProStaR (Wieczorek S et al., 2017, Bioinformatics). Only proteins quantified in at least 5 replicates of 1 condition were kept. For each sample, individual iBAQ values were normalized by the sum of iBAQ values extracted from ribosomal proteins. Missing data were imputed using the .5-percentile value of each column before statistical testing using *limma* t-test. Differentially expressed proteins were sorted out using a log₂(fold change) cut-off of 1 and an adjusted p-value allowing to reach a FDR threshold below 0.5% using the Benjamini-Hochberg method.

RiboMETH-seq

Frequency of rRNA 2'-O-Me at the 106 sites was determined in cellular samples by RiboMETH-seq, the only approach allowing absolute quantification of rRNA 2'-O-Me frequency to date³⁴⁻³⁶. Presence of 2'-O-Me protects the phosphodiester bond located at the 3' of the methylated site from alkaline hydrolysis. Thus presence of 2'-O-Me at the given nucleotide n induces a decrease in RNA fragments starting at the nucleotide $n+1$ while it increases the one finishing at the nucleotide $n-1$, allowing to calculate 2'-O-Me frequency at the corresponding site (or C-score).

RiboMETH-seq was performed as previously described using Illumina technology^{36,37}. Briefly, total RNA was first subjected to partial alkaline hydrolysis to generate RNA fragments ranging from 50 to 100 bp. Libraries were then prepared using NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set (Illumina) and multiplexed. Sequencing were performed using HiSeq sequencer (Illumina). After sequencing, FastQ files were treated bioinformatically to compute C-score associated to the 106 sites as already described³⁷. Briefly, adapter sequences were trimmed off raw reads using Trimmomatic and the extracted reads were aligned on a human rRNA sequence (NR_046235) using Bowtie 3. 5' and 3' ends reads were counted at each rRNA nucleotide position and used to determine the C-scores as previously described³⁵. C-score at the nucleotide position n corresponds to the difference between maximum frequency (i.e., 1) and the number of 5'/3' end read counts at position $n+1$ normalized to the mean average of raw counts from the 6 nucleotides located just upstream and downstream of the nucleotide position n .

To determine significant modifications in rRNA 2'-O-Me, adjusted Mann-Whitney t tests were performed on 6 independent biological replicates.

Readthrough luciferase reporter assays

A dual reporter, containing nonsense mutation (UAG > UAC) into the pAC99 plasmid, was used to quantify stop-codon readthrough through the measurement of luciferase and β -galactosidase (internal calibration) activities. hMEC-derived cells were seed in a 96-well plate, 24 hrs before transfection with the reporter plasmid in the presence of JetPei reagent (Ozyme). Cells were harvested 24 hrs post-transfection, with trypsin-EDTA (Invitrogen), lysed with Glo lysis buffer (Promega) and β -galactosidase and luciferase activities were assayed. Readthrough efficiency was estimated by calculating the ratio of luciferase activity to β -galactosidase activity obtained with the mutant construct, with normalization against an in-frame wild-type control construct. At least 10 independent transfection experiments were performed.

Results

Extent of translation modulation is equivalent to the transcription one in EMT

To determine whether translation is modulated during EMT and to assess the relative proportion of translation modulation to transcription changes, we performed ribosome profiling in a well-established EMT cellular model derived from the human mammary epithelial cell line (hMEC). Over-expression of the EMT-TF Zeb1 in hMEC, corresponding to the epithelial state, promoted EMT and allowed generation of the mesenchymal cell line (hMEC-mZeb1), in which overexpression of the active mutant form of the oncogene *Kras*^{V12} induced neoplastic transformation (hMEC-mZeb1-*Kras*^{V12}) (Figure S1A)^{3,7}. As expected, Zeb1 overexpression, loss of *CDH1* a marker of epithelial cells, and acquisition of *VIM* a mesenchymal marker, were observed in mesenchymal stages (hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-*Kras*^{V12}) compared to epithelial one (hMEC) by RT-qPCR and western blot (Figures S1B-D).

Ribosome profiling has been performed to quantify change in mRNAs protected by ribosomes at the genome-wide level (Figure 1A, bottom panel)^{38,39}. Briefly, after purification of the cytoplasmic polysomes containing the actively translated mRNA associated with the ribosomes, nuclease digestion removes the non-protected mRNA segments that can be deep sequenced following rRNA depletion. Cytoplasmic fractions of the three cellular models issued from three independent biological replicates were first separated using sucrose gradient to prepare polysomes. The three cellular models exhibited similar polysomal profiles as shown on a representative profile (Figure 1B). The peaks corresponding to ribosomes (i.e., 40S small subunit, 60S large subunit and 80S monosome) were similarly delimited and all the polysomes exhibit up to six distinct polyribosomes, suggesting no drastic change in global translation between these three EMT-committed stages. In addition to deep sequenced the polysomic mRNAs protected by ribosomes (i.e., Ribo-seq), we sequenced the total cytoplasmic mRNAs after ribosome depletion (i.e., RNA-seq) in paralleled, in order to quantify change in mRNA levels that may affect change in translation (Figure 1A, upper panel). Thus, RNA-seq of total cytoplasmic mRNAs accounts for any change in transcription level, nuclear-cytoplasmic export and mRNA stability.

Using the biological triplicates, we calculated both fold-changes (FC) and p-values for Ribo-seq and RNA-seq data by comparing hMEC to hMEC-mZeb1 (epithelial vs mesenchymal stages) and hMEC-mZeb1 to hMEC-mZeb1-*Kras*^{V12} (normal vs tumoral mesenchymal stages). We applied cut-off to identify genes with significant change in gene expression (adjusted *P*-

value < 0.001 and $\log_2(\text{FC}) \geq |1|$). To compare change in cytoplasmic mRNA levels and in ribosome-protected mRNAs, we plotted the $\log_2(\text{FC})$ of each gene exhibiting significant changes in either RNA-seq or Ribo-seq, as shown in Figure 2C for hMEC vs hMEC-mZeb1 comparison as an example. Using this representation, similar plots were obtained for hMEC vs hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} (data not shown). We observed that no gene was regulated at the mRNA level only (i.e., “transcription only”: no change in Ribo-seq, $-1 < \log_2(\text{FC})_{\text{Ribo-seq}} < 1$; and change in RNA-seq, $\log_2(\text{FC})_{\text{RNA-seq}} \geq 1$ or ≤ -1). However, we identified genes regulated at both cytoplasmic and ribosome-protected mRNA levels. Interestingly, change in RNA-seq was always positively correlated to change in Ribo-seq (i.e. “coupled transcription/translation”: change in Ribo-seq, $\log_2(\text{FC})_{\text{Ribo-seq}} \geq 1$ or ≤ -1 ; and change in RNA-seq, $\log_2(\text{FC})_{\text{RNA-seq}} \geq 1$ or ≤ -1). It suggested that any change in total cytoplasmic mRNA levels positively correlated with change in ribosome-associated mRNA levels indicating a strong coupling in transcription/translation when change in mRNA steady-state levels occurred. More importantly, we identified genes whose ribosome-associated mRNA levels were affected between epithelial and mesenchymal cells although no change in their total cytoplasmic mRNA levels was observed (i.e., “translation only”: change in Ribo-seq, $\log_2(\text{FC})_{\text{Ribo-seq}} \geq 1$ or ≤ -1 ; and no change in RNA-seq, $-1 < \log_2(\text{FC})_{\text{RNA-seq}} < 1$). These data indicated that expression of some genes was dependent upon translational regulation only, while other genes showed concomitant regulation at both transcription/post-transcriptional and translational levels.

To compare the proportion of genes subjected to translation vs transcriptional regulation during the oncogenic EMT commitment, we compared the number of genes significantly altered (Figure 1D). During EMT, number of genes regulated at the translational level only was superior to the ones regulated at the coupled transcriptional/translational levels. Compared to the epithelial hMEC cells, the mesenchymal hMEC-mZeb1 cells exhibited 755 genes, whose translation was deregulated (392 translationally upregulated and 363 downregulated), against 599 genes, whose coupled transcription/translation was modulated (215 upregulated and 384 downregulated). Similar trend was observed during EMT-derived tumorigenesis, the tumorigenic mesenchymal hMEC-mZeb1-Kras^{V12} presenting 536 genes regulated at translational levels against 465 genes regulated at coupled transcription/translation levels compared to the mesenchymal hMEC-mZeb1. Altogether, these data suggest that translational reprogramming occurs during the oncogenic EMT commitment. Moreover, translational reprogramming was not an anecdotal change in gene expression since the proportion of genes modulated at translational levels being at least as important as the ones modulated at both transcriptional and translational levels.

Differential biological processes are regulated by translation and transcription during EMT

To determine whether genes whose expression was altered at cytoplasmic mRNA levels were consistent with what known about EMT, we first compared the top 10 of upregulated and downregulated genes identified by RNA-seq in hMEC vs hMEC-mZeb1 (Table 1). During EMT commitment (hMEC vs hMEC-mZeb1), 7 of the top 10 genes either up or down-regulated at the coupled transcription/translation level have been reported as EMT markers or key EMT drivers (Table 1, “coupled transcription/translation”). As examples, the EMT-TF Zeb2¹, the integrin ligase EDIL3⁴⁰ and the collagen COL5A3⁴¹ have been associated with mesenchymal cellular phenotype, these functions being thus coherent with their upregulation at coupled transcription/translation level in hMEC-mZeb1 compared to hMEC. In contrast, decreased expression of the epithelial markers such as the RNA-binding protein ESRP1⁴², the keratin KRT15⁴³ or the nucleoporin NUP210⁴⁴, was observed using RNA-seq data at coupled transcription/translation level in hMEC-mZeb1 compared to hMEC. To depict a global overview of biological process altered by change in coupled transcription/translation, we performed gene ontology using DAVID online tool using all altered genes (Figure 2A, left panel). As expected, genes whose expression was altered at coupled transcription/translation were involved in developmental processes, differentiation, cellular adhesion and motility, - the developmental processes being mainly observed in the upregulated genes while the cellular adhesion and the epithelium development processes in the downregulated genes (Table 2)^{1,2,45}. Although less genes in the 10 top have been associated with EMT commitment when comparing hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} (Table 3), similar enriched biological processes was observed in hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} compared to hMEC vs hMEC-mZeb1 (Figure 2B, left panel) with similar repartition in up and down-regulated genes (Table 4). Overall, these observations were coherent with the profound transcriptional reprogramming driving EMT described in the literature, and validated the data obtained using the ribosome profiling approach.

We next performed gene ontology analysis to identify the biological processes associated with translational regulation that occurs during EMT. Among the genes whose change in ribosome-protected mRNAs levels was observed, only 1 or 2 out of the top 10 genes have already been described in the context of EMT. The protocadherin PCDH18⁴⁶ and the sialyltransferase ST3GAL5⁴⁷ both up-regulated at translational level in hMEC-mZeb1 compared to hMEC, have been associated with mesenchymal cells, while the transcription factor SOX10 downregulated at translational level in hMEC-mZeb1 compared to hMEC, has been associated to epithelial cells (Table 1). Gene ontology revealed that in addition to the classical biological processes associated with EMT commitment (i.e., development), a significant enrichment in additional

processes was observed in gene regulated at translation level, including ion transport (up: SLC4A8; down: RYR2), organic acid metabolic processes (up: ST3GAL5, SULT1B1, PADI3; down: GPR1, SLC27A6), actin-associated cytoskeleton (up: PDEAB, SCG2), but also vascularization (up: SCG2), the latter function being mainly associated with upregulated genes (Figure 2B, right panel and Table 2). Interestingly, although the number of genes regulated at translational level was higher than the one of genes regulated at coupled transcription/translation, the p-values associated with enrichment in gene ontology were lower in translationally regulated genes than others, suggesting that the similitude of translationally regulated genes did not correspond to specific biological functions but at least to specific regulatory molecular mechanisms. Like for genes regulated at coupled transcription/translation level, lack of enrichment in biological processes was observed in hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} (Figure 2B, right panel), although some of the top 10 genes have been associated with EMT commitment when comparing hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} (Table 3) and the translationally downregulated genes were enriched in adhesion or development (Table 4). Interestingly, enrichment in genes involved in response to stimulus was observed among the genes whose translation was downregulated in hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} (Table 4). Altogether, these data suggested that genes regulated at translational level during EMT commitment are enriched in additional biological processes compared to the genes regulated at coupled transcription/translation level.

rRNA 2'-O-Me profiles vary during EMT

We recently demonstrated that rRNA 2'-O-Me profiles are altered during tumorigenesis and directly affect translational regulation^{29,30}. To decipher whether rRNA 2'-O-Me was altered during oncogenic EMT commitment, we profiled rRNA 2'-O-Me using RiboMETH-seq, a RNA-seq based technology allowing absolute quantification of 2'-O-Me frequency at the 106 rRNA sites^{30,35,36}. We first profiled rRNA 2'-O-Me in a panel of oncogenic models derived from hMEC cells using three different EMT-TFs (Zeb1, Zeb2 and Twist1) that reflect different EMT commitment stages, as verified by analysing expression of the EMT-TFs and epithelial and mesenchymal markers (Figure S2A). A change in rRNA 2'-O-Me frequency was observed at some common given sites only, in all the cellular models however at a different rate (Figure S2B-D). In contrast to Zeb1- and Zeb2-derived models, Twist1-derived cellular models exhibited a reduced number of sites whose rRNA 2'-O-Me frequency was altered, suggesting that EMT-TFs affect rRNA 2'-O-Me profiles in a different extent. In addition, whereas EMT-TFs overexpression was associated with change in rRNA 2'-O-Me frequency, only slight changes were observed between EMT-TF overexpressing cells and EMT-TF/Kras^{V12} cells. These data

suggested that rRNA 2'-O-Me varies during oncogenic EMT and presents a common signature, the most important variation in rRNA 2'-O-Me profiles occurring during the EMT itself, and in particular in response to Zeb1 and Zeb2 overexpression.

To clearly identify rRNA 2'-O-Me sites whose frequency varies during EMT, we focused on the EMT cellular models that presented the strongest change in rRNA 2'-O-Me. We thus compared rRNA 2'-O-Me frequency in hMEC and hMEC-mZeb1 cell lines using five biological replicates by RiboMETH-seq and applied cut-offs (P -value < 0.05 and δ mean C-score > 0.05) (Figure 3A). A significant change in 2'-O-Me frequency was observed at two given sites: 28S-Um2402 (2'-O-Me located at nucleotide 2402 in 28S rRNA of the large subunit) and 28S-Gm4588. Compared to hMEC, hMEC-mZeb1 cells exhibited a decrease in 2'-O-Me frequency at 28S-Um2402 and an increase at 28S-Gm4588 of about 10%. Moreover, an increase in 28S-Am4560 2'-O-Me of borderline δ mean C-score was observed in hMEC-mZeb1 compared to hMEC. Of note, no change was observed in nucleoli shape, reflecting ribosome biogenesis, nor in amount of rRNAs between hMEC and hMEC-mZeb1, suggesting that change in rRNA 2'-O-Me frequency was not associated with a change in ribosome quantity (Figure S3). We then performed site-specific RT-qPCRs dedicated to 2'-O-Me relative quantification using available primers related to five rRNA 2'-O-Me sites, including the variable 28S-Am4560 and four sites whose frequency did not vary (Figure S4). As observed using RiboMETH-seq, a significant increase in rRNA 2'-O-Me levels was observed at 28S-Am4560 but not at the other sites, validating our RiboMETH-seq data.

rRNA 2'-O-Me is catalysed by a rRNA 2'-O-Me complex composed of four proteins, including FBL the rRNA methyl-transferase, and one C/D box small nucleolar RNA (SNORD), which hybridizes rRNA in a sequence specific manner to guide FBL on the rRNA site to be methylated⁴⁸. We reported a strong correlation between change in *FBL* expression levels and change in rRNA 2'-O-Me levels^{29,30}. To determine the origin of change in rRNA 2'-O-Me profile during EMT, we first analysed expression of FBL at both mRNA and protein levels using RT-qPCR and western blot in hMEC and hMEC-mZeb1 cell lines. No change in *FBL* expression levels, nor in the three other protein components of the rRNA 2'-O-Me complex, was observed (Figure S5). We thus focused on expression of the SNORD known to guide FBL on 28S-Gm4588 (SNORD91A/B) and 28S-Um2402 (SNORD143/144) (Figure 3B-C). An increase in SNORD91A, but not in SNORD91B, was observed in hMEC-mZeb1 cells compared to hMEC ones concomitantly with an increase in rRNA 2'-O-Me frequency at 28S-Gm4588. In contrast, a significant decrease in both SNORD143 and SNORD144 was observed in hMEC-mZeb1 cells compared to hMEC ones that paralleled the decrease in rRNA 2'-O-Me frequency at 28S-Um2402. It suggested that change in rRNA 2'-O-Me frequency arise from variation in SNORD expression rather than change in expression of the protein components of the rRNA 2'-O-Me

complex. Altogether these data indicated that ribosome composition changed at rRNA level during oncogenic EMT, in particular during the first step of EMT commitment. This variation in rRNA 2'-O-Me profiles during EMT mainly involved two sites that are dependent upon the related SNORD expression levels.

EMT is associated with change in ribosomal protein composition and in ribosome associated-translational factors

Since we observed a change in ribosome composition at rRNA level, we compared ribosome composition at protein level between hMEC and hMEC-mZeb1 cell lines using RiboProteome. This approach consists in the analysis of purified ribosomes issued from the cytoplasm by mass spectrometry and give the relative change in proportion of ribosomal protein within two conditions^{31,49}. Purity of cytoplasm fractionations was assessed by western blot using histone H3 as nucleus marker (Figure S6A). Using 1D SDS-Page electrophoresis, we also compared profiles of ribosomal proteins (Figure S6B-C). No difference was observed either between epithelial and mesenchymal ribosomal protein profiles nor between the five biological replicates analysed by mass spectrometry.

Peptide counts were used to measure relative change in protein level between ribosomes purified from hMEC or hMEC-mZeb1 cells (Figure 4A, Table 5). About 1000 proteins were identify in the purified ribosomes however > 95% of total peptides corresponded to the 80 cytoplasmic ribosomal proteins, comforting the enrichment in ribosome in the preparation. Among the significant change in protein levels (adjusted P-value < 0.005 and $\log_2(\text{FC}) > |1|$), only one ribosomal protein was identified, the large subunit ribosomal protein RPL36A. Indeed, a 3-fold increase in the proportion of RPL36A-containing ribosomes was observed in hMEC-mZeb1 cells compared to hMEC ones. However, only three peptides accounted for RPL36A identification and quantification, and the significant change in proportion was related to only one of these three peptides (Figure S7A). To validate the mass spectrometry data, we analysed RPL36A protein levels in both purified ribosomes and ribosome-free fractions using western blot (Figure 4B). As expected, ribosomal proteins were detected in purified ribosome but not in purified ribosome-free fractions. Moreover, as determined by mass spectrometry, no change in the small subunit RPS6 or in the large subunit RPL19 ribosomal proteins was observed between hMEC and hMEC-mZeb1 cells. No difference in RPL36A levels was observed between hMEC-mZeb1 and hMEC-mZEB-Kras^{V12} (data not shown). In contrast, change in RPL36A levels was observed between hMEC and hMEC-mZeb1 cells, the levels of RPL36A being higher in mesenchymal than in epithelial cells. Overall, these data suggested

that epithelial and mesenchymal ribosomes exhibited different composition, the proportion of RPL36A-containing ribosomes being increased during EMT.

In addition to ribosomal proteins, RiboProteome allowed to analyse additional ribosome-associated proteins, including the canonical translation factors, even if the quantity of their related peptides count was low (i.e., < 5% of total peptides). Interestingly among the canonical translation factors associated with a significant change in hMEC-mZeb1 compared to hMEC, 12 out of the 13 subunits of the eIF3 complex showed a significant decrease (Figure 4A, Table 5). Indeed, peptides related to the eIF3J subunit were not found in our mass spectrometry data. The absence of eIF3J in our data was coherent with the literature, since eIF3J is described as a labile and non-essential subunit lacking in cryo-electron microscopy reconstruction of mammalian eIF3 complex⁵⁰. In contrast to RPL36A, several peptides allowed the identification of the 12 eIF3 subunits and their counts were globally reduced in the five biological replicates of hMEC-mZeb1 compared to the ones of hMEC, supporting the variation in eIF3 subunits levels in purified ribosome preparation (Figure S7B-C). Analysis of eIF3e subunit levels by western blot confirmed the decrease of eIF3e in ribosome purified from hMEC-mZeb1 cells compared to the ones issued from hMEC, although no change was observed between hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-Kras^{V12} (Figure 4B and data not shown). Moreover, like observed in mass spectrometry, only a small amount of eIF3e was found in the purified ribosome fraction, coherent with the small proportion of eIF3 remaining associated with ribosomes in our experimental conditions. Overall, these data suggest that, in addition to RPL36A, epithelial and mesenchymal ribosomes showed difference of proportion in associated translational factors during EMT.

Change in ribosome composition at protein level might reflect change in total protein levels occurring during EMT. We thus analysed total protein levels by western blot in Zeb1-derived hMEC cellular models (Figure S8A). No variation in RPL36A protein level was observed between hMEC, hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-Kras^{V12} cells. These data suggested that change in proportion of RPL36A-associated ribosomes during EMT was not a side effect of variation in RPL36A protein levels and reinforce the existence of variation in ribosome composition at protein levels during EMT. Concerning the 12 eIF3 subunits, either no change or slight increase in total protein levels was observed in hMEC-mZeb1 cells compared to hMEC ones (eIF3a, eIF3c, eIF3d, eIF3e, eIF3f, eIF3g, eIF3i, eIF3l) (Figure S8A). This increase in some eIF3 subunits could not account for the observed decrease in proportion of eIF3-associated ribosomes. In contrast to ribosomal proteins, eIF3 complex is not contained within the ribosomes but rather differentially interact with the small 40S ribosome subunit during translation process. Since mass spectrometry data could not be explained by change in protein levels, we hypothesised that mass spectrometry data, obtained using purified ribosomes in

high salt concentration usually disrupting protein:protein interaction, reflected a change in affinity of eIF3 subunits for ribosomes in hMEC and hMEC-mZeb1 cells. Indeed, at lower salt concentration, not only eIF3b, eIF3e and eIF3h subunits were absent from the ribosome-free fraction but also did not show difference between the different purified ribosomes (Figure S8B). Altogether, these data indicated that ribosome composition at protein level varies during EMT but not during oncogenic EMT transformation, a decrease in eIF3-associated translation factor and an increase in RPL36A-containing ribosome proportion being observed between hMEC and hMEC-mZeb1 cells.

Intrinsic translational activity of ribosomes is altered during EMT

Our data revealed that ribosome composition is modified during EMT at both rRNA and protein levels that might affect their intrinsic activity of translation. To that purpose, we analysed ribosome readthrough. When ribosomes arrive at a stop codon, no corresponding tRNA exists and a release factor enters in the assembly site of the ribosomes to terminate the translation that is a highly efficient process⁵¹. But occasionally stop codon can be recognized by tRNA, reflecting a defect in one of the main functions of the ribosome, the decoding. This process, termed readthrough, is directly dependent upon ribosome activity and can be quantified using reporter assays. Briefly a galactosidase gene with stop codon is fused to a luciferase gene and luciferase can be detected only when a readthrough occurs.

Such reporter assays were transiently transfected in mZeb1 overexpressing hMEC models. Due to the difficulty to transfect hMEC cells, this experiment was performed at least 10 times to obtain robust data (Figure 5). We observed that hMEC cells exhibited the lowest percentage of readthrough (around 2%), while hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-Kras^{V12} exhibited similar percentage of readthrough (around 4%). These data suggest that epithelial and mesenchymal ribosomes presented different intrinsic activities, supporting the existence of ribosomes with different composition at epithelial and mesenchymal stages. Moreover, these data indicated that hMEC cells displayed a higher termination efficiency (i.e., less errors) than hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-Kras^{V12} cells. It suggested that during EMT, the global activity of ribosomes is less efficient and more prone to recognize stop codon.

Discussion

Reactivation of EMT transdifferentiates epithelial into mesenchymal cells that promotes neoplastic transformation through escape to fail-safe programs^{1,2,45}. This dynamic transition is driven by several EMT transcription factors that induce profound transcriptional reprogramming allowing loss of epithelial markers and acquisition of mesenchymal ones, paralleled with epigenetic events to lock cells into intermediate stages. To date, only few studies reported a role for translation in reactivating EMT-TFs expression and promoting EMT, although no study ever determines whether translation is modulated at genome-wide level during EMT. Using hMEC derived cellular models overexpressing the EMT-TF Zeb1, which induces complete EMT³, we depicted for the first time co-occurring change in translation and in composition of translational machinery during the oncogenic EMT commitment.

Using ribosome profiling, we observed that although a large proportion of genes (around 600) was differentially expressed at transcription level as expected, about the same proportion (around 750 additional genes) was differentially expressed at translational level. The transcriptionally regulated genes were also regulated at translational level, a positive correlation being observed between RNA-seq and Ribo-seq data for some genes (i.e., coupled transcription/translation). This concomitant transcriptional/translational regulation corresponds to the current dogma suggesting that change in mRNA levels directly affect change in protein levels. In contrast, the translationally regulated genes identified by Ribo-seq were not associated to change in transcription, although subsequent validation analyses need to be performed. Nevertheless, it supports the lack of concordance between mRNAs and proteins observed at genome-wide levels^{26,33} and the importance of translational regulation in numerous physiological processes²¹, now including EMT. The biological functions of the genes regulated at both transcriptional and translational levels, as well as most of the deregulated genes themselves, were previously associated with EMT, such as loss of cell adhesion. Another intriguing example, the translationally upregulation of SCARA3 a protein protecting from oxidative stress, supports the recent findings suggesting that EMT favours the tumorigenesis in absence of genomic instability by reducing ROS⁷. These data indicate that not only translation is modulated during EMT commitment but also that a profound translational reprogramming at least as important as the transcriptional one, occurs during EMT and contribute in the profound phenotypic change observed during EMT.

In parallel to change in translation, a modulation of ribosome composition was observed during oncogenic EMT commitment at both rRNA and protein levels. We observed that proportion of mesenchymal ribosomes associated with eIF3 complex was reduced compared to epithelial ones. It has been reported that loss of eIF3e^{52,53} or eIF3i⁵⁴ promotes EMT, supporting our

observations. However, the molecular mechanism by which eIF3 complex subunits regulate EMT has never been described. Based on the recent demonstration that eIF3 complex, in particular eIF3e and eIF3d subunits, regulates specific translation of some mRNAs involved in cell proliferation by cap-independent mechanism⁵⁵⁻⁵⁷, we might hypothesized that the observed change in ribosome associated translational factors promotes translational reprogramming of some genes involved in EMT. Additional change in ribosome composition was observed during EMT, including a modulation of rRNA 2'-O-Me profile associated with change in the related snoRNAs and an increase in the proportion of RPL36A-containing ribosome that does not reflect a change in total RPL36A protein level. No evidence reported so far suggest that rRNA 2'-O-Me or ribosomal protein could contribute in EMT. Moreover, while modulation of rRNA 2'-O-Me has been shown to directly affect translation of some mRNAs by cap-independent mechanism^{29,30}, no study ever investigated the role of RPL36A in specific translation. RPL36A is located in the vicinity of the exit tRNA domain and may affect translation efficiency of some mRNAs by reducing tRNA released. Nevertheless, the role of such change in ribosome composition in providing distinct translational activity is supported by the fact that epithelial and mesenchymal ribosomes exhibit distinct readthrough activities, suggesting at least a defect in decoding activity of the different ribosomes. One of the limits of this study relies on the fact that we cannot assess whether change in rRNA 2'-O-Me, RPL36A and eIF3 complex occur within the same or in contrast distinct ribosomes, being difficult to associate particular defects to specific change in ribosome composition. It has to be noted that the most important changes in ribosome composition (rRNA 2'-O-Me and proteins) and readthrough activity were observed between epithelial and mesenchymal cells and not between normal and transformed mesenchymal cells. Moreover, the rates of changes in rRNA 2'-O-Me were associated with the degree of EMT commitment, Zeb1 and Zeb2 EMT-TFs inducing a complete EMT commitment compared to Twist1. These data reinforce the strong relationship between change in ribosome composition and EMT. They demonstrate for the first time that composition of the translational machinery is changed during EMT and affects intrinsic activity of the ribosome that may contribute in EMT commitment.

We observed that in addition to being involved in classical EMT biological process, the translationally deregulated genes were involved in additional functions. It suggests that during EMT, some particular processes are mainly regulated at translational levels, such as vascularization and response to stimuli. Translational regulation has been largely described in these two processes, mainly by usage of cap-independent translation (i.e., Internal Ribosome Entry Site, IRES) in response to modulation of rRNA 2'-O-Me for example^{21,29,30,58}. As translation regulates one of the last steps of gene expression, it indeed is expected to rapidly change gene expression in response to stress to favour cell survival⁵⁹. During oncogenic EMT,

we might expect that this main function of translation in response to stress is maintained to allow cancer cell to escape failsafe program and to contribute in the acquisition of cancer hallmarks. In contrast to what observed in transcriptionally regulated genes and although the high number of translationally regulated genes, the enrichment in specific biological functions was less important for translationally compared to transcriptionally regulated genes, indicating that a few numbers of genes exhibit similar biological functions. It suggests that the common nodes between these genes could not refer to common biological functions but rather to common molecular mechanism regulating their translation, such as ribosome-modulated translation or subcellular specific translation. Interestingly, among the top 10 translationally regulated genes, several ones encode proteins located in the endoplasmic reticulum/golgi apparatus (up: ST3GAL5, SCARA3, SRGN, SCG2), a cellular compartment dedicated to produce post-translationally modified proteins usually addressed to the membrane or secreted, that are highly involved in EMT phenotypes (cell adhesion, invasion/migration...). rRNA 2'-O-Me at position 28S-Um2402 is located at the surface of the large ribosomal subunit closed to the exit peptide tunnel and to the binding site of SRP complex which dock the ribosomes on the endoplasmic reticulum⁶⁰. We may hypothesise that change in ribosome composition affects its subcellular location during EMT to regulate the translation of specific mRNA subset, suggesting a fine-optimization of ribosome composition to translate particular mRNAs involved in EMT phenotypic changes.

Altogether, our data showed for the first time that a profound translational reprogramming co-occurs with the well-known transcriptional reprogramming during EMT commitment to regulate expression of genes promoting cell plasticity. Moreover, epithelial and mesenchymal ribosomes exhibit distinct composition and intrinsic activity that may contribute in shaping the EMT translational landscape. During EMT, we can expect that transcription program produces a mix of both epithelial and mesenchymal mRNAs, whose proportion evolved during transition thanks to the epigenetic program that blocks cells in a given phenotypic state to maintain progress during transition, while change in epithelial and mesenchymal ribosome proportion allows differential translation of mRNAs depending on their steady-state levels (efficiency) and particular regulatory mechanisms or subcellular compartments (specificity). Such changes in ribosome composition might thus finely optimize the ribosome activities to translate with efficiency and specificity the epithelial and mesenchymal transcriptomes during EMT transition.

Competing interests

The authors declare that there have no competing interests.

Funding

This study was funded by PAIR Sein program (ARC_INCa_LNCC_7625), Fondation ARC (PJA 20161204686) and Ligue Contre le Cancer Comités Isère (PME 2017). FNVL was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer then from Fondation pour la Recherche Médicale.

Authors' contributions

FNVL, ABB, LB, AA, VMarchand, NP, AS, SGR, YM, YC and FC performed and analysed experiments. FNVL, YC, ON, JJD and VM analysed and interpreted the data. AA, JK, AV, YC and ON performed bioinformatics analyses. APM and AP provided cellular models. ON, JJD and VM shaped the research question and coordinated the project. FNVL, ON and VM supervised the daily experiments. FNVL, JJD and VM wrote the first draft of the manuscript.

Acknowledgements

We thank platforms' staffs that have not been referred as co-authors: EDyP Laboratory (Grenoble, France), NGS Platform (Vandoeuvre-les-Nancy, France), Bioinformatics Platform (Lyon, France), CIQLE (Lyon, France).

References

1. Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* **16**, 488–494 (2014).
2. Scheel, C. & Weinberg, R. A. Seminars in Cancer Biology. *Seminars in Cancer Biology* **22**, 396–403 (2012).
3. Morel, A.-P. *et al.* EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and Drive Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice. *PLoS Genet* **8**, e1002723 (2012).
4. Caramel, J. *et al.* A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–480 (2013).
5. Ansieau, S. *et al.* Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* **14**, 79–89 (2008).
6. Valsesia-Wittmann, S. *et al.* Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* **6**, 625–630 (2004).
7. Morel, A.-P. *et al.* A stemness-related ZEB1–MSRB3 axis governs cellular plasticity and breast cancer genome stability. *Nat Med* 1–17 (2017). doi:10.1038/nm.4323
8. Richard, G. *et al.* ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol Med* **8**, 1143–1161 (2016).
9. Battle, E. *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**, 84–89 (2000).
10. Cano, A. *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76–83 (2000).
11. Tam, W. L. & Weinberg, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* **19**, 1438–1449 (2013).
12. Evdokimova, V., Tognon, C. E. & Sorensen, P. H. B. On translational regulation and EMT. *Seminars in Cancer Biology* **22**, 437–445 (2012).
13. Beltran, M. *et al.* A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes & Development* **22**, 756–769 (2008).
14. Evdokimova, V. *et al.* Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* **15**, 402–415 (2009).
15. Petz, M., Them, N., Huber, H., Beug, H. & Mikulits, W. La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Research* **40**, 290–302 (2011).
16. Petz, M. *et al.* The leader region of Laminin B1 mRNA confers cap-independent translation. *Nucleic Acids Research* **35**, 2473–2482 (2007).
17. Petz, M., Them, N. C. C., Huber, H. & Mikulits, W. PDGF enhances IRES-mediated translation of Laminin B1 by cytoplasmic accumulation of La during epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Research* **40**, 9738–9749 (2012).
18. Chaudhury, A. *et al.* -mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective

- translational induction of Dab2 and ILEI. *Nature Publishing Group* **12**, 286–293 (2010).
19. Hussey, G. S. *et al.* Identification of an mRNP Complex Regulating Tumorigenesis at the Translational Elongation Step. *Molecular Cell* **41**, 419–431 (2011).
 20. Chaudhury, A. *et al.* CELF1 is a central node in post-transcriptional regulatory programmes underlying EMT. *Nature Communications* **7**, 1–15 (2016).
 21. Truitt, M. L. & Ruggero, D. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat Rev Cancer* **16**, 288–304 (2016).
 22. Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J. J. p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene* **34**, 5513–5523 (2015).
 23. Tahmasebi, S., Khoutorsky, A., Mathews, M. B. & Sonenberg, N. Translation deregulation in human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1–17 (2018). doi:10.1038/s41580-018-0034-x
 24. Marcel, V., Nguyen Van Long, F. & Diaz, J.-J. 40 Years of Research Put p53 in Translation. *Cancers* **10**, (2018).
 25. Xue, S. & Barna, M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 355–369 (2012).
 26. Dalla Venezia, N., Vincent, A., Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J.-J. Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control. *IJMS* **20**, (2019).
 27. Shi, Z. *et al.* Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Molecular Cell* **67**, 71–83.e7 (2017).
 28. 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).
 29. Marcel, V. *et al.* p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* **24**, 318–330 (2013).
 30. Erales, J. *et al.* Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **8**, 201707674 (2017).
 31. Belin, S. *et al.* *Purification of Ribosomes from Human Cell Lines*. (John Wiley & Sons, Inc., 2001). doi:10.1002/0471143030.cb0340s49
 32. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367–1372 (2008).
 33. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
 34. Krogh, N. & Nielsen, H. Sequencing-based methods for detection and quantitation of ribose methylations in RNA. *Methods* 1–11 (2018). doi:10.1016/j.ymeth.2018.11.017
 35. Birkedal, U. *et al.* Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 451–455 (2015).
 36. Marchand, V., Blanloeil-Oillo, F., Helm, M. & Motorin, Y. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Research* **44**, e135 (2016).
 37. Marchand, V. *et al.* in *Methods in Molecular Biology* **1562**, 171–187 (Springer New York, 2017).
 38. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218–223

- (2009).
39. Baudin-Baillieu, A., Hatin, I., Legendre, R. & Namy, O. Translation Analysis at the Genome Scale by Ribosome Profiling. *Methods Mol. Biol.* **1361**, 105–124 (2016).
 40. Xia, H. *et al.* EDIL3 is a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition controlling early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **63**, 863–873 (2015).
 41. Shi, J.-W. *et al.* The enforced expression of c-Myc in pig fibroblasts triggers mesenchymal-epithelial transition (MET) via F-actin reorganization and RhoA/Rock pathway inactivation. *cc* **12**, 1119–1127 (2013).
 42. Warzecha, C. C., Sato, T. K., Nabet, B., Hogenesch, J. B. & Carstens, R. P. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Molecular Cell* **33**, 591–601 (2009).
 43. Hatta, M., Miyake, Y., Uchida, K. & Yamazaki, J. Keratin 13 gene is epigenetically suppressed during transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in a human keratinocyte cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **496**, 381–386 (2018).
 44. Hansson, J. *et al.* Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *CellReports* **2**, 1579–1592 (2012).
 45. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 1420–1428 (2009).
 46. Falch, C. M. *et al.* Gene expression profiling of fast- and slow-growing non-functioning gonadotroph pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* **178**, 295–307 (2018).
 47. Mathow, D. *et al.* Zeb1 affects epithelial cell adhesion by diverting glycosphingolipid metabolism. *EMBO Rep* **16**, 321–331 (2015).
 48. Monaco, P., Marcel, V., Diaz, J.-J. & Catez, F. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules* **8**, 106 (2018).
 49. Wei, J. *et al.* Ribosomal Proteins Regulate MHC Class I Peptide Generation for Immunosurveillance. *Molecular Cell* 1–18 (2019). doi:10.1016/j.molcel.2018.12.020
 50. Georges, des, A. *et al.* Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex. *Nature Publishing Group* **525**, 491–495 (2015).
 51. Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.-P. & Namy, O. Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 679–688 (2012).
 52. Gillis, L. D. & Lewis, S. M. Decreased eIF3e/Int6 expression causes epithelial-to-mesenchymal transition in breast epithelial cells. *Oncogene* **32**, 3598–3605 (2013).
 53. Desnoyers, G., Frost, L. D., Courteau, L., Wall, M. L. & Lewis, S. M. Decreased eIF3e Expression Can Mediate Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Activation of the TGF β Signaling Pathway. *Molecular Cancer Research* **13**, 1421–1430 (2015).
 54. Perez, R. E., Navarro, A., Rezaiekhalthigh, M. H., Mabry, S. M. & Ekekezie, I. I. TRIP-1 regulates TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition of human lung epithelial cell line A549. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* **300**, L799–L807 (2011).
 55. Lee, A. S., Kranzusch, P. J., Doudna, J. A. & Cate, J. H. D. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature* **536**, 96–99 (2016).

56. Lee, A. S. Y., Kranzusch, P. J. & Cate, J. H. D. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature* **522**, 111–114 (2015).
57. Grzmil, M. *et al.* An oncogenic role of eIF3e/INT6 in human breast cancer. *Oncogene* **29**, 4080–4089 (2010).
58. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**, 731–745 (2009).
59. Liu, B. & Qian, S.-B. Translational reprogramming in cellular stress response. *WIREs RNA* **5**, 301–305 (2013).
60. Reid, D. W. & Nicchitta, C. V. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature Publishing Group* **16**, 221–231 (2015).

Figure legends

Figure 1. Translational landscape during human Epithelial-to-Mesenchymal Transition using ribosome profiling. (A) Schematic representation of ribosome profiling.

Cytoplasmic lysates containing actively-translated mRNAs were divided in two fractions to purify RNA allowing quantification of the RNA levels by RNA-seq after ribodepletion (RNA-seq, top panel) or to purify mRNA-associated ribosomes by polysome gradients allowing quantification of ribosome-protected mRNAs by RNA-seq after nuclease digestion (Ribo-seq, bottom panel). **(B) Example of polysome profiles in the three EMT-derived cellular models.** To perform Ribo-seq, mRNA-associated ribosomes corresponding to actively-translated mRNAs were collected by polysome gradients (n=3). The three EMT-derived cellular models, hMEC, hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-Kras^{V12}, exhibited similar polysome profiles. **(C) Comparison of RNA-seq and Ribo-seq data in hMEC vs hMEC-mZeb1 cell lines.** Using read counts, fold-changes (FC) between hMEC and hMEC-mZEB1 were determined for RNA-seq and Ribo-seq (n=3). Significant FC > |2| (P-adj < 0.001) were then plotted as Log₂(FC) to compare RNA-seq data (i.e., change in transcription, mRNA export and stability) and Ribo-seq data (i.e., change in ribosome footprinting). In hMEC vs hMEC-mZeb1 cells, two classes of genes were identified: those whose transcription and translation varies concomitantly (orange); and those whose translation only varies (blue). No gene whose transcription only varies was identified in hMEC vs hMEC-mZeb1 (red). **(D) Proportion of genes identified by ribosome profiling in the three EMT-derived cellular models.** During the transition from epithelial to mesenchymal cells (hMEC vs hMEC-mZeb1) and from the mesenchymal cells to mesenchymal initiated cells (hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12}), around 45% of genes presented variation in coupled transcription/translation and 55% in translation only (n=3). Number of genes up- or down-regulated are detailed. Coupled transcription/translation: orange; translation only: blue.

Figure 2. Change in rRNA methylation between epithelial and mesenchymal cell lines.

(A) Identification of rRNA sites whose methylation is modified during EMT. Total RNA was subjected to RiboMETH-seq to quantify rRNA methylation frequency at the 106 rRNA sites (n=6). Comparison of rRNA methylation in hMEC and hMEC-mZeb1 revealed 2 sites whose methylation frequency is significantly, but oppositely, modified: 28S-Um2402, whose methylation frequency increase in hMEC-mZeb1 compared to hMEC; and 28S-Gm4588, whose methylation frequency decrease in hMEC-mZeb1 compared to hMEC. **(B-C) snoRNA expression levels.** RNA levels of snoRNAs associated with significantly rRNA methylation

sites (28S-Gm-4588, B; 28S-Um2402, C) were quantified by RT-qPCR (n=6). Compared to hMEC, a significant decrease in SNORD143 levels were observed in hMEC-mZeb1, as well as a slight increase in SNORD91A and a slight decrease in SNORD144. *: P-value < 0.05.

Figure 3. Change in protein composition of between epithelial and mesenchymal ribosomes. (A) Identification of ribosomal protein and canonical factors of translation whose proportion in ribosome is modified during EMT. Cytoplasmic ribosomes were purified in 500 mM KCl and subjected to mass spectrometry to identified change of ribosome in protein composition (n=5). Among the proteins whose ribosome proportion was significantly modified between hMEC and hMEC-mZeb1 cells, only one ribosomal protein was identified, RPL36A. Moreover, protein proportion of 12 out of the 13 subunits of the eIF3 complex were significantly modulated. **(B) Validation of mass spectrometry data by western blot.** Ribosomes were purified from *de novo* cytoplasmic lysates and ribosome as well as ribosome-free fractions were analysed by western blot (n=2). Proportion of ribosomes containing RPL36A was higher in hMEC-mZeb1 cells than in hMEC. In contrast, although amount of eIF3 co-purified with ribosomes at 500 mM KCl was low, it appeared that less ribosomes contained eIF3e in hMEC-mZeb1 cells than in hMEC-mZeb1. RPS6 and RPL19: ribosome loading controls; kDa: kilo Daltons, molecular weight of proteins.

Figure 4. Modulation of ribosomal readthrough activity during EMT. Readthrough activity of epithelial and mesenchymal ribosomes was compared using luciferase reporter assays that contains UGA-C stop codon (n=10 in triplicates). While no change in readthrough percentage was observed between hMEC-mZeb1 and hMEC-mZeb1-Kras^{V12}, a significant 2-fold increase in readthrough percentage was observed between hMEC and hMEC-mZeb1.

Table 1. Top 10 genes determined by Ribosome profiling in hMEC vs hMEC-mZeb1 cells.

Gene	UP		Gene	DOWN	
	Log2(FC)	P-value		Log2(FC)	P-value
Coupled transcription/translation					
JAM3	6,024	8,55E-157	ATP2C2	-6,95	1,93E-149
CDH11*	5,829	7,28E-79	PRSS8*	-6,722	4,64E-80
CPA4	5,37	1,28E-39	ANO1*	-6,385	7,39E-30
ZEB2*	5,17	2,66E-46	FRMD3	-6,222	1,41E-81
SULF1*	4,972	1,92E-43	ESRP1*	-5,881	4,87E-125
ADAM23*	4,956	1,31E-69	LSR*	-5,848	8,82E-141
EDIL3*	4,786	1,60E-63	GRHL1*	-5,816	1,94E-50
DPYSL3*	4,776	9,01E-61	KRT15*	-5,792	3,08E-67
COL5A2*	4,706	4,29E-77	NUP210*	-5,629	5,16E-89
EYA4	4,638	1,58E-33	MYH14	-5,515	2,48E-56
Translation only					
NLGN4Y	3,145	1,86E-16	DDR2*	-3,668	6,89E-23
PCDH18*	3,008	1,10E-12	SOX10*	-3,322	1,12E-15
ST3GAL5*	2,8	1,78E-22	SORCS2	-3,311	2,09E-18
SULT1B1	2,728	1,21E-11	LNX1	-3,222	7,86E-19
PDE4B	2,707	1,85E-11	TM6SF1	-3,14	5,15E-10
SCARA3	2,355	1,18E-10	GPR1	-3,137	4,16E-17
SRGN*	2,343	1,09E-16	SLC27A6	-3,044	8,91E-15
SLC4A8	2,314	2,93E-05	RYR2*	-2,885	5,34E-18
PADI3	2,282	4,29E-08	LGALS7	-2,859	4,03E-10
SCG2	2,277	4,36E-06	ZG16B	-2,742	2,18E-11

*Role or markers in EMT described in the literature

Table 2. Gene enrichment of significant genes determined by Ribosome profiling in hMEC vs hMEC-mZeb1 cells.

Biological process	Fold-enrichment	Count	Percentage (%)	P-value [#]
Coupled transcription/translation[§]				
UP				
Enzyme linked receptor protein signaling pathway	2,78	32	15,1	1,33E-04
Organ morphogenesis	2,71	32	15,1	9,75E-05
Animal organ development	1,88	70	33,1	8,42E-06
Cell differentiation	1,84	80	37,9	4,04E-06
Cellular developmental process	1,81	86	40,7	5,15E-07
System development	1,82	93	44,0	5,79E-08
Anatomical structure development	1,64	108	51,1	5,78E-08
Single-organism developmental process	1,66	109	51,6	4,82E-08
Multicellular organism development	1,77	103	48,8	1,78E-08
DOWN				
Morphogenesis of an epithelium	2,93	31	8,1	2,44E-04
Regulation of localization	1,61	81	21,3	2,35E-04
Localization of cell	1,92	52	13,7	2,12E-04
Cell motility	1,92	52	13,7	2,12E-04
Locomotion	1,80	56	14,7	1,15E-04
Tissue development	1,94	69	18,2	1,02E-04
Regulation of cell adhesion	2,60	34	8,9	7,46E-05
Epithelium development	2,35	51	13,4	4,11E-05
Cell adhesion	2,00	69	18,2	4,13E-06
Biological adhesion	1,99	69	18,2	7,55E-07
Translation only[£]				
UP				
Regulation of cellular component movement	2,28	37	9,6	5,92E-04
Vasculature development	2,69	33	8,5	5,00E-04
Angiogenesis	3,00	25	6,4	4,09E-04
Blood vessel morphogenesis	2,82	28	7,2	3,22E-04
Anatomical structure formation involved in morphogenesis	1,98	46	11,9	2,90E-04
Regulation of locomotion	2,26	35	9,0	2,70E-04

Blood vessel development	2,84	33	8,5	2,01E-04
Anatomical structure morphogenesis	1,66	88	22,8	1,36E-04
Extracellular structure organization	3,55	24	6,2	1,01E-04
Movement of cell or subcellular component	1,87	68	17,6	8,95E-05

DOWN

NA

#Adjusted Benjamini P-value. \$ P-value < 0.001 and Fold-enrichment > 1.5. £ P-value < 0.05 and Fold-enrichment > 1.5

Table 3. Top 10 genes determined by Ribosome profiling in hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12} cells.

UP			DOWN		
Gene	Log2(FC)	P-value	Gene	Log2(FC)	P-value
Coupled transcription/translation					
FRMD3	7,069	6,33E-105	SLC22A17	-6,107	7,03E-24
BMF*	5,716	1,01E-52	CADPS2	-5,953	1,95E-80
PSCA*	5,017	1,84E-35	TUSC1	-5,784	3,64E-31
RNLS	4,976	1,44E-62	KRT14*	-4,658	2,04E-59
NID2	4,604	3,68E-43	DACH2	-4,62	1,37E-27
DTX3	4,351	9,27E-34	RHOJ	-4,568	5,09E-41
SLC35G2	4,254	6,03E-47	TGM1*	-4,568	3,64E-27
COL6A3*	4,219	6,50E-32	MGAM	-4,518	7,98E-30
CSPG4*	3,984	3,23E-35	MRGPRX3	-4,271	5,13E-113
SMAD4*	3,953	8,74E-90	GLB1L3	-4,22	9,33E-20
Translation only					
S100P*	4,448	4,50E-37	KRT27	-4,563	9,41E-18
DDR2*	4,289	9,71E-31	PCSK1N	-4,065	2,05E-11
PHACT1	3,155	NA	CHST4	-3,056	2,43E-06
C5AR1*	3,079	NA	MAF	-3,006	2,06E-05
WEE2	2,791	1,59E-4	AGTR1*	-2,719	1,98E-07
TTLL9	2,714	1,33E-4	RAB9B	-2,58	6,16E-09
CUX2	2,695	2,88E-11	MACC1*	-2,558	1,76E-07
RTN4RL2	2,607	5,62E-11	CXCL1*	-2,523	2,22E-13
GYPC	2,567	7,65E-13	SCARA3	-2,514	7,42E-12
PPP1R1B	2,544	NA	SALL2	-2,502	1,78E-4

*Role or markers in EMT described in the literature

Table 4. Gene enrichment of significant genes determined by Ribosome profiling in hMEC-mZeb1-Kras^{V12} cells.

Biological process	Fold-enrichment	Count	Percentage (%)	P-value [#]
Coupled transcription/translation				
UP[£]				
Cell motility	1,90	24	13,7	0,0290
Anatomical structure formation involved in morphogenesis	2,01	22	12,5	0,0270
Regulation of molecular function	1,62	44	25,1	0,0116
Single-organism metabolic process	1,50	58	33,1	0,0110
Tissue development	2,14	36	20,5	0,0106
Regulation of signaling	1,61	47	26,8	0,0104
Single-organism localization	1,54	53	30,2	0,0093
Negative regulation of multicellular organismal process	2,38	23	13,1	0,0063
Locomotion	1,97	29	16,5	0,0034
Anatomical structure morphogenesis	1,84	46	26,2	0,0021
DOWN[§]				
Extracellular structure organization	4,22	22	7,8	1,05E-05
Tissue development	2,12	58	20,7	8,82E-06
System development	1,67	112	40,1	2,69E-07
Single-organism developmental process	1,53	130	46,5	2,50E-07
Multicellular organism development	1,62	123	44,0	2,46E-07
Locomotion	2,27	54	19,3	1,41E-07
Anatomical structure morphogenesis	1,98	81	29,0	4,16E-08
Developmental process	1,53	134	48,0	3,52E-08
Cell adhesion	2,54	67	24,0	1,44E-10
Biological adhesion	2,52	67	24,0	3,04E-11
Translation only				
UP[£]				
NA				
DOWN[§]				
Biological adhesion	1,77	35	16,3	0,0038
Cell motility	2,07	32	14,9	0,0025

Localization of cell	2,07	32	14,9	0,0025
Regulation of cell proliferation	2,2	40	18,6	0,0021
Taxis	2,96	19	8,8	0,0017
Locomotion	1,92	34	15,8	0,0017
Regulation of molecular function	1,69	56	26,1	0,0014
System development	1,58	79	36,9	0,0014
Response to external stimulus	1,91	46	21,4	0,0007
Positive regulation of response to stimulus	2,00	47	21,9	0,0005

#Adjusted Benjamini P-value. \$ P-value < 0.001 and Fold-enrichment > 1.5. £ P-value < 0.05 and Fold-enrichment > 1.5

Table 5. Significant change in ribosome composition between hMEC-mZeb1 and hMEC cell lines analyzed by mass spectrometry.

Protein_names	Gene_names	P_Value	Log2(FC)
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	EIF3D	1,64E-05	-1,90
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	7,16E-05	-2,21
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	EIF4G3	4,82E-04	-1,39
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	EIF4G2	5,06E-04	-2,36
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	5,16E-04	-1,38
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	6,13E-04	-1,58
Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2	EIF4E2	6,90E-04	-2,00
Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	7,19E-04	-2,16
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	EIF3L	1,46E-03	-1,35
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I	1,78E-03	-1,73
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	2,50E-03	-1,30
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B	2,75E-03	-1,18
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F	3,52E-03	-1,32
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M	3,60E-03	-1,28
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	EIF3H	3,66E-03	-1,31
60S ribosomal protein L36a-like; L36a	RPL36AL;RPL36A	4,02E-03	1,67
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	4,85E-03	-0,82
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	EIF3K	5,38E-03	-1,34
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	EIF3G	7,00E-03	-1,16
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	EIF2S2	9,17E-03	-1,40

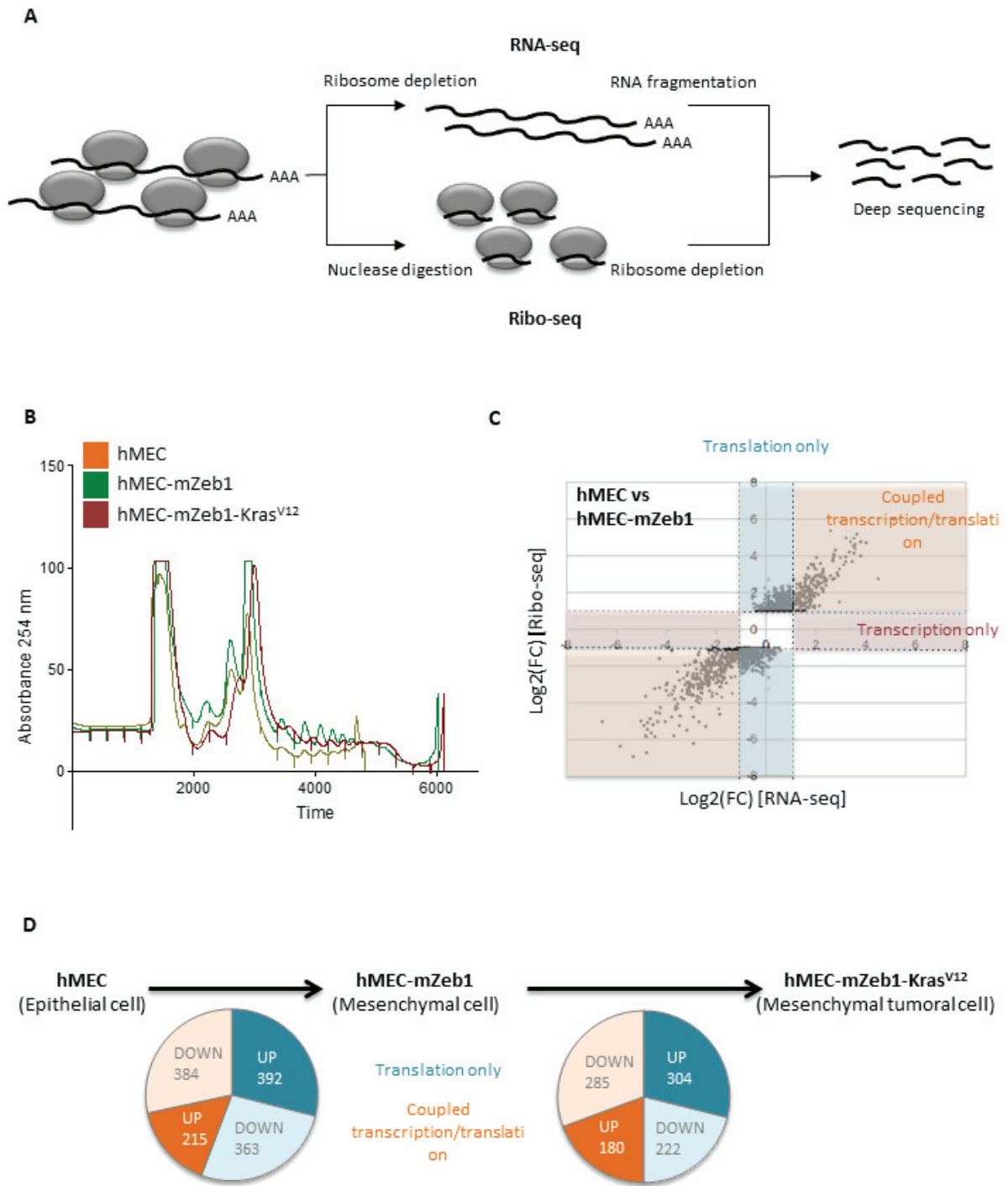
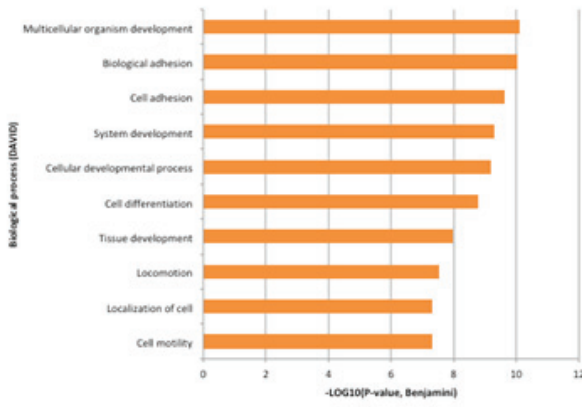


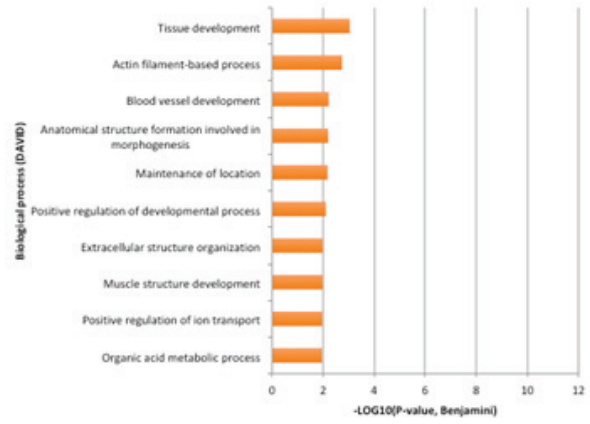
Figure 1.

A

**hMEC vs hMEC-mZeb1
Coupled transcription/translation
(all genes)**

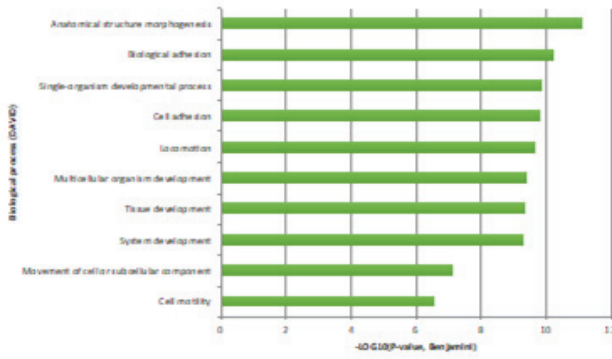


**hMEC vs hMEC-mZeb1
Translation only (all genes)**



B

**hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12}
Coupled transcription/translation
(all genes)**



**hMEC-mZeb1 vs hMEC-mZeb1-Kras^{V12}
Translation only (all genes)**

NA

Figure2.

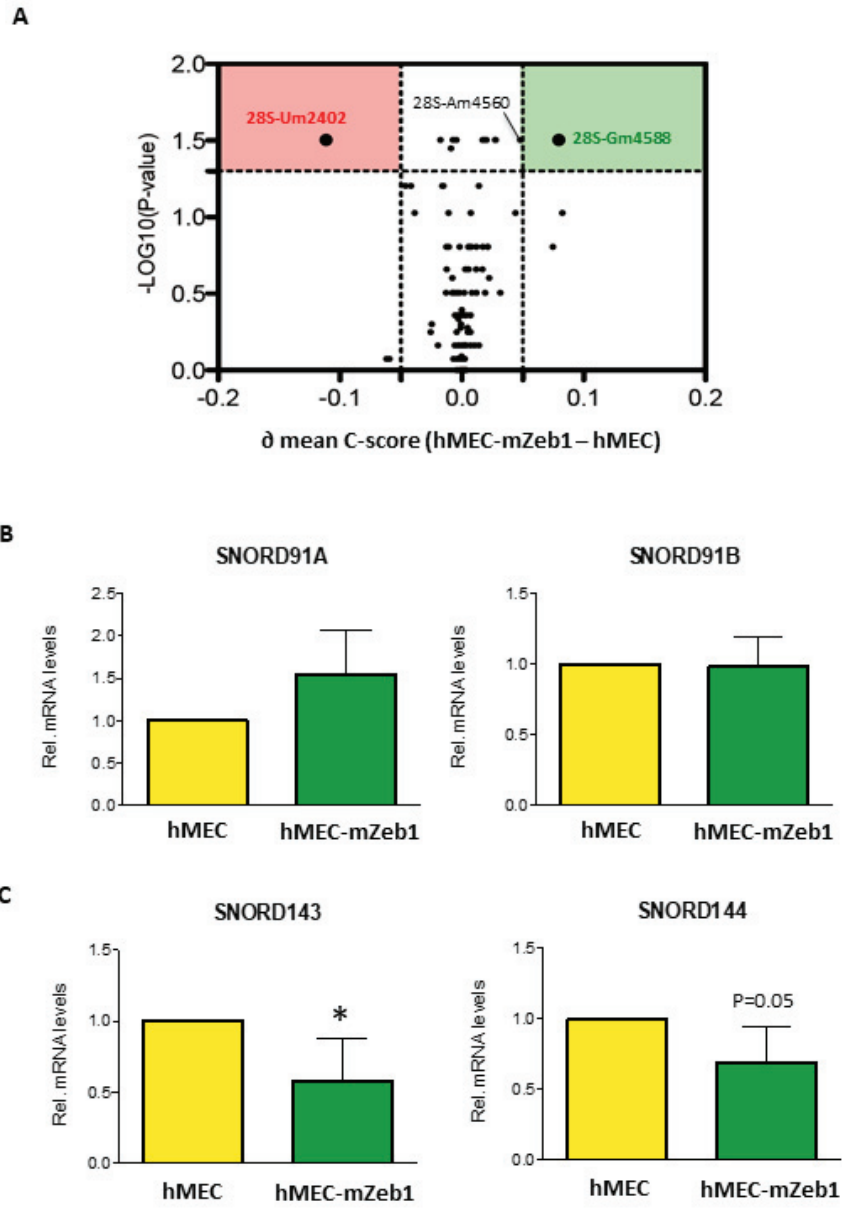


Figure 3.

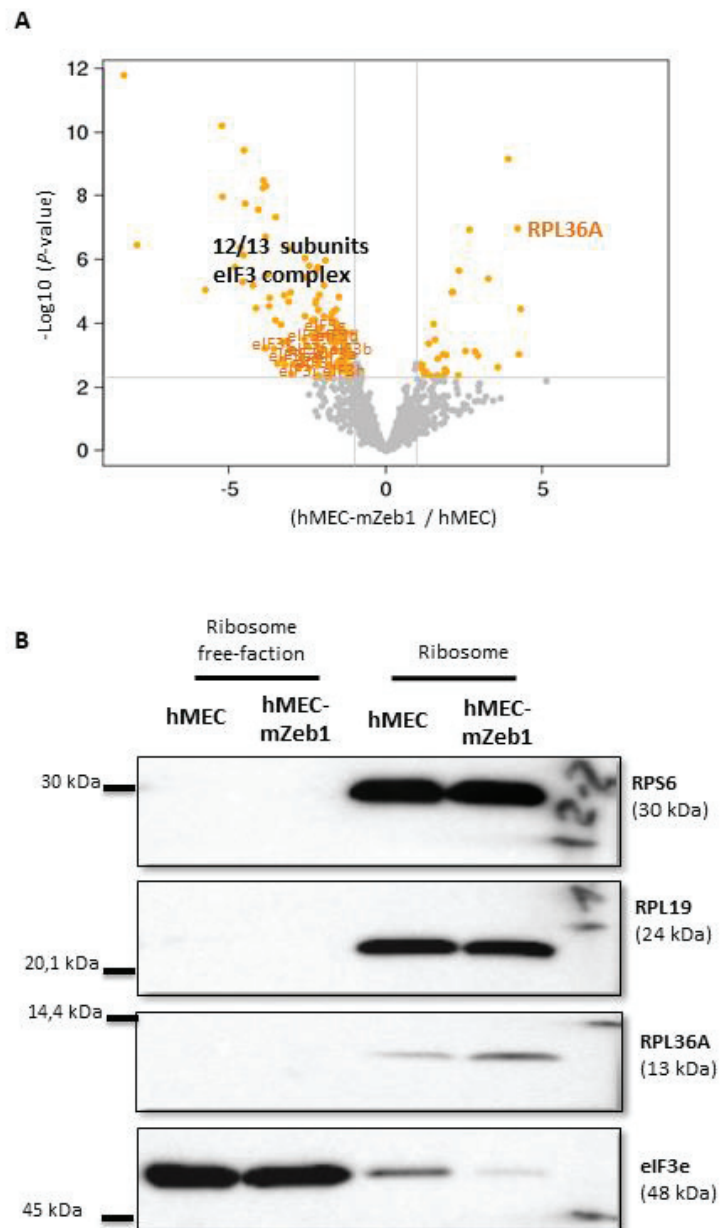


Figure 4.

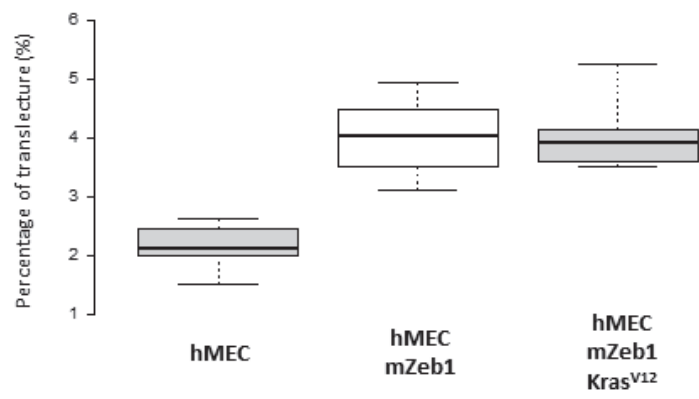
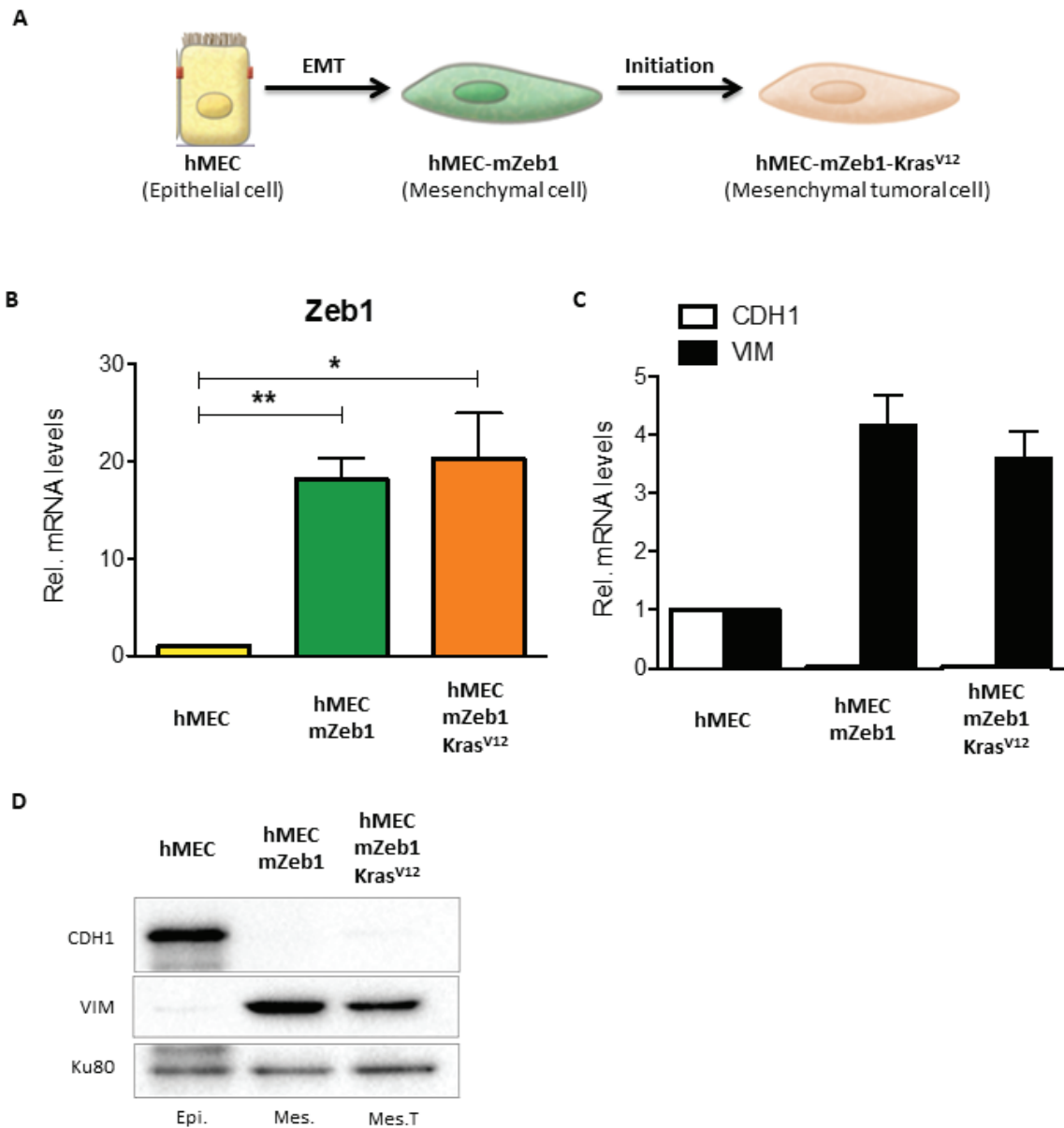
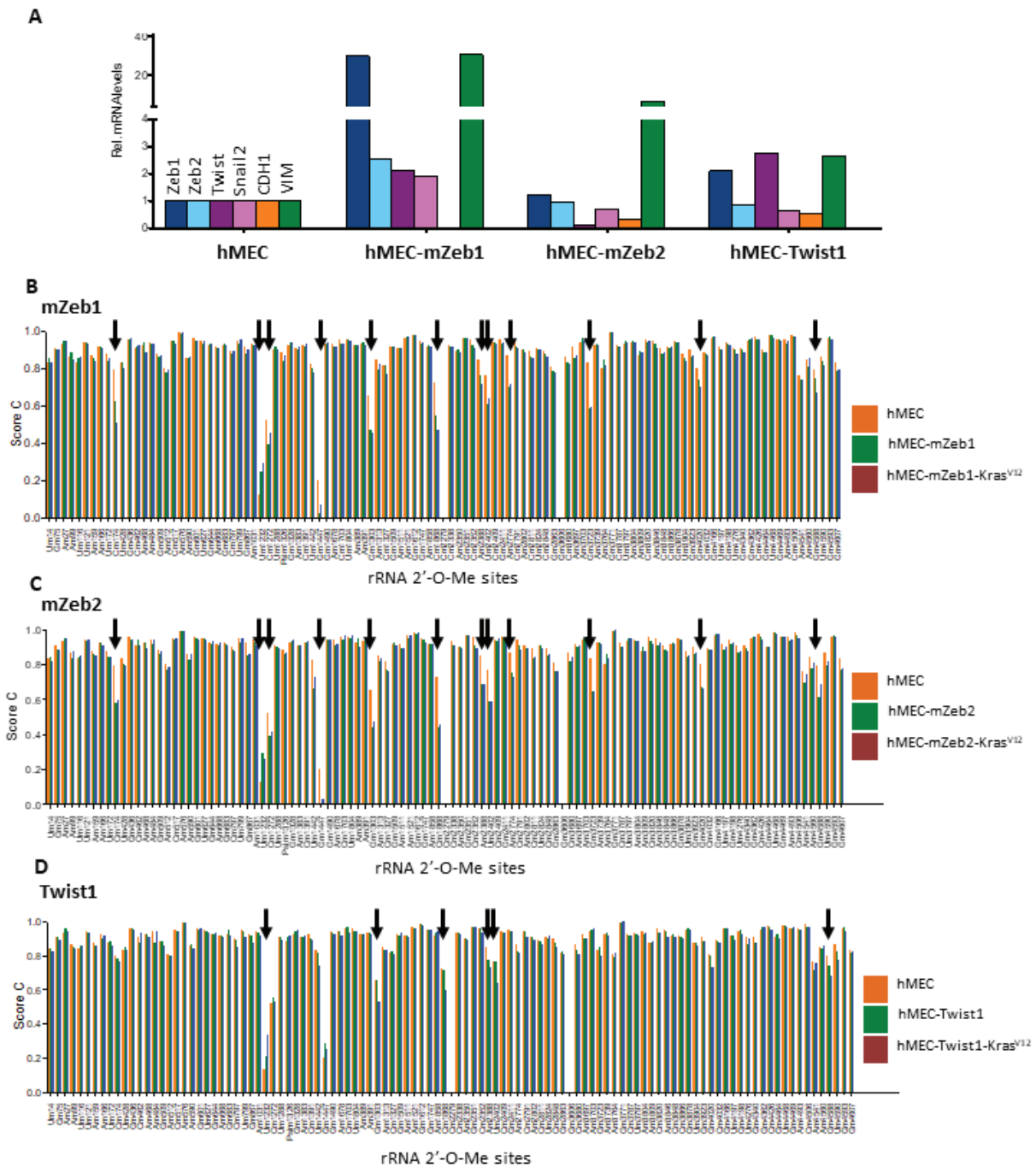


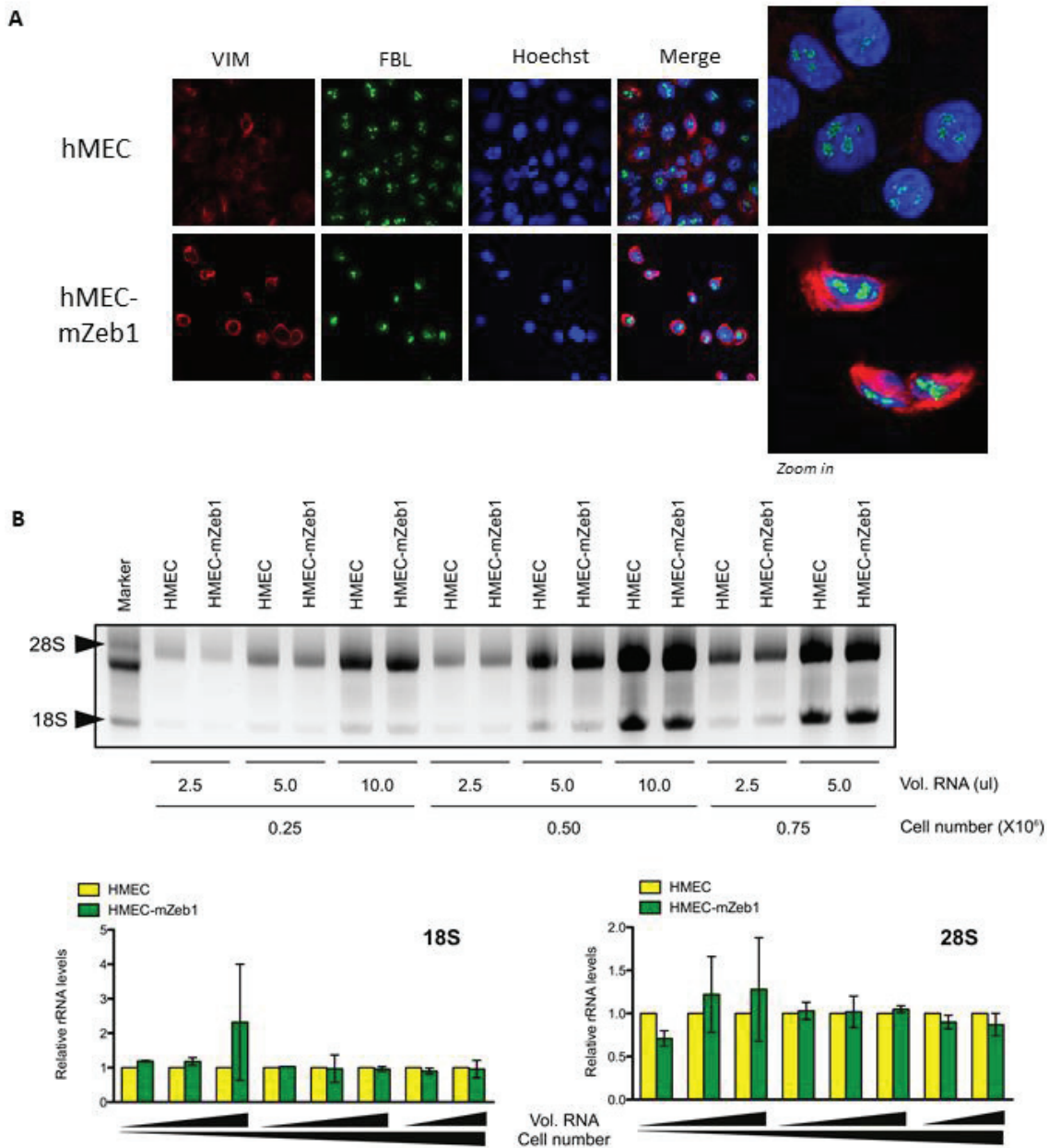
Figure 5.



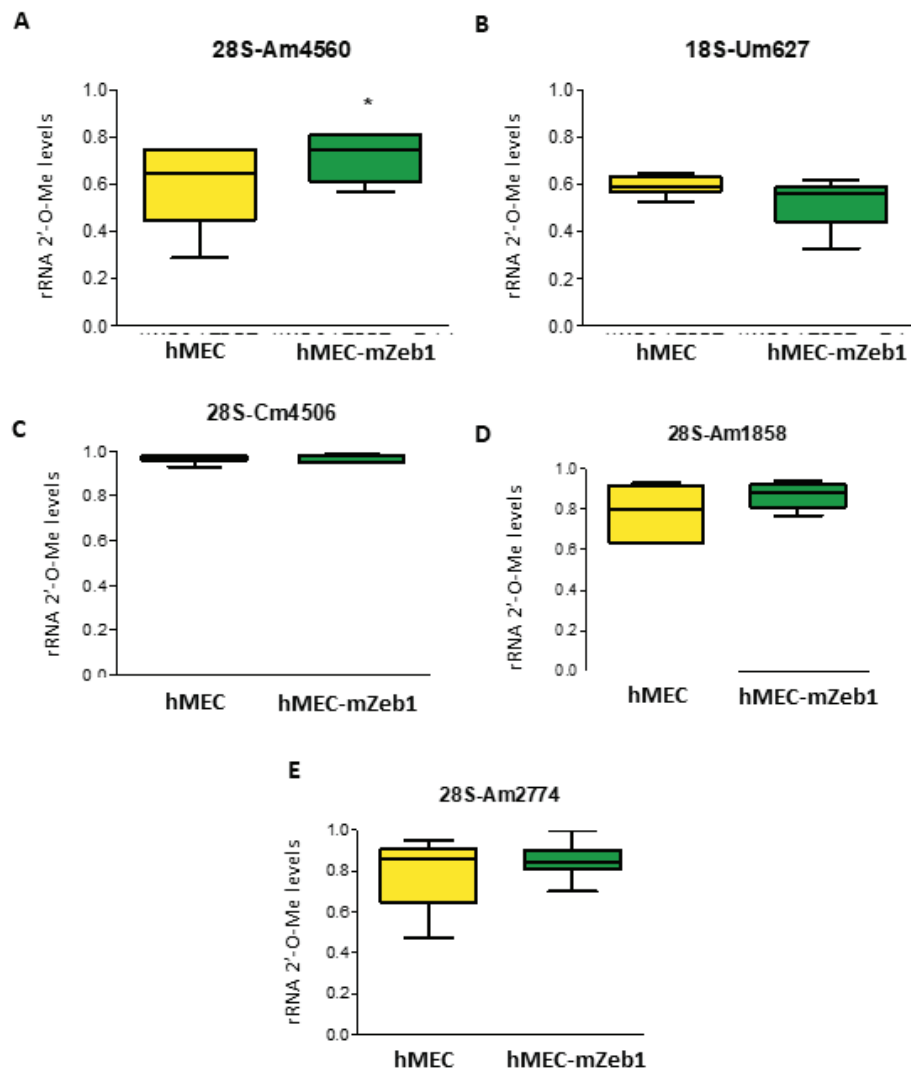
Supplementary Figure 1. Cellular model mimicking EMT-induced tumorigenesis. (A) Schematic representation of the 3 stable cellular cell lines. Human mammary epithelial cell line (hMEC) corresponds to epithelial cells. EMT was induced in hMEC by overexpressing the murine form of the EMT transcription factor Zeb1. Overexpression of an active mutant form of the oncogene K-ras (mutant Kras^{V12}) promotes tumour initiation in mesenchymal cells (Morel et al, PLoS Genet 2012). (B-C) Expression of key EMT markers. mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR in the 3 cell lines to validate Zeb1 overexpression (B) and determine change in expression of key EMT markers, CDH1 and VIM (C) (n=3). A significant increase in Zeb1 and VIM was observed in hMEC-mZEB1 and hMEC-mZEB1-Kras^{V12}, concomitantly with a significant decreased in CDH1 expression. *: P < 0.05; **: P < 0.001; ***: P < 0.0001). (D) Protein levels of key EMT markers. Western blot analyses confirm the decreased expression of CDH1 in mesenchymal (Mes.) and mesenchymal initiated cells (Mes.T) compared to the epithelial ones (Epi.) that is paralleled with an increase in VIM protein levels (n=3). Ku80: loading control.



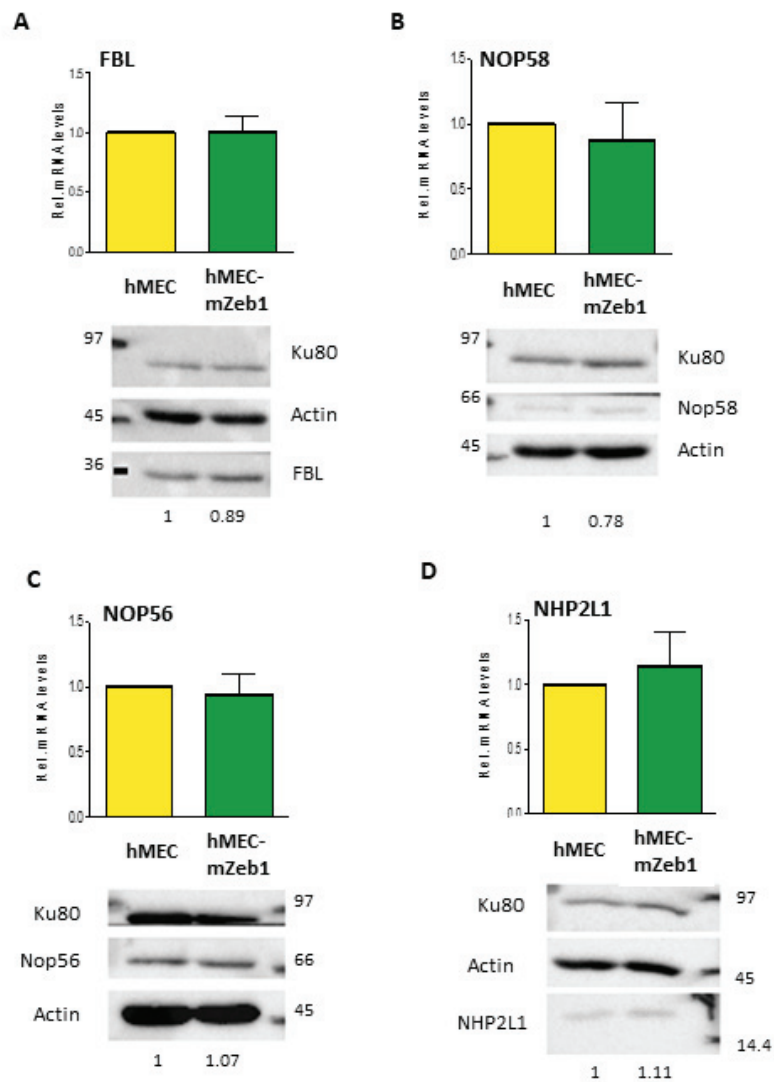
Supplementary Figure 2. Change in rRNA 2'-O-Me profiles across different EMT cellular models. (A) Expression of key EMT markers. mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR in hMEC-derived cell lines overexpressing 3 different EMT transcription factors (Zeb1, Zeb2 and Twist1) to validate epithelial vs mesenchymal status (n=1). (B-D) rRNA 2'-O-Me profiles. Using RibomETH-seq, rRNA 2'-O-Me frequency (y axis, C-score) were compared in hMEC-derived cell lines overexpressing the 3 EMT transcription factors, alone or in combination with Kras^{V12} (n=1). The strongest difference in rRNA 24-O-Me profiles were observed between hMEC (orange) and hMEC overexpressing the EMT transcription factor (green), although these difference were less important in hMEC overexpressing Twist1.



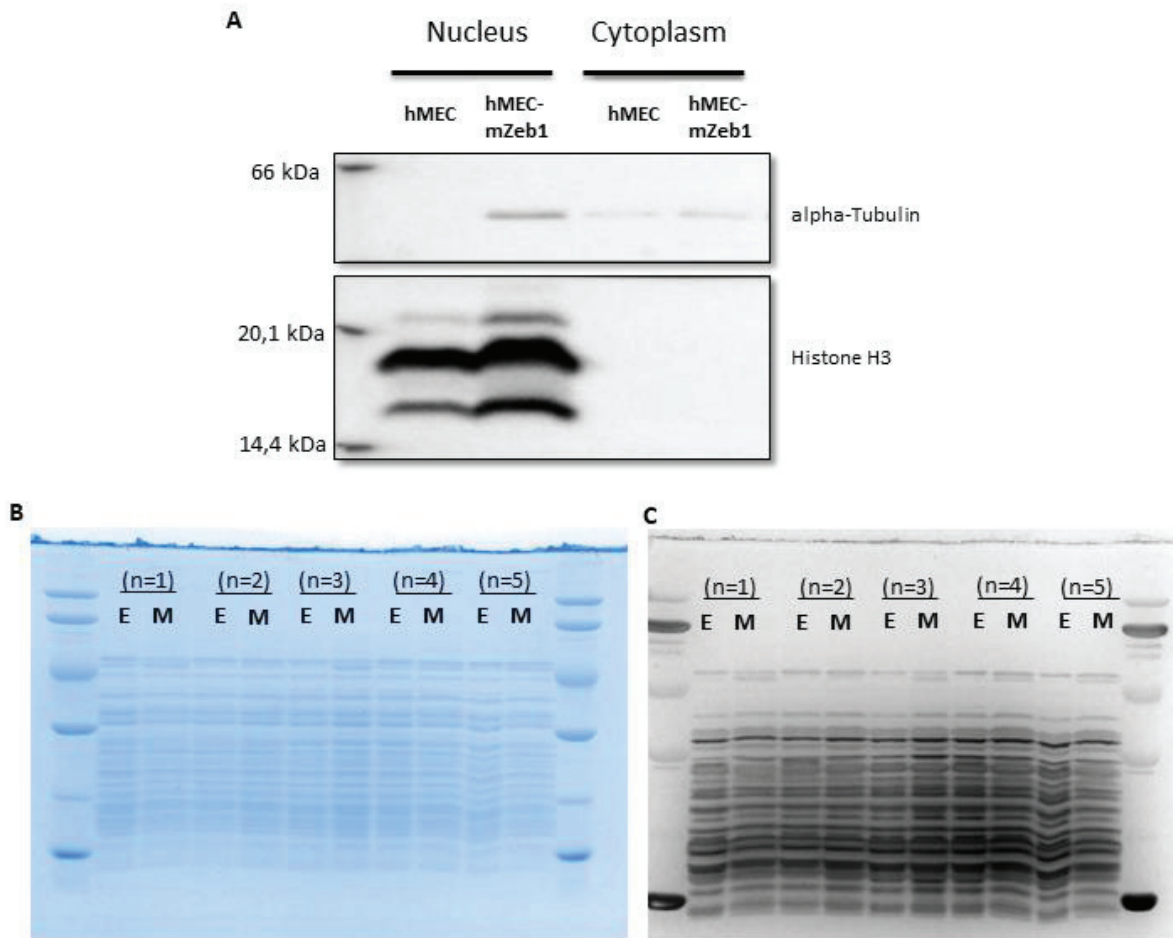
Supplementary Figure 3. Analysis of ribosome biogenesis . (A) Nucleoli, location of ribosome biogenesis, were analysed by confocal microscopy (x 100). In hMEC and hMEC-mZeb1, nucleoli presented the same organization (n=3). VIM: vimentin, a mesenchymal marker; FBL: fibrillar, a nucleoli marker; Hoechst: an intercalant DNA. **(B)** Ribosomal RNA amounts were quantified in hMEC and hMEC-mZeb1. Direct quantification of 28S and 18S was performed on total RNA separated on 2% agarose gel using image J software (n=5). No change in rRNA amount was observed in hMEC and hMEC-mZeb1 cells.



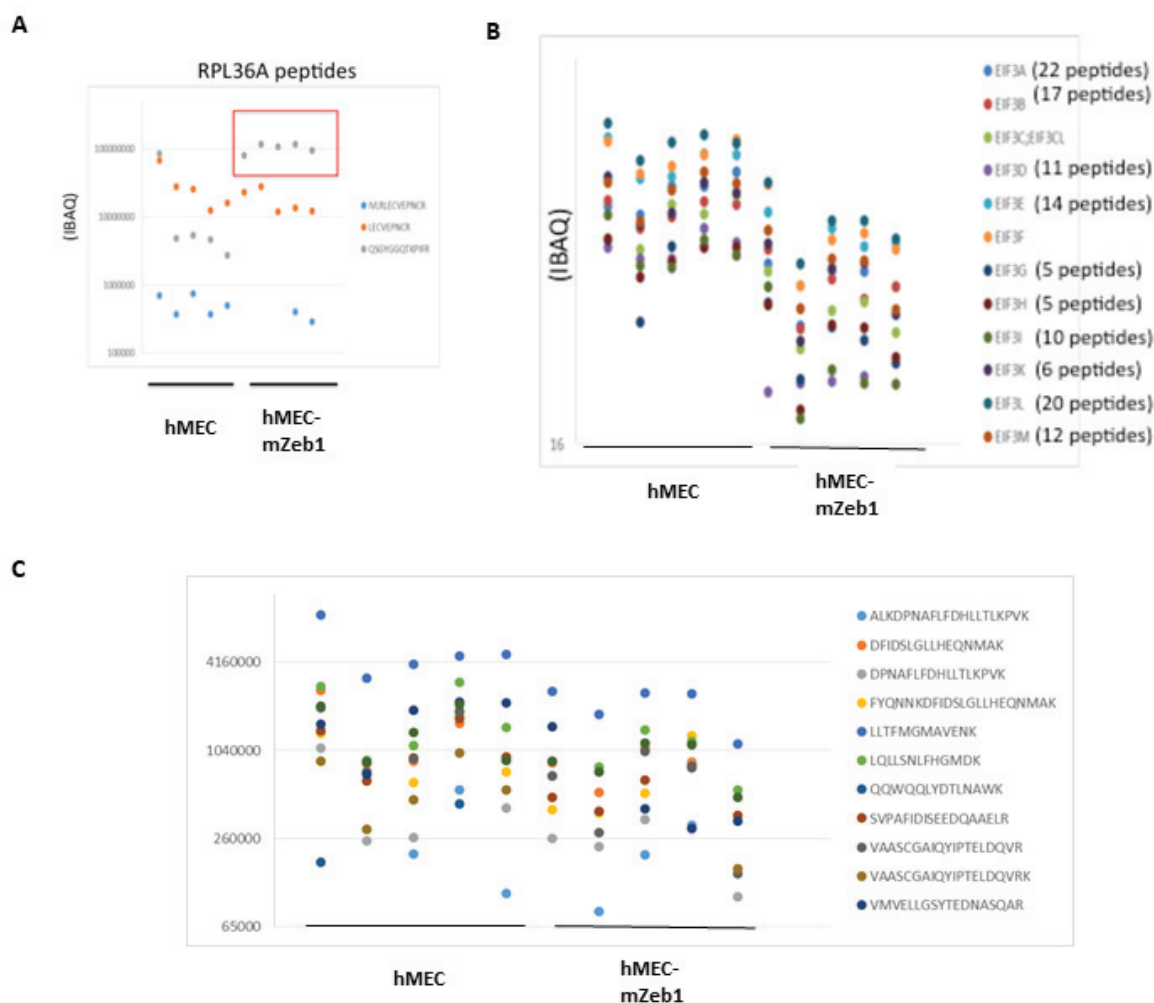
Supplementary Figure 4. Validation of RiboMETH-seq by RT-qPCR. (A-E) rRNA 2'-O-Me levels were determined by RT-qPCR using specific primers to 5 sites: 28S-Am4560 (A); 18S-Um627 (B); 28S-Cm4506 (C); 28S-Am1858 (D); and 28S-Am2774 (E) (n=6). A significant increase in rRNA 2'-O-Me was observed at 28S-Am4560 sites (A) but not in others (B-E). *: $P < 0.05$.



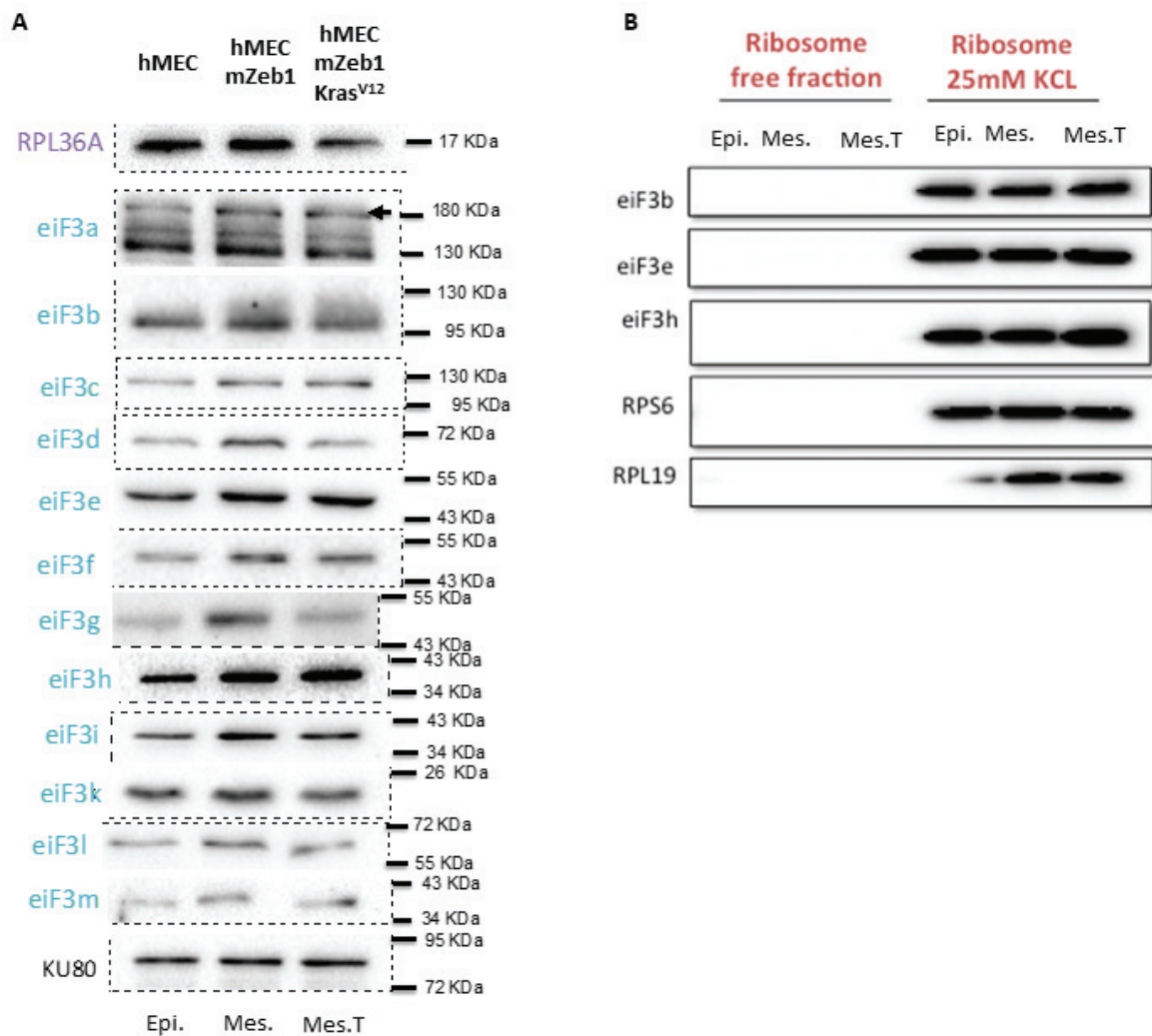
Supplementary Figure 5. Expression of protein components of the rRNA 2'-O-Me complex in epithelial and mesenchymal cells. (A-D) Expression of the 4 genes involved in the rRNA 2'-O-Me complex, FBL (A), NOP58 (B), NOP56 (C) and NHP2L1 (D), was analysed at mRNA levels by RT-qPCR (upper panels) and at protein levels by western blot (lower panels) (n=3). No change in gene expression was observed between epithelial (hMEC) and mesenchymal cells (hMEC-mZeb1). Ku80 and Actin: loading control; size are indicated on western blot side (kDa); western blot quantification is presented on the bottom as a fold-change.



Supplementary Figure 6. Validation of ribosome purification prior mass spectrometry analysis. (A) Example of nucleus/cytoplasm fractionation. Nucleus/cytoplasm fractionation was validated by western blot using alpha-tubulin as marker of nucleus/cytoplasm and histone H3 as strict marker of nucleus (n=5). No histone H3 protein was detected in the cytoplasm fractions of both hMEC and hMEC-mZeb1 cells. Size are indicated on western blot side (kDa). (B-C) Comparison of the ribosomal protein profiles. Five ribosome purification at 500 mM KCl were processed to perform mass spectrometry and their 1D separation on a 12.5% polyacrylamide gel of 5 µg of total proteins showed similar profiles both using coomassie blue staining (B) or silver staining (C).



Supplementary Figure 7. Peptide counts in mass spectrometry analysis. (A) RPL36A-related peptide raw counts. In mass spectrometry analysis, 3 peptides correspond to RPL36A (blue, orange, gray). Among these 3 peptides, only 1 peptide supports the statistical increased proportion of RPL36A in hMEC-mZeb1 ribosomes compared to hMEC ribosomes (grey). (B) EIF3-related peptide raw counts. Mean raw counts of the different peptides corresponding to each subunit of eIF3 complex were shown. Compared to hMEC, all the peptide raw counts were decreased in hMEC-mZeb1, suggesting a reduced proportion of eIF3 subunits to the hMEC-mZeb1 ribosome compared to hMEC ribosome. (C) Individual peptide raw counts corresponding to eIF3m subunit. As an example, the eIF3m-related peptide raw counts were shown and support the decrease in eIF3m proportion in hMEC-mZeb1 compared to hMEC cells. Peptide counts corresponded to mean peptide counts of 5 independent biological replicates.



Supplementary Figure 8. Expression levels of RPL36A and eiF3 subunits in EMT cellular models . (A) Protein levels of RPL36A and the 12 eiF3 subunits were analysed by western blot in total protein lysates purified from the 3 hMEC-derived EMT cellular models (n=3). In contrast to what observed after 500 mM KCl ribosome purification, no change in RPL36A expression level was observed in the 3 cell lines. In addition, no change or an increase in some eiF3 subunits were observed in hMEC-mZeb1 compared to hMEC cells, a variation in total protein levels that was opposite to what observed in 500 mM KCl purified ribosomes. Ku80: loading control; kDa: kilo Daltons indicating molecular weight. **(B)** Protein levels of RPL36A and some eiF3 subunits were analysed by western blot after ribosome purification at 25 mM KCl. In contrast to what observed at 500 mM KCl, no change in RPL36A or eiF3 subunits was observed, suggesting that at this KCl concentration, all these components present the same association (n=2). RPL19: loading control.

DISCUSSION

Il apparaît aujourd'hui que le ribosome est plus qu'un simple effecteur de la traduction. Le ribosome serait aussi un régulateur clé de la traduction. En effet, le ribosome présenterait des variations de composition, tant au niveau ARNr que protéique, qui affecteraient la structure et donc la fonction du ribosome favorisant la traduction de certains ARNm par rapport à d'autres. Pour soutenir ce concept dit de « ribosome spécialisé », il est nécessaire d'accumuler des évidences soutenant l'hétérogénéité de composition des ribosomes. De plus, de par son rôle dans la régulation de l'expression génique, il s'avère que le ribosome participerait ainsi à la mise en place de divers phénotypes physiologiques et pathologiques. Dans les cancers, le concept de « ribosome spécialisé » n'en est qu'à ses débuts. En revanche, au cours de ces dix dernières années, il s'est avéré que le ribosome est une cible anticancer spécifique et originale, comme montré par le développement de plusieurs molécules inhibant l'activité de l'ARN Pol I. Le ribosome apparaît donc comme une nouvelle opportunité pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'un cancer. Il reste aujourd'hui à identifier les altérations de composition du ribosome qui surviennent dans les cancers, à démontrer que le ribosome peut être utilisé en clinique, comme biomarqueur ou cible thérapeutique, et à comprendre le rôle des ribosomes dans la tumorigenèse. Les résultats issus de ma thèse vont permettre d'enrichir ces trois aspects.

I. Altérations de composition des ribosomes dans les cancers du sein

Au début de ma thèse, un nombre réduit d'études avait mis en évidence des altérations de composition des ribosomes dans les cancers, en particulier au niveau des modifications chimiques des ARNr. En effet, les études disponibles étaient essentiellement concentrées sur l'hétérogénéité de composition en protéines ribosomiques (RP). En particulier, l'étude des ribosomopathies avait initié ce concept soutenant l'existence d'une hétérogénéité de composition des ribosomes au niveau des RP. Les ribosomopathies sont des maladies génétiques, qui sont associées à des défauts développementaux mais aussi à une augmentation du risque de développer des cancers. Elles sont induites par des haplo-insuffisances de gènes qui codent pour des RP ou des facteurs impliqués dans la biogénèse des ribosomes. En 1999, des mutations du gène codant pour la protéine RPS19 ont été identifiées pour la première fois chez les patients atteints de l'Anémie de Blackfan-Diamond (Draptchinskaia et al., 1999). Aujourd'hui plus d'une dizaine de mutations dans différents gènes codant des RP ont été identifiées dans cette pathologie (Aspesi and Ellis, 2019). L'identification de telles mutations a suggéré pour la première fois l'existence de ribosome de compositions différentes. C'est aussi dans le contexte des ribosomopathies, que l'existence d'altérations au niveau des modifications chimiques des ARNr a été initiée. Dans un modèle murin qui reproduit la dyskératose

congénitale, la mutation de la pseudouridine synthase, *DKCI*, est associée à une variation du profil de pseudouridylation des ARNr (Ruggero et al., 2003). Depuis, mon laboratoire d'accueil a montré qu'en plus des pseudouridylations, il existerait une variation du profil de 2'-O-Me (méthylation en 2'-O des riboses) des ARNr lors de l'initiation et de la progression tumorale mammaire (Belin et al., 2009; Marcel et al., 2013). Cette étude a suggéré pour la première fois l'existence potentielle de ribosomes de différentes compositions au niveau des ARNr dans les cancers, en particulier dans les cancers du sein. L'objectif principal de ma thèse était d'accumuler des évidences pour soutenir l'existence d'une hétérogénéité de composition des ribosomes dans les cancers du sein. Mes résultats issus de différents modèles soutiennent une telle hypothèse, tant au niveau ARNr que protéique.

1. Altérations de la composition des ribosomes au niveau des protéines ribosomiques dans les cancers du sein

Nous avons identifié par la technique de Riboprotéome, une différence de composition des ribosomes au niveau des RP dans l'EMT à l'aide d'un modèle cellulaire (Manuscrit n°3). En effet, nous avons observé que les cellules mésenchymateuses mammaires (hMEC-mZeb1) présentent une proportion plus importante de ribosomes contenant la protéine ribosomique RPL36A que les cellules épithéliales mammaires (hMEC). A ce jour, aucune étude n'a identifié un contexte cellulaire où l'altération de la composition des ribosomes repose sur RPL36A ou qu'une altération de la composition des ribosomes survient au cours de l'EMT. De même, excepté dans les ribosomopathies, seulement quelques études ont montré l'existence de ribosomes avec des compositions différentes au niveau protéique dans des contextes tumoraux. Le développement de méthodes de séquençage haut-débit du génome a permis d'identifier des mutations somatiques des RP dans différents types de cancers. Notamment le gène codant RPL5 est souvent inactivé par la présence de mutations ou de délétions dans différents cancers, comme dans 11% des glioblastomes, 34% des cancers du sein et dans plus de 20% des myélomes multiples (Fancello et al., 2017; Hofman et al., 2017). Une autre étude de De Keersmaecker et collègues, a permis d'identifier une mutation faux-sens au niveau du résidu 98 de *RPL10* chez environ 10% des patients atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) (De Keersmaecker et al., 2013). De plus, les auteurs ont démontré que cette mutation de RPL10 affecte la biogenèse des ribosomes dans la levure. Ainsi ces études permettent d'accumuler des évidences sur l'existence de ribosomes hétérogènes au niveau protéique dans les cancers.

Etant donné le rôle de l'EMT dans l'initiation et la progression tumorale mammaire, et que les tumeurs mammaires Claudin-Low présentent des caractéristiques de l'EMT, ces données suggèrent la présence d'altérations de composition des ribosomes au niveau des RP dans les cancers du sein. Pour démontrer de manière définitive l'existence de ribosomes présentant une hétérogénéité de composition au niveau de RPL36A dans les cancers du sein, il faudrait (1) inclure la lignée cellulaire cancéreuse, hMEC-mZeb1-Kras^{V12} dans les analyses de Riboprotéome ; et (2) analyser la composition des ribosomes au niveau de RPL36A directement dans les tumeurs mammaires.

a. Visualisation des altérations de la composition des ribosomes au niveau protéique dans les cellules transformées hMEC-mZeb1-Kras^{V12}

Pour cette étude, les analyses de Riboprotéome n'ont pas été effectuées dans la lignée hMEC-mZeb1-Kras^{V12}. En revanche différentes approches sont actuellement en cours de développement afin de mettre en évidence l'hétérogénéité de composition des ribosomes dans les trois lignées mimant la tumorigenèse mammaire induite par l'EMT, hMEC (stade épithélial), hMEC-mZeb1 (stade mésenchymateux) et hMEC-mZeb-Kras^{V12} (stade transformé). Tout d'abord, à partir de ribosomes purifiés dans les mêmes conditions que les expériences de Riboprotéome, nous sommes en train de comparer la proportion de RPL36A dans les ribosomes issus de ces trois lignées cellulaires par western blot. Les données préliminaires suggèrent que l'altération de composition du ribosome aurait lieu au cours de l'EMT mais ne serait pas modifiée par l'activation oncogénique (données non montrées).

En parallèle, nous développons des techniques de microscopie afin de visualiser les populations de ribosomes présentant une hétérogénéité de composition au niveau de la protéine RPL36A dans le modèle d'initiation tumorale reposant sur l'EMT. En effet, jusqu'à présent aucune étude n'a visualisé des ribosomes de compositions différentes, or ces analyses seront indispensables pour démontrer l'altération de composition des ribosomes et envisager d'étudier l'altération de la composition des ribosomes au niveau protéique dans les tumeurs. Dans l'équipe nous avons amorcé un travail pour visualiser une différence de proportion de ribosomes contenant RPL36A dans la lignée hMEC-mZeb-Kras^{V12} par rapport aux lignées non transformées, par microscopie de fluorescence en super-résolution. Nous avons effectué un premier test de double marquage des ARNr avec l'Iodure de propidium et des RP avec des anticorps anti-RP (données non montrées). Après confirmation que les marquages correspondent bien aux ribosomes, un anticorps anti-RPL36A sera introduit en plus des deux marquages pour identifier les ribosomes contenant RPL36A.

Enfin, nous collaborons avec l'équipe de Reynald Gillet (Equipe Ribosome, Bacteria and Stress, Université Rennes 1) pour effectuer des analyses de structure par Cryo-EM (Cryo-Electron Microscopy) à partir de ribosomes purifiés issus des trois lignées cellulaires. La technique de Cryo-EM permettra de détecter les ribosomes qui présentent une différence de composition au niveau de la protéine RPL36A dans le modèle d'initiation tumorale reposant sur l'EMT. Avant de réaliser les expériences de Cryo-EM, nous avons déjà initié une première étape qui a permis de déterminer la pureté des ribosomes et les différentes particules ribosomales à partir des cellules hMEC et hMEC-mZeb1 par une coloration négative en microscopie électronique à transmission (Figure 12).

Une visualisation par microscopie en super-résolution ou en Cryo-EM nous permettra de visualiser pour la première fois des ribosomes de compositions différentes dans un modèle d'initiation tumorale mammaire induite par l'EMT et viendra soutenir nos résultats suggérant l'altération de composition des ribosomes dans les cancers du sein. En revanche, il restera à démontrer l'existence de ces altérations dans des tissus humains.

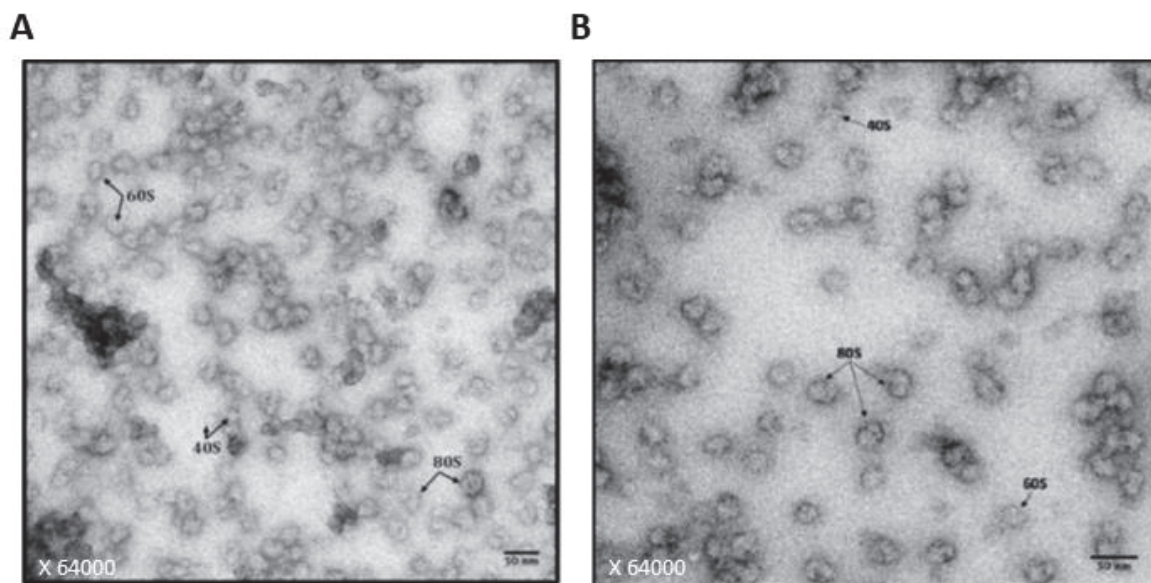


Figure 12. Contraste négatif des ribosomes purifiés.

La coloration négative en microscopie électronique en microscopie électronique en transmission a été effectuée sur les ribosomes purifiés des cellules hMEC (A) et hMEC-mZeb1 (B). Chaque particule ribosomale : le ribosome mature 80S et les sous-unités 40S et 60S sont indiquées par des flèches noires.

b. Altération de la composition du ribosome dans les tumeurs mammaires

Jusqu'à aujourd'hui, l'altération de la composition des ribosomes au niveau des RP a toujours été réalisée dans des modèles cellulaires (Shi et al., 2017; Xue and Barna, 2012). En effet, pour analyser une variation de composition des ribosomes au niveau des RP, les technologies disponibles nécessitent la purification des ribosomes et donc une quantité importante de matériel biologique, ce qui est difficile dans les tumeurs. Pour démontrer l'existence de cette hétérogénéité au niveau de RPL36A dans les tumeurs, la technique de Proximity Ligation Assay (PLA) peut être considérée. Cette méthode permet la détection d'une interaction entre deux protéines *in situ*, par l'utilisation d'une paire d'anticorps conjugués à des oligonucléotides complémentaires qui reconnaissent les protéines d'intérêts (Fredriksson et al., 2002; Söderberg et al., 2008). Une proximité des protéines induit l'hybridation des oligonucléotides qui vont former une structure d'ADN circulaire. Ces ADN circulaires seront ensuite amplifiés pour faciliter leur détection par IHC ou fluorescence. Dans notre cas, la position de RPL36A est précisément connue dans les ribosomes grâce aux analyses structurales (Ben-Shem et al., 2010; Khatter et al., 2015). Cette protéine se trouve à proximité du site de sortie des ARNt dans la sous-unité 60S. Ainsi, en utilisant une autre RP qui se trouve à proximité de RPL36A, nous pourrions mettre en évidence la présence de RPL36A dans les ribosomes par PLA. Une absence de détection des interactions entre RPL36A et la seconde RP signifierait l'absence de RPL36A dans les ribosomes. Cette technique de PLA a déjà été utilisée pour identifier une interaction entre deux protéines directement dans les tumeurs, démontrant la faisabilité de cette technique *in situ* (Gajadhar et al., 2012; Poulard et al., 2014; Spears et al., 2012). Cette technologie pourrait permettre de démontrer définitivement l'existence de ribosomes présentant une différence de composition des ribosomes au niveau de RPL36A dans les tumeurs mammaires. En plus d'une démonstration importante pour la recherche fondamentale, cette approche pourrait s'avérer avoir des répercussions importantes en clinique. En effet, les tumeurs dérivées de l'EMT sont des tumeurs agressives qui pourraient bénéficier d'une prise en charge particulière. Or il n'existe aujourd'hui pas de biomarqueurs pour identifier de telles tumeurs (Cardoso et al., 2017; Prat et al., 2010).

2. Altérations de la composition des ribosomes au niveau des ARNr dans les cancers du sein

Afin de démontrer l'existence d'une variation de composition au niveau des ARNr dans les cancers du sein, nous avons utilisé l'expression de *FBL* comme substitut de la variation de 2'-O-Me des ARNr (Manuscrit n°1). En effet, la technique de RiboMethSeq qui est aujourd'hui la

seule méthode permettant de mesurer la fréquence de 2'-O-Me des 106 sites des ARNr, n'était pas encore disponible au début de ma thèse (Birkedal et al., 2015; Marchand et al., 2016). Seule une RT-qPCR nécessitant 500ng d'ARN total par site analysé était disponible soulevant la même problématique que l'analyse de la composition des ribosomes dans les tumeurs au niveau protéique.

a. Identification des altérations de l'expression de *FBL* dans les cancers du sein

L'utilisation de l'expression de *FBL* comme substitut de la variation de 2'-O-Me des ARNr repose sur l'association étroite qui a été montrée entre l'expression de *FBL* et 2'-O-Me des ARNr. Mon laboratoire d'accueil a montré qu'une augmentation d'expression de *FBL* induite par une inactivation de p53 dans un modèle d'initiation tumorale mammaire est associée à une altération de la 2'-O-Me des ARNr, affectant certains sites seulement (Marcel et al., 2013). Il a aussi été montré que la réduction d'expression de *FBL* induite par un ARN interférant (siARN) induit une altération de la 2'-O-Me des ARNr sur certains sites dans les cellules HeLa et les cellules colorectales HCT-116 (Erales et al., 2017; Sharma et al., 2017).

Pour déterminer si l'expression de *FBL* est altérée dans les cancers du sein, nous avons analysé 3500 tumeurs mammaires primaires regroupées en 7 séries distinctes provenant de 3 sites hospitaliers européens (CLB Lyon, IGR Paris, TTB Dundee UK), correspondant à du matériel biologique distinct (ARN totaux et TMA). Dans notre étude, trois types d'altérations de l'expression de *FBL* au niveau ARNm qui sont associés à des survies différentes ont été identifiés dans les tumeurs mammaires. La comparaison avec des tissus sains provenant de mastectomies a révélé qu'il s'agissait d'une sous-expression, d'une expression intermédiaire et d'une surexpression de *FBL*. Sachant la corrélation étroite entre l'expression de *FBL* et la variation du profil de 2'-O-Me des ARNr (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013; Sharma et al., 2017), ces données suggèrent que les tumeurs mammaires présenteraient des altérations de variations au niveau des ARNr.

D'autres études supportent l'existence d'une altération de la 2'-O-Me des ARNr dans les cancers. En effet, la surexpression de *FBL* a aussi été identifiée dans les cancers du sein et de la prostate (Koh et al., 2011; Su et al., 2014). Une altération de la 2'-O-Me des ARNr peut être également induite par une variation de l'expression des snoARN à boîte C/D, qui servent de guides du complexe snoRNP à boîte C/D, à un site de méthylation spécifique. Par exemple, la délétion du chromosome 6q a été identifiée dans les cancers du sein, les cancers de la prostate et les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA). Cette délétion est associée à l'inactivation du gène *SNHG5* qui contient les SNORD50A et SNORD50B (snoARN à boîte C/D U50A et

snoARN à boîte C/D U50B) (Dong et al., 2008, 2009; Gachet et al., 2018). De plus Gachet et collègues ont démontré que dans les cellules dérivés de LLA dont l'expression de *SNHG5* est diminuée par une approche d'ARN interférant, mais aussi des échantillons tumoraux d'ALL avec la délétion 6q, présentent une forte diminution de la fréquence de la 2'-O-Me au site qui est ciblé par le SNORD50A dans l'ARNr 28S (Gachet et al., 2018). Ces études suggèrent l'existence d'une hétérogénéité de de ribosomes au niveau du profil 2-O-Me des ARNr dans les cancers. Il reste néanmoins à démontrer l'existence d'une altération de la méthylation des ARNr dans les tumeurs.

b. Identification des altérations de 2'-O-Me des ARNr par RiboMethSeq dans les cancers du sein

Une dizaine d'étude basée sur des approches haut-débits a montré que la 2'-O-Me des ARNr présente des profils différents dans des lignées cancéreuses, soutenant l'existence de l'altération des 2'-O-Me des ARNr dans les cancers. Par exemple, une étude a montré une variation de fréquence de 2'-O-Me sur plusieurs sites entre les cellules HeLa (cancer de l'utérus) et HCT-116 (cancer du côlon) (Krogh et al., 2016). Pour démontrer définitivement l'existence des altérations de 2'-O-Me des ARNr dans les cancers, j'ai participé à une étude au cours de ma thèse visant à analyser la 2'-O-Me des ARNr par RiboMethSeq dans la série de Dundee regroupant 195 tumeurs mammaire primaires (Annexe n°1). Le RiboMethSeq est une nouvelle technologie basée sur le RNA-seq qui consiste à quantifier de manière absolue la fréquence de 2'-O-Me des 106 sites connus des ARNr (Kielbassa et al., Manuscrit en préparation). Les résultats issus de cette étude démontrent pour la première fois, qu'il existe une diversité des profils de 2'-O-Me sur les 106 sites des ARNr dans les tumeurs mammaires (Figure 13). En effet, une forte variabilité de la fréquence de 2'-O-Me (C-Score) sur plusieurs sites a été observée dans ces tumeurs mammaires, un même site pouvant présenter un C-score allant de 0 à 1 en fonction des tumeurs. Ainsi, cette étude permet de démontrer pour la première fois, l'existence d'une hétérogénéité de composition des ribosomes au niveau des profils de 2'-O-Me des ARNr dans les tumeurs mammaires.

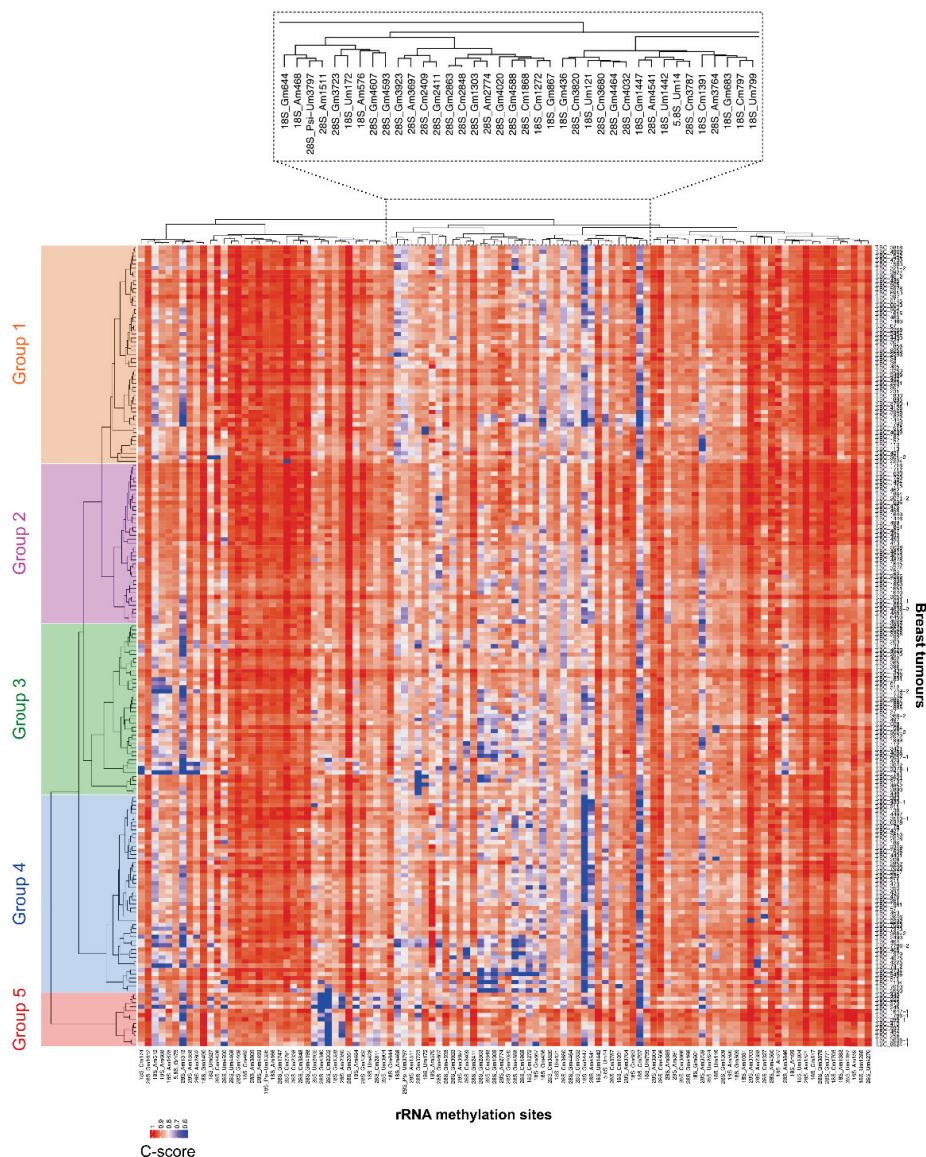


Figure 13. Variation du profil de 2'-O-Me dans les tumeurs mammaires.

Un regroupement hiérarchique (ou hierarchical clustering) a été réalisé afin de regrouper les 195 tumeurs mammaires de la série de Dundee selon les similarités de leurs profils de 2'-O-Me des ARNr. Les lignes correspondent aux tumeurs mammaires et les colonnes aux 106 sites de 2'-O-Me des ARNr. Les tumeurs mammaires présentent une hétérogénéité de profils de 2'-O-Me des ARNr. Case rouge : forte fréquence de 2'-O-Me et case bleue : faible fréquence de 2'-O-Me.

En conclusion, les différentes données issues de ma thèse suggèrent qu'il existe des altérations de composition des ribosomes au niveau des RP et ARNr dans les cancers du sein. Etant donné le concept émergent de « ribosome spécialisé », on pourrait maintenant se demander si ces ribosomes de compositions différentes présentent une (ou des) activité(s) intrinsèque(s) altérée(s) qui favoriserait la traduction de certains gènes et qui contribuerait à la tumorigenèse mammaire. Au cours de ma thèse, l'analyse de la translecture des codons-stop par un essai rapporteur bicistronique dans le modèle de l'EMT soutient cette hypothèse, l'augmentation de

la proportion des ribosomes en RPL36A étant associée à une augmentation de la translecture. De plus, l'existence de ribosomes de compositions différentes dans les cancers du sein laisse entrevoir de nouvelles opportunités en clinique.

II. Utilisation des ribosomes en clinique dans les cancers du sein

Au début de ma thèse, l'importance de l'hyperactivation de la biogénèse des ribosomes et donc de la synthèse protéique dans les cellules cancéreuses était reconnue (Barna et al., 2008; Ruggero, 2013; Ruggero and Pandolfi, 2003). En effet par rapport aux cellules saines, les cellules cancéreuses ont besoin d'une forte production des ribosomes afin de soutenir leur état hyperprolifératif (Barna et al., 2008). Ces observations ont permis d'envisager le ciblage de la biogénèse des ribosomes pour développer de nouvelles molécules anticancer. L'étude princeps de Bywater et collègues a permis de démontrer l'activité anticancer d'une inhibition spécifique de la biogénèse des ribosomes (Bywater et al., 2012). En effet, les auteurs ont démontré qu'une inhibition spécifique de l'activité de l'ARN Pol I par la molécule CX-5461 permettait l'élimination spécifique des cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines. En plus d'une altération quantitative des ribosomes dans les cancers, ils émergent que les cellules cancéreuses produisent des ribosomes de compositions différentes, et cette différence de composition des ribosomes pourrait jouer un rôle important dans la tumorigénèse (Belin et al., 2009; Dalla Venezia et al., 2019; Eralles et al., 2017; Marcel et al., 2013). Ces observations suggèrent qu'un ciblage spécifique des ribosomes pourrait être développé en ciblant spécifiquement les ribosomes « cancéreux », d'une composition particulière. Cette approche pourrait représenter une thérapie anticancer innovante. De même, cette altération de composition des ribosomes pourrait s'avérer être une nouvelle source de biomarqueurs innovants dans les cancers. En plus des ribosomes eux-mêmes, les facteurs de la biogénèse des ribosomes pourraient représenter une source importante de biomarqueurs et cibles thérapeutiques.

Parmi les cancers, le cancer du sein reste un problème de santé publique. Les cancers du sein sont les cancers féminins les plus fréquents dans le monde et représentent la première cause de décès liée au cancer chez la femme (Bray et al., 2018). Cette mortalité est principalement induite par l'hétérogénéité de cette maladie. En effet, le cancer du sein ne représente pas une maladie unique mais plusieurs groupes distincts avec des caractéristiques biologiques et des pronostics différents. Ainsi la classification des tumeurs mammaires est primordiale pour déterminer le pronostic et la prise en charge des patientes. A l'heure actuelle, une des problématiques majeures reste l'identification des tumeurs les plus agressives au moment du diagnostic pour mettre en place une prise en charge adaptée (Cardoso et al., 2017). L'amélioration de la prise

en charge des patientes passe par l'identification de voies de signalisation innovantes impliquées dans la tumorigenèse mammaire, qui permettront d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostics et de nouvelles cibles thérapeutiques anticancers. Ainsi notre hypothèse est que la biogenèse des ribosomes pourrait représenter cette nouvelle voie innovante impliquée dans la tumorigenèse mammaire et pourrait être une nouvelle source de biomarqueurs et cibles thérapeutiques dans les cancers du sein.

1. Utilisation de *NCL* en clinique dans les cancers du sein

Nous avons mis en évidence que *NCL* est un marqueur pronostique indépendant dans les cancers du sein (Manuscrit n°2). En effet, les patientes qui surexpriment ou sous-expriment *NCL* au niveau ARNm présentent une mauvaise survie globale et une mauvaise survie sans progression par rapport aux patientes porteuses de tumeurs exprimant un niveau intermédiaire de *NCL*. La *NCL* permet donc d'identifier les tumeurs mammaires les plus agressives. En revanche, il est nécessaire de valider ces observations au niveau protéique notamment par immunohistochimie (IHC), qui est la méthode standard utilisée en clinique. Depuis la publication démontrant la valeur pronostique de *NCL* dans les cancers du sein, des IHC ont été réalisées sur les 440 TMA du CLB et l'analyse statistique est en cours.

De manière intéressante, nous avons montré que l'association entre l'expression de *NCL* et le pronostic des patientes est retrouvée spécifiquement dans les cancers Triple Négatifs (TN : ER-PR-HER2-). Or ce sous-type de cancer du sein est caractérisé par l'absence de réponse à l'hormonothérapie et aux inhibiteurs de HER2. De plus, les patientes porteuses de tumeurs TN présentent un mauvais pronostic par rapport aux autres sous-types car ces cancers ont tendance à être agressifs et à réapparaître (Cardoso et al., 2017). Ainsi il est nécessaire de développer de nouvelles options thérapeutiques pour ce type de tumeurs. Cibler la protéine *NCL* pourrait être une option thérapeutique dans le traitement des tumeurs TN. Plusieurs molécules ont été développées pour cibler *NCL*, qui sont actuellement en essai clinique de Phase II, comme l'aptamère AS1411 (Rosenberg et al., 2014) et l'antagoniste N6L (NCT01711398). Différentes études ont montré l'activité anticancer de ces molécules dans des modèles cellulaires de cancers du sein (Destouches et al., 2011; Pichiorri et al., 2013). Ainsi les patientes avec des tumeurs TN exprimant un niveau élevé de *NCL* pourrait potentiellement bénéficier de ces molécules. Dans cette optique, un nouveau projet a été initié dans l'équipe, afin d'évaluer l'activité anticancer de la molécule N6L dans des modèles pré-cliniques de cancers TN et l'utilisation de *NCL* comme biomarqueur compagnon.

2. Utilisation de *FBL* en clinique dans les cancers du sein

En plus de *NCL* nous avons identifié *FBL* comme étant un marqueur pronostique indépendant par l'analyse de 3500 tumeurs mammaires (Manuscrit n°1). En effet, les patientes porteuses de tumeurs surexprimant ou sous-exprimant *FBL* au niveau ARNm présentent le plus mauvais pronostic (mauvaise survie globale et mauvaise survie sans progression) par rapport aux patientes porteuses de tumeurs exprimant un niveau intermédiaire de *FBL*. Cette association entre l'expression de *FBL* et pronostic des patientes a été observée en utilisant deux techniques de quantification différentes (RT-qPCR et RNA-seq) montrant la robustesse de cette observation.

De plus, nous avons montré que *FBL* est un marqueur indépendant après ajustement avec des marqueurs pronostiques classiques des cancers du sein (comme la taille tumorale ou le statut d'invasion des ganglions lymphatiques). Ainsi *FBL* pourrait améliorer la stratification actuelle des cancers du sein et améliorer la prise en charge des patientes. Par exemple, l'expression de *FBL* en combinaison avec la taille tumorale permet d'identifier les patientes qui présentent un mauvais pronostic bien qu'elles portent des tumeurs de petites tailles, qui sont normalement considérées comme des tumeurs avec un bon pronostic. Ces patientes bénéficieraient donc d'un traitement qui serait normalement administré aux patientes ayant des tumeurs agressives. De plus nous avons observé la même tendance entre l'expression de *FBL* et pronostic des patientes porteuses de tumeurs de sous-types Luminal (ER+ PR+/- HER2-) ou TN. Ainsi *FBL* pourrait améliorer la prise en charge des patientes en identifiant les tumeurs les plus agressives dans ces sous-types. Par exemple, les tumeurs de type Luminal exprimant un niveau intermédiaire de *FBL*, et qui sont associées à un bon pronostic, bénéficieraient d'un traitement hormonal tandis que les tumeurs surexprimant ou sous-exprimant *FBL* devraient être traitées plus sévèrement.

En plus de nos observations, d'autres études ont montré qu'une surexpression de *FBL* était impliquée dans la tumorigenèse mammaire. Dans des modèles cellulaires, il a été montré que la surexpression de *FBL* induit la résistance aux chimiothérapies et la croissance tumorale dans des modèles murins (Marcel et al., 2013; Su et al., 2014). Notre modèle est que la surexpression de *FBL* affecte le profil de 2'-O-Me des ARNr et augmente la traduction d'oncogènes favorisant la tumorigenèse et la progression tumorale mammaire. En effet, l'augmentation de la prolifération cellulaire induite par la surexpression de *FBL* dans des cellules MCF7 est abolie par l'addition d'un inhibiteur d'IGF1R (Marcel et al., 2013). Ces données suggèrent donc que

cibler la protéine FBL dans les tumeurs mammaires surexprimant *FBL* serait une option thérapeutique innovante et envisageable. Notre étude a d'ailleurs permis d'initier un nouveau projet de Drug Discovery dans l'équipe, qui consiste au criblage et à l'identification d'inhibiteurs de FBL dans les cancers du sein.

En conclusion, nos études ont permis d'identifier deux facteurs de la biogénèse des ribosomes qui sont des marqueurs pronostics indépendants dans les cancers du sein. *NCL* et *FBL* permettent d'identifier les tumeurs mammaires les plus agressives et de proposer de nouvelles options thérapeutiques dans les cancers du sein. Il s'avère que ces gènes ont des valeurs pronostiques dans d'autres cancers, y compris dans les hémopathies comme les leucémies myéloïdes aiguës (Marcel et al., 2017) ou les LLA (Annexe n°2). Par ailleurs, la protéine NCL est un facteur qui régule la synthèse des ARNr et la protéine FBL régule la 2'-O-Me des ARNr, ces facteurs contrôlant respectivement, la quantité et la qualité des ribosomes. Ces études permettent donc de soutenir le rôle des ribosomes dans la tumorigénèse mammaire.

III. Réduction de l'expression de *FBL* dans les cancers du sein : un nouveau mécanisme de tumorigénèse mammaire ?

Dans les cancers du sein, il a été montré qu'une surexpression de *FBL* favorise l'initiation et la progression tumorale dans des modèles *in vitro* et des modèles *in vivo* (Marcel et al., 2013; Su et al., 2014). De plus, il a été observé que les patientes porteuses de tumeurs mammaires surexprimant *FBL* présentaient le plus mauvais pronostic (Marcel et al., 2013). Une étude menée par Su et collègues a elle aussi identifié une surexpression de *FBL* aux niveaux ARNm et protéique dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus sains adjacents (Su et al., 2014). En revanche, la surexpression de *FBL* n'a été observée que dans 60% des tumeurs mammaires étudiées (4 tumeurs sur 7 par western blot et 6 tumeurs sur 10 par IHC), les autres tumeurs présentant soit une absence de variation d'expression de *FBL* soit une diminution de celle-ci. En effet, du fait des observations réalisées *in vitro* et soutenant un rôle oncogénique de FBL, ces études réalisées sur un faible nombre d'échantillons tumoraux se sont attachées à analyser seulement la surexpression de *FBL* dans les cancers du sein.

1. Mise en évidence des tumeurs mammaires qui sous-expriment *FBL*

Durant ma thèse, nous avons décidé d'identifier les altérations d'expression de *FBL* survenant dans les cancers du sein sans à priori dans un large nombre d'échantillons afin d'envisager toutes les altérations possibles de *FBL* et de la 2'-O-Me des ARNr (Manuscrit n°1). Grâce à cette approche sans à priori, nous avons identifié de manière inattendue, des tumeurs mammaires qui sous-expriment *FBL* au niveau ARNm.

Les patientes porteuses de ces tumeurs présentent une mauvaise survie globale et une mauvaise survie sans progression indiquant la pertinence biologique de la sous-expression de *FBL* dans les cancers du sein. La même observation dans une série de tumeurs mammaires provenant de la base de données TCGA, a permis de démontrer que l'identification de la sous-expression de *FBL* ne correspondait pas un biais induit par la méthode de quantification de l'expression de *FBL*. Nous avons également observé au niveau IHC, l'absence de détection de la protéine FBL suggérant qu'il ne s'agissait pas d'un biais lié à la définition du cut-off. De plus, les deux séries indépendantes de TMA, une absence de détection de FBL était présente dans la même proportion en tumeurs (environ 8-12%) pour un total de 2207 tumeurs. De plus, nous avons observé *in vivo*, qu'une déplétion hétérozygote de *FBL* accélère l'apparition de tumeurs dans les poissons zèbres. L'ensemble de ces observations soutiennent l'existence de tumeurs mammaires qui sous-expriment *FBL*.

A ce jour, cette étude correspond à l'unique étude suggérant une diminution de l'expression de *FBL* dans les cancers. En effet, les connaissances accumulées sur FBL dans le contexte de la cancérologie avaient poussé les recherches translationnelles vers la surexpression de *FBL*. D'une manière plus générale, cette étude montre l'importance des analyses sans à priori pour identifier de nouveaux biomarqueurs mais aussi pour identifier de nouveaux mécanismes favorisant la tumorigenèse.

2. Rôle de la sous-expression de *FBL* dans la tumorigenèse mammaire

Nous avons démontré dans un modèle cellulaire de tumorigenèse mammaire, qu'une surexpression de *FBL* induisait une modification du profil de 2'-O-Me des ARNr (Marcel et al., 2013). Ces ribosomes différents favorisaient la traduction d'ARNm contenant des IRES et qui codent pour des oncoprotéines comme *c-Myc*, *IGF1R* ou *VEGF* et ainsi favoriser la tumorigenèse mammaire. Ce mécanisme moléculaire pourrait expliquer comment la surexpression de *FBL* contribue à la tumorigenèse mammaire. En revanche, comment expliquer

qu'une sous-expression de *FBL* contribue à la tumorigenèse mammaire ? Les différentes hypothèses sont résumées dans la Figure 15.

a. Altération de la 2'-O-Me des ARNr et de la traduction

Mon équipe d'accueil a récemment démontré qu'une réduction de l'expression de *FBL* dans des cellules HeLa altère le profil de 2'-O-Me des ARNr, principalement en réduisant la 2'-O-Me sur certains sites, et diminue la traduction dépendante des IRES de certains ARNm viraux et cellulaires (Erales et al., 2017). De plus par une approche de ribosome profiling, cette étude montre que la diminution de la 2'-O-Me des ARNr à certains sites induite par la réduction de l'expression de *FBL* affecte la traduction d'une cinquantaine d'ARNm cellulaires. Ainsi on pourrait supposer que, comme pour la surexpression de *FBL*, une sous-expression de *FBL* modifie la composition des ribosomes au niveau des ARNr et affecte la traduction de certains ARNm impliqués dans la tumorigenèse mammaire (Figure 15). En revanche, il reste à identifier les gènes affectés par une telle altération de *FBL*.

b. Diminution de la biogenèse des ribosomes

Nous avons observé que les tumeurs qui surexpriment *FBL* étaient différentes des tumeurs qui sous-expriment *FBL*. Contrairement aux tumeurs surexprimant *FBL*, nous avons observé que les tumeurs qui sous-exprimaient *FBL* présentaient une réduction de l'expression des RP, suggérant une diminution de la production des ribosomes dans ces tumeurs. D'autres études ont montré qu'une inhibition de l'expression de *FBL* était associée à une diminution de la biogénèse des ribosomes, soutenant que les tumeurs sous-exprimant *FBL* présentent un défaut dans la biogénèse des ribosomes (Bouffard et al., 2018; Erales et al., 2017; Sharma et al., 2017). Cette diminution de la biogénèse des ribosomes pourrait expliquer le lien entre réduction de *FBL* et tumorigenèse.

En effet, il est à noter que les ribosomopathies sont caractérisées par un défaut de la biogénèse des ribosomes, induite dans ce cas soit par la déplétion de *RP* ou de facteurs de la biogénèse des ribosomes comme *DKCI* (Aspesi and Ellis, 2019; Ruggero et al., 2003). Or les patients atteints de cette pathologie sont plus susceptibles de développer des cancers par rapport aux personnes saines (Aspesi and Ellis, 2019). Une étude menée dans un modèle de poissons zèbres a montré qu'une diminution de la biogénèse des ribosomes induites par une mutation ou une déplétion d'un allèle sauvage de certaines RP était suffisante pour favoriser le développement de tumeurs (Amsterdam et al., 2004). Ces résultats rappellent nos observations indiquant de la

réduction de *FBL* favorise la tumorigenèse spontanée induite par la perte de p53. Dans le contexte des mutations de RP, une hypothèse serait que la diminution de la biogenèse des ribosomes induirait un stress ribosomique activant la protéine p53 qui a son tour inhiberait la prolifération cellulaire et qu'une pression de sélection tendrait à induire la perte de p53 pour maintenir l'intégrité des tissus induisant à long terme l'apparition de tumeurs (Penzo et al., 2019). Bien que les mécanismes moléculaires et cellulaires pouvant expliquer l'association entre diminution de la production des ribosomes et le développement tumoral restent largement débattus (Aspesi and Ellis, 2019), on pourrait supposer qu'une diminution de l'expression de *FBL* altère la production de ribosomes et favorise la tumorigenèse mammaire (Figure 15).

c. Emergence des caractéristiques souches

Lors de ma thèse j'ai réalisé des analyses préliminaires qui indiquent que la réduction de l'expression de *FBL* par une approche d'ARN interférence dans des cellules cancéreuses du sein (hMEC-shP53-Kras^{V12}), a tendance à augmenter l'expression des facteurs de transcription *NANOG* et *SOX2* (Figure 14). Plusieurs études ont montré que l'expression de ces deux gènes, avec d'autres facteurs comme *OCT4* et *LIN28*, suffit à induire la reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes (Huangfu et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al.). Ces cellules souches pluripotentes sont caractérisées par l'acquisition des propriétés de pluripotence et d'auto-renouvellement. Or les cellules souches cancéreuses (CSC) sont caractérisées par les mêmes propriétés. Ainsi, on pourrait supposer que la sous-expression de *FBL* pourrait induire l'acquisition de caractéristiques souches et ainsi favoriser la tumorigenèse mammaire (Figure 15).

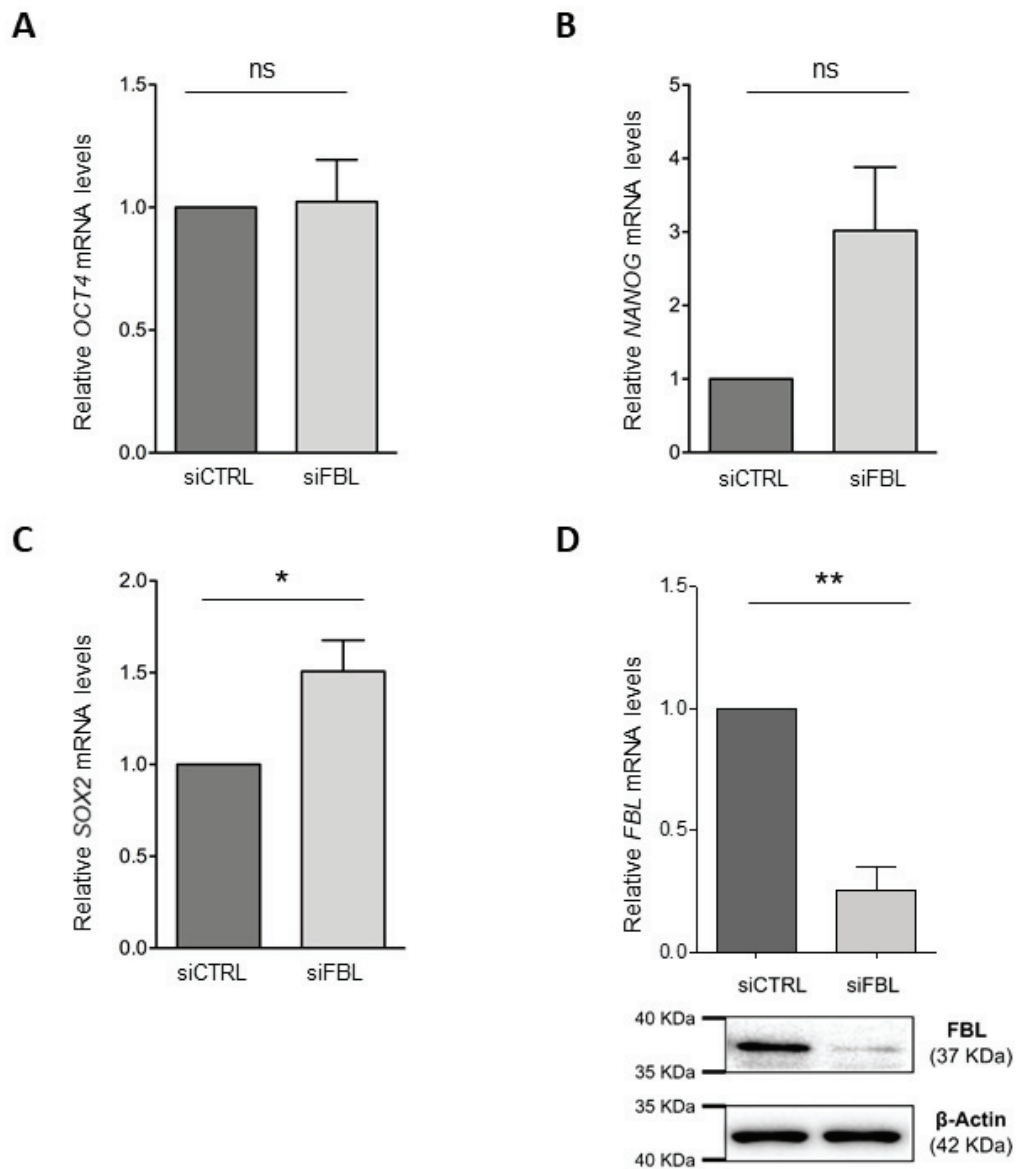


Figure 14. Impact d'une diminution de l'expression de *FBL* sur l'expression des marqueurs de pluripotence.

L'expression des facteurs *OCT4* (A), *NANOG* (B) et *SOX2* (C) a été quantifiée par RT-qPCR suite à la diminution de l'expression de *FBL* par une approche ARN interférant (siARN), dans les cellules hMEC-shP53-Kras^{V12}. La diminution de l'expression de *FBL* augmente l'expression du facteur *SOX2* de manière significative. L'expression de *NANOG* semble également être augmentée après diminution de l'expression de *FBL*. La diminution de l'expression de *FBL* par siARN a été validée au niveau ARNm par RT-qPCR et protéique par western blot (D).

Plusieurs analyses sont nécessaires pour valider cette hypothèse, par exemple déterminer si la sous-expression de *FBL* dans des cellules cancéreuses du sein favorisent la formation de mammosphères (un test qui permet de déterminer la capacité d'auto-renouvellement des cellules). Néanmoins, plusieurs études suggèrent une potentielle implication des ribosomes

dans l'acquisition de caractéristiques souches (Bastide and David, 2018). En effet différentes études ont montré que les cellules souches hématopoïétiques ou les CSC présentent une synthèse protéique qui est significativement plus faible que dans les cellules différenciées, impliquant potentiellement une diminution de la biogénèse des ribosomes dans ces cellules (Blanco et al., 2016; Signer et al., 2014). Etant donné qu'une sous-expression de *FBL* diminue la biogénèse des ribosomes, ces observations soutiennent le potentiel rôle de *FBL* dans l'acquisition des caractéristiques souches.

En conclusion nous avons mis en évidence une nouvelle altération de l'expression de *FBL* dans les tumeurs mammaires. De manière inattendue, la sous-expression de *FBL* est associée à un mauvais pronostic. De plus, l'utilisation d'un modèle de poisson zèbre soutient un rôle de la réduction de *FBL* dans la tumorigénèse. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la contribution de la réduction de *FBL* dans la tumorigénèse, mais toutes restent à être testées. Ainsi cette étude suggère que *FBL*, et plus globalement la biogénèse des ribosomes, présentent un rôle ambivalent dans la tumorigénèse mammaire.

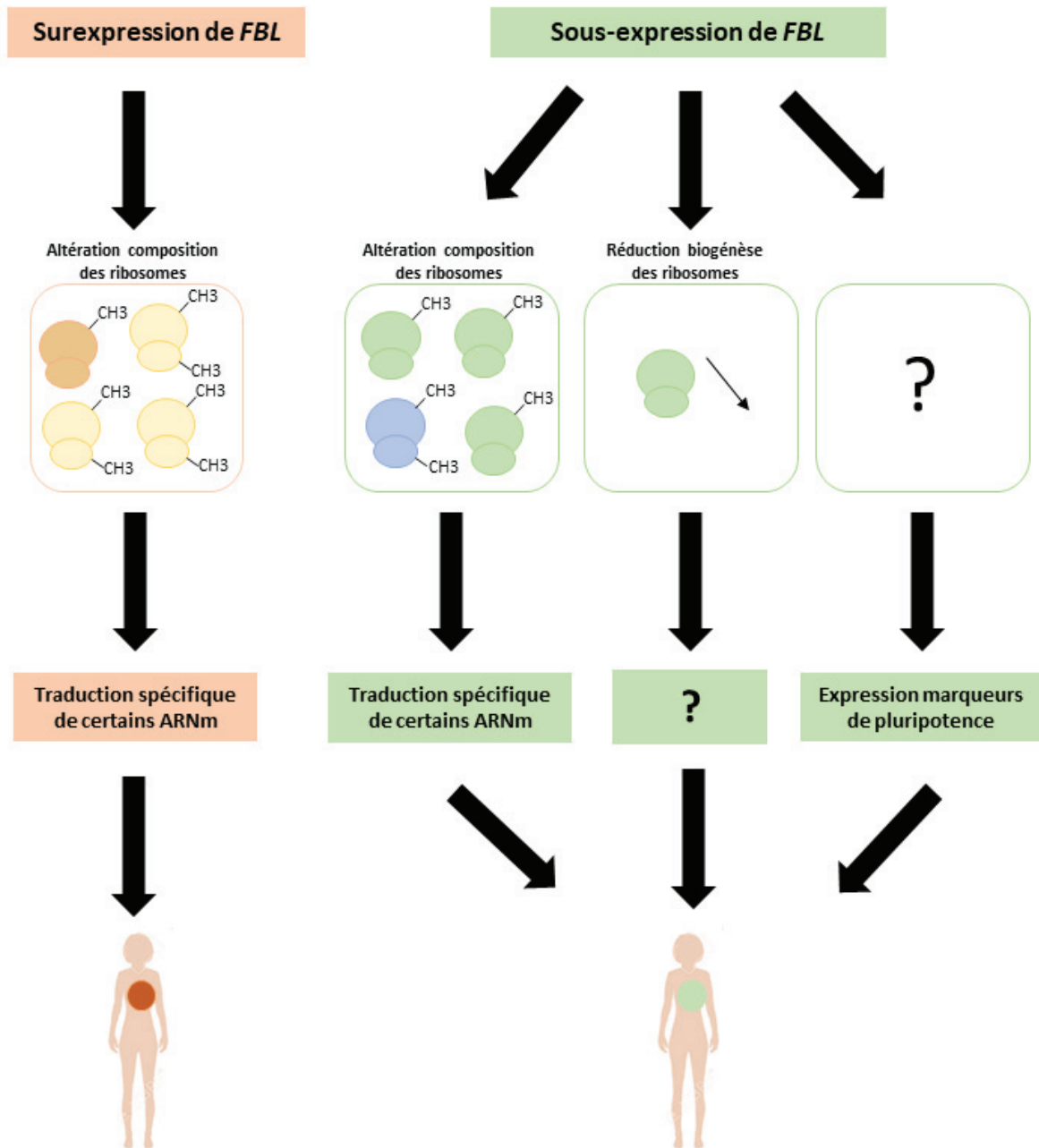


Figure 15. Les potentiels mécanismes de tumorigénèse mammaire par l'expression de FBL.

Deux types d'altérations d'expression de *FBL* ont été identifiés dans les cancers du sein, qui sont associés à des tumeurs mammaires différentes. Le mécanisme favorisant la tumorigénèse mammaire lors d'une surexpression de *FBL* a été identifié (Marcel et al., 2013). La surexpression de *FBL* modifie le profil de 2'-O-Me (CH3 dans le schéma) des ARNr modifiant l'activité de traduction des ribosomes, pour favoriser la traduction de certains ARNm impliqués dans la tumorigénèse mammaire. Dans le même sens, on pourrait supposer qu'une sous-expression de *FBL* modifie le profil de 2'-O-Me des ARNr pour favoriser la traduction d'ARNm impliqués dans la tumorigénèse mammaire. En effet, deux études ont démontré qu'une sous-expression de *FBL* modifiait le profil 2'-O-Me des ARNr (Erales et al., 2017; Sharma et al., 2017). Deux autres hypothèses peuvent suggérer le rôle d'une sous-expression de *FBL* dans la tumorigénèse mammaire : la diminution de la biogénèse des ribosomes mais dont le mécanisme moléculaire et cellulaire à déterminer, et l'acquisition de caractéristiques souches par l'expression de marqueurs de pluripotence.

IV. Conclusion générale

Au cours de ma thèse, j'ai identifié deux facteurs impliqués dans la biogénèse des ribosomes NCL et FBL qui présentent des altérations d'expression dans les tumeurs mammaires. Les gènes *NCL* et *FBL* se sont révélés être des marqueurs pronostics indépendants dans les cancers du sein. Ces résultats soutiennent l'existence d'altérations quantitatives et qualitatives des ribosomes dans les tumeurs mammaires, et donc plus largement dans la « vraie vie ». De plus, nous avons démontré la co-existence d'une reprogrammation traductionnelle et d'une altération de composition des ribosomes au niveau des RP et des ARNr dans un modèle cellulaire de l'EMT, un processus biologique impliqué dans la tumorigénèse mammaire.

L'ensemble de ces résultats permet de soutenir l'existence des altérations de composition des ribosomes dans la tumorigénèse mammaire. En revanche, il est important dans un futur proche, de déterminer comment ces altérations favorisent la tumorigénèse mammaire. Nous avons observé durant l'EMT une modification de la composition des ribosomes ainsi qu'une altération de l'activité traductionnelle intrinsèque des ribosomes. Cette première observation permet de soutenir notre hypothèse que des altérations de composition des ribosomes modifient leurs activités intrinsèques pour favoriser la traduction de certains ARNm au cours des phases précoces de la tumorigénèse mammaire. D'autres hypothèses semblent émerger comme la réduction de la biogénèse des ribosomes ou l'acquisition des caractères souches.

De plus les résultats obtenus au cours de ma thèse proposent une approche thérapeutique originale impliquant les ribosomes altérés quantitativement et qualitativement en tant que biomarqueurs pronostiques et cibles thérapeutiques dans les cancers du sein. Ces résultats ont permis l'initiation de différents projets dans l'équipe qui ont pour but d'identifier des inhibiteurs de la biogénèse des ribosomes qui ciblent spécifiquement FBL et de tester l'utilité des inhibiteurs de NCL à disposition dans les cancers du sein.

ANNEXES

I. Liste des publications

Publications acceptées

- Nguyen Van Long F, Lardy-Cleaud A, Bray S, Chabaud S, Dubois T, Diot A, Thompson AM, Bourdon JC, Perol D, Bouvet P, Diaz JJ, Marcel V. Druggable Nucleolin Identifies Breast Tumours Associated with Poor Prognosis That Exhibit Different Biological Processes. *Cancers (Basel)*. 2018 Oct 22;10(10). pii: E390. doi: 10.3390/cancers10100390. PubMed PMID: 30360377; PubMed Central PMCID: PMC6210205.
- Marcel V, Nguyen Van Long F, Diaz JJ. 40 Years of Research Put p53 in Translation. *Cancers (Basel)*. 2018 May 21;10(5). pii: E152. doi:10.3390/cancers10050152. Review. PubMed PMID: 29883412; PubMed Central PMCID:PMC5977125.

Publications soumises

- Marek Ussowicz, Virginie Marcel, Flora Nguyen Van Long, Bernarda Kazanowska, Jean-Jacques Diaz, Dariusz Wołowiec. The up-regulation of components of the rRNA methylation complex in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is a predictor of relapse. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*
- Wannapa Sornjai, Flora Nguyen Van Long, Nathalie Pion, Arnaud Pasquer, Jean-Christophe Saurin, Virginie Marcel, Jean Jacques Diaz, Hichem C. Mertani, Duncan R. Smith. Iron, and hepcidin mediate human colorectal cancer growth. *Endocrine-Related Cancer*

Publications en préparation

- Diversity of rRNA 2'O-methylation profiles in breast tumours reveals two classes of sites. Janice Kielbassa, Virginie Marchand, S. Kundhavai Natchiar, Flora Nguyen Van Long, Lilia Ayadi, Laury Tonon, Susan Bray, Alexandra Diot, Lee B. Jordan, Alastair Thompson, Jean-Christophe Bourdon, Frédéric Catez, Alain Puisieux, Yuri Motorin, Bruno P. Klaholz, Alain Viari, Jean-Jacques Diaz*, Virginie Marcel*.

- Dual association of the 2'-O-ribose methyltransferase FBL expression with poor prognosis in early breast cancers reveals that reduction of FBL contributes to spontaneous tumorigenesis

Flora Nguyen Van Long, Audrey Lardy-Cleaud, Dimitri Carène, Caroline Rossoni, Frédéric Catez, Agathe Dolbeau, Marjorie Martin, Paul Rollet, Nathalie Pion, Déborah Monchiet, Valentin Simioni, Susan Bray, Doris Le Beherec, Ibrahim Bouakka, Amélie Colombe Vermorel, Laetitia Odeyer, Emilie Lavergne, Alexandra Diot, Lee B. Jordan, Alastair M. Thompson, Françoise Jamen, Thierry Dubois, Sylvie Chabaud, Stefan Michiels, Isabelle Treilleux, Jean-Christophe Bourdon, David Perol, Alain Puisieux, Fabrice André, Jean-Jacques Diaz*, Virginie Marcel*

- Translational reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition is associated with fine-optimization of ribosome composition

Flora Nguyen Van Long* Agnès Baudin-Baillieu*, Laure Bidou, Nathalie Pion, Annie Adrait, Virginie Marchand, Janice Kielbassa, Akari Saku, Stephanie Gran-Ruaz, Frédéric Catez, Anne-Pierre Morel, Alain Viari, Yuri Motorin, Yohann Couté, Alain Puisieux, Olivier Namy*, Jean-Jacques Diaz*, Virginie Marcel*

1. Diversity of rRNA 2'O-methylation profiles in breast tumours reveals two classes of sites

TITLE PAGE (title = 90 characters with space)

Diversity of rRNA 2'O-methylation profiles in breast tumours reveals two classes of sites

Janice Kielbassa¹, Virginie Marchand², S. Kundhavai Natchiar^{3,4,5,6}, Flora Nguyen Van Long⁷, Lilia Ayadi⁸, Laury Tonon¹, Susan Bray⁹, Alexandra Diot¹⁰, Lee B. Jordan¹¹, Alastair Thompson^{10,12}, Jean-Christophe Bourdon¹⁰, Frédéric Catez⁷, Alain Puisieux⁷, Yuri Motorin², Bruno P. Klaholz^{3,4,5,6}, Alain Viari¹, Jean-Jacques Diaz^{7,*}, Virginie Marcel^{7,*}

¹ Synergie Lyon Cancer, Centre Léon Bérard, Lyon Cedex 08, France

² UMS2008 IBSLor CNRS-INSERM-Lorraine University, Biopôle, 9 avenue de la forêt de haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

³ Centre for Integrative Biology (CBI), Department of Integrated Structural Biology, IGBMC, CNRS, Inserm, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

⁴ Institut of Genetics and of Molecular and Cellular Biology (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

⁵ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Illkirch, France

⁶ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U964, Illkirch, France
Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁷ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, cedex 08, 69 373 Lyon, France

⁸ UMR7365 IMoPA CNRS-INSERM-Lorraine University, Biopôle, 9 avenue de la forêt de haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

⁹ Tayside Tissue Bank, Ninewells Hospital and Medical School, NHS Tayside, Dundee DD1 9SY, Scotland, UK

¹⁰ Division of Cancer Research, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee DD1 9SY, Scotland, UK

¹¹ Department of Pathology, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee DD1 9SY, UK

¹² Olga Keith Wiess Chair of Surgery, Dan L. Duncan Breast Center, Division of Surgical Oncology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

*Corresponding and request for material should be addressed to J-J.D (jean-jacques.diaz@lyon.unicancer.fr) or V.M. (virginie.marcel@lyon.unicancer.fr)

Keywords: ribosomal RNA (rRNA), 2'O-methylation, ribosome structure, specialized ribosome, breast cancer

Word count:

TEXT

Abstract (200-300 words)

Ribosomes synthesize proteins from messenger RNAs (mRNAs){Genuth:2018kb, Tahmasebi:2018fq, Xue:2012el}. Emerging evidences suggest that the ribosome plays a key role in regulating translation through change in ribosome composition and contributes in setting particular phenotypes such as cancer hallmarks{Genuth:2018kb, Shi:2017fp, Xue:2012el, Wei:2019ji}. Change in ribosome composition might include change in ribosomal RNA (rRNA) chemical modifications, and in particular in 2'O-methylation of rRNA ribose{Belin:2009kk, Marcel:2013jl, Helm:2017eg, Genuth:2018kb, Monaco:2018fp}. This scatter of available data derived from cancer cell lines challenges the original dogma wherein rRNA chemical modifications are strictly necessary for ribosome structure/function and thus present in all ribosomes{Decatur:2002wf}. However, due to the lack of large-scale analysis using human samples, the existence of variation in rRNA chemical modifications in real life remains a matter of discussion{Monaco:2018fp, Genuth:2018kb}. Here we analysed 2'O-methylation frequency at the 106 rRNA nucleotides which have been mapped and validated by both biochemical and omics approaches, sites using a dedicated genome-wide approach (RiboMETH-seq{Helm:2017eg, Birkedal:2015jf, Marchand:2016ey}) in a series of 195 human primary breast tumours. Our data revealed that frequency of rRNA 2'O-methylation exhibits intra- and inter-variability in human samples, demonstrated the existence of rRNA nucleotides with substochimetric 2'O-methylation frequency not only within the same tumour but also across the different tumours. Moreover, two classes of rRNA 2'O-methylation sites were identified. About 60% of the rRNA sites exhibited a highly stable 2'O-methylation frequency across the 195 human samples, while the other 40% presented highly variant 2'O-methylation frequency (range: 0 - 0.95). Predictive structural analyses using the recent mapping of rRNA chemical modifications in human ribosome solved by Cryo-EM{Natchiar:2017ij, Natchiar:2018gd}, showed that these two classes had strong but distinct impact on ribosome structure. Finally, alteration in rRNA 2'O-methylation was associated with classical clinical characteristics of

breast tumours thus reinforcing the biological relevance of rRNA chemical modifications. These data challenge the dogma wherein rRNA chemical modifications are strictly necessary for ribosome structure function{Decatur:2002wf} and reconcile this ancestral and the emerging modern view of the ribosome{Genuth:2018kb, Xue:2012el, Monaco:2018fp}, reinforcing the place of rRNA chemical modifications in the epitranscriptomic field.

Main text (1500 words)

Human ribosome is a ribonucleoprotein complex composed of 80 ribosomal proteins (RPs) and 4 rRNAs (5S, 5.8S, 18S and 28S){Monaco:2018fp, Genuth:2018kb, Natchiar:2018gd}. Ribosome is a ribozyme, the rRNAs carrying some of the functional activities of the ribosome, namely the intersubunit bridge interaction, the decoding and the peptidyl bond formation{Cech:2000uv}. Like RPs, human rRNAs exhibit 302 chemical modifications and the 2'O-methylation of ribose rRNA is the most abundant one{Monaco:2018fp, Helm:2017eg, Natchiar:2018gd}. Originally, chemical modifications of rRNAs first described in bacteria and yeast were thought to be compulsory to maintain the highly conserved structure of rRNAs on which ribosome activity relies{Decatur:2002wf, Monaco:2018fp}. However, it has been highly challenged in the past few years. In cancer cellular models, recent resolution of technological issues, including development of RNA-seq based approaches dedicated to rRNA 2'O-methylation profiling{Helm:2017eg, Genuth:2018kb, Marchand:2016ey, Krogh:2016cu} or improvement of Cryo-EM resolution{Khatter:2015fs, Natchiar:2017ij, Natchiar:2018gd}, demonstrated that all along the rRNA the 2'O-methylation frequency varies {Belin:2009kk, Marcel:2013jl, Sharma:2017fi, Eroles:2017iz, Natchiar:2017ij, Krogh:2016cu, DSouza:2018fu, Sornjai:2017dr, Zhou:2017io}. In parallel, we and others reported an association between variation of rRNA 2'O-methylation and modulation of translation efficiency of particular mRNAs subsets in different cancer cellular models{Belin:2009kk, Marcel:2013jl, Gachet:2018gy, Eroles:2017iz, DSouza:2018fu, Su:2014ha}. Using cell-free in vitro translation assays, we recently demonstrated that reduction of rRNA 2'O-methylation directly reduces Internal

Ribosome Entry Site-dependent translation initiation{Erales:2017iz}. Moreover, alteration of rRNA 2'O-methylation has been associated with tumorigenesis and cancer progression of both solid and haematological cancers{Su:2014ha, Marcel:2013jl, Gachet:2018gy, Zhou:2017io}, the translation being now recognized as a key step of gene expression that contributes in the acquisition and maintenance of cancer hallmarks{Tahmasebi:2018fq, Truitt:2016hr}. These data have added a new clue in favour of a role for ribosome in regulating translational control, in particular in cancer. However one critical remaining challenge is to evaluate the diversity of rRNA 2'O-methylation profiles that might occur in real-life.

We hypothesized that the high heterogeneity of breast tumours{Prat:2015fr, Perou:2000if} might be accompanied by a corresponding diversity in rRNA 2'O-methylation profiles that can now be evaluated thanks to the RiboMETH-seq approach{Helm:2017eg, Marchand:2016ey, Birkedal:2015jf}. Using human RNA reference samples analysed in five technical replicates and 20 primary breast tumour samples analysed in duplicates, we assessed the robustness and technical variability of rRNA 2'O-methylation frequency determination (i.e. C-score) by RiboMETH-seq when using human frozen samples (Extended Data Fig. 1-2). We then determined the diversity of rRNA 2'O-methylation profiles in a series of 195 primary breast tumours (Fig. 1 and Extended Table 1). Hierarchical clustering showed that across breast tumours, C-scores exhibited high variability. In addition, two types of rRNA 2'O-methylation sites were distinguished: rRNA 2'O-methylation sites whose C-score showed low variability (mainly red squares across tumours) and in contrast, the ones whose C-score presented high variability (blue to red squares across tumours). Indeed, three sites exhibited C-scores ranging from 0 to > 0.90, the minimal C-score frequency being observed in different tumours (Extended Data Fig. 3a). Site-by-site comparison of C-score range between the 195 breast tumours and the human RNA reference samples analysed in five technical replicates indicated this high variability in C-score corresponded to biological variability rather than technical variability (Extended Data Fig. 3b). These data clearly demonstrated that rRNA 2'O-methylation profiles exhibited high diversity, this diversity being however carried not by all but only some sites.

To refine the two classes of rRNA sites with either a low or high variability in their 2'-O-methylation frequency and determine their respective structural and thus functional impacts, linear regression based on C-score variability measured by using interquartile range (IQR) was performed (Extended Data Fig. 3c). Such approach identified 60 rRNA 2'-O-methylation sites which exhibited the most stable C-scores across the 195 primary breast tumours (red sites: 56.6% of the rRNA 2'-O-methylation sites) and 46 sites that exhibited the most variant C-scores (blue sites: 43.4%) (Fig. 2a and Extended Data Fig.4). Mapping these most stable (thereafter termed "stable") and most variant ("variant") rRNA 2'-O-methylation sites on the human ribosome{Khatter:2015fs, Natchiar:2017ij, Natchiar:2018gd} revealed an apparent random localization with no enrichment in any of the three rRNAs (Fig. 2b-e). However, variant rRNA 2'-O-methylation sites of the 18S small subunit were mainly located on the ribosome surface. They were either in direct contact with RPs, such as the most variant site located at nucleotide G in position 1447 (18S-Gm1447) and RPS20 (Fig. 2c), or at the external face of the ribosome, such as the variant 18S-Am576 sites (Fig. 2d), indicating that presence or absence of 2'-O-methylation at these particular variant sites might affect interaction with RPs or translational factors and thus modulate ribosome function. In the 28S large subunit, some variants sites are located within the exit tunnel (Fig. 2e). Interestingly, while the peptidyltransferase center concentrated mainly stable sites, decoding and intersubunit bridges encompassed some variant sites. Interestingly an enrichment analysis showed an increased number of "variant" rRNA sites among the 106 sites in humans compared to the other life three branches (Fig. 2f), suggesting an association with appearance of rRNA sites with high variability in their 2'-O-methylation frequency and evolution characterized by an increasing number of fine-tuning gene expression mechanisms. These data suggested that "stable" rRNA sites were mainly involved in conserved and compulsory functions of the ribosome while the "variant" rRNA sites rather contributed in regulating interaction of ribosome with RNA or proteins involved in translational control.

We finally evaluated association between alteration in rRNA 2'-O-methylation and biological characteristics of primary breast tumours to determine whether rRNA 2'-O-methylation diversity

occurred randomly or concomitantly with particular features among breast tumours. Site-by-site comparison of C-scores at the 106 rRNA sites among the 195 primary breast tumours exhibiting different biological characteristics showed significant difference in C-scores of four “variant” rRNA sites with ER and PR status, intrinsic breast cancer subtype and grade (Fig. 3). Analyses were also performed using the complete rRNA 2’O-methylation profile at the 106 sites, principal components analyses allowing identifying tumours with high similarity in their rRNA 2’O-methylation profiles (Extended Data Fig. 5a). Using the two main groups identified on the basis of their similarity in their rRNA 2’O-methylation profiles, this approach revealed that global decrease in rRNA 2’O-methylation tended to be associated with tumour aggressiveness (Extended Data Fig.5). Indeed, the patients carrying breast tumours with a lower 2’O-methylation frequency at their rRNA sites, in particular on the most variant sites, were prone to a lower overall survival than the ones carrying breast tumours with a higher 2’O-methylation frequency. This tendency might be at least in part explained by the shift in the ratio of the most aggressive breast tumours, the triple-negative, to the less aggressive ones, the luminal{Prat:2015fr}. Similar trend in clinical outcome and proportion in intrinsic breast cancer subtype was observed when using hierarchical clustering as parameters to separate patients bearing similar rRNA 2’O-methylation profiles (Fig. 1, Fig. 4a,b and Extended Data Fig. 6a). Thanks to the increased number of patients per groups using hierarchical clustering-based categorization, we observed that rRNA 2’O-methylation profiles allowed identifying patients bearing either luminal or HER-amplified breast tumours with the poorest clinical outcome (Fig. 4c,d and Extended Data Fig. 6b-d). These data suggested that alteration of rRNA 2’O-methylation frequency co-occurred with typical biological features of breast tumours.

Altogether our data reported that alteration of rRNA 2’O-methylation naturally occurred in humans. Moreover a high diversity of rRNA 2’O-methylation profiles exist in human primary breast tumours. Alteration of rRNA 2’O-methylation have already been described By comparison of cancer cellular models{Belin:2009kk, Natchiar:2017ij, Sharma:2017fi, Krogh:2016cu, DSouza:2018fu}, and mainly in response to alteration of expression of one of the components of the rRNA methylation complex, the rRNA methyl-transferase FBL or the

small non-coding RNAs, snoRNAs, which guides FBL on the rRNA sites that need to be methylated{Marcel:2013jl, Sharma:2017fi, Eroles:2017iz, Gachet:2018gy}, and in a less extend in small panels of pathological human samples{Zhou:2017io, Sornjai:2017dr}. The present study provides definitive evidences supporting the existence of ribosomes with distinct composition at the rRNA 2'O-methylation level but also points out the importance of rRNA 2'O-methylation profiling in the understanding and management of human cancers. The resolution of ribosome structure at rRNA chemical modification levels along with rRNA 2'O-methylation profiling will indeed allow developing cancer subtypes-specific inhibitors of ribosome{Myasnikov:2016gd, Catez:2019fz, Natchiar:2018gd, Monaco:2018fp, deLoubresse:2014jx}. Future technical developments will be required in particular to determine whether alteration of rRNA 2'O-methylation profile occurs in an intra- or inter-cellular dependent manner, although our recent study using Cryo-EM approach suggested it occurs first at the cellular level{Natchiar:2017ij}. Analysing rRNA 2'O-methylation frequency in a large panel of human samples demonstrated that two classes of rRNA 2'O-methylation sites co-occurred depending on their ability to tolerate or not absence of chemical modifications. Structure/function analysis, disparate appearance through evolution and differential association with biological characteristics not only support the existence of these two classes but also suggest that they can have distinct impact on ribosome function. The most "stable" rRNA sites, which were 2'O-methylated at a high frequency, were necessary to sustain the core function of the ribosome, in particular at the peptidyl-transferase center which might be the most sensible to change in rRNA structure as shown by absence of any nucleotide variation in this functional site{Parks:2018be}. In contrast the "variant" rRNA sites, which existed either as 2'O-methylated or not, were optional to the core ribosome function but may be a way to finely regulate intrinsic ribosome activity and thus be a source of ribosome plasticity. This discovery reunites two divergent visions of the ribosome{Decatur:2002wf, Genuth:2018kb, Xue:2012el}. From the first identification of rRNA chemical modifications in bacteria and yeast models, the ancestral vision claims that chemical modifications are compulsory to the fine structuration of the ribosome on which its functions relied. In contrast, the emerging view of

the modern ribosome claims that chemical modifications can be modulated to provide plasticity to the ribosome structure on which its regulatory effects relied and thus to extend the functions of the ribosome to translational regulation in humans and more generally in mammals. The existence of distinct but complementary classes of rRNA chemical modifications, that could be possibly generalized to the entire epitranscriptomic field, will undoubtedly lead to a deeper and more complete understanding of rRNA chemical modifications both in ribosome function and in translational regulation.

METHODS (3000 words)

Human breast tumour samples. A series of 195 primary breast tumours, including biological materials and clinical data (last update 2016), have been collected and maintained by the Tayside Tissue Bank (TTB, Dundee, Scotland, UK) that received ethical approvals (REC Reference 07/S1402/90). Tumour collection corresponded to snap-frozen materials gathered after macrodissection by breast cancer pathologists of biopsies performed at diagnosis{Bourdon:2011bl}. Total RNA were extracted from frozen tissues by TTB services as already described{Bourdon:2011bl}.

All biopsies were issued from untreated female patients without metastasis at diagnosis or family history. Hormonal receptors (estrogen ER and progesterone PR) and HER2/ErbB2 receptors status were determined by immunohistochemistry on FFPE sections{Bourdon:2011bl}. These three markers allowed to identify the different intrinsic breast cancer subtypes: ER+ PR+/- HER2-, considered as equivalent to luminal subtype; ER+/- PR+/- HER2+, equivalent to HER2-amplified subtype; and ER- PR- HER2-, as triple-negative subtype (TNBC). The current median follow-up of this series of 195 primary breast tumours series was of 12.3 years. This series exhibited expected clinical characteristics (Extended Data

Table 1), in particular regarding association of overall survival with tumour size ($P < 0.0001^{***}$), lymph node invasion ($P = 0.0079^{**}$), grade ($P = 0.0151^{*}$), and intrinsic breast cancer subtypes ($P = 0.0569$).

RiboMETH-seq and C-score determination. Frequency of rRNA 2'O-methylation at the 106 sites was determined in human breast tumours samples by RiboMETH-seq, the only approach allowing absolute quantification of rRNA 2'O-methylation frequency to date{Krogh:2018iu, Birkedal:2015jf, Marchand:2016ey}. Presence of 2'O-methylation protects the phosphodiester bond located at the 3' of the methylated site from alkaline hydrolysis. Thus presence of 2'O-methylation at the given nucleotide n induces a decrease in RNA fragments starting at the

nucleotide n+1 while it increases the one finishing at the nucleotide n-1, allowing to calculate 2'O-methylation frequency at the corresponding site (or C-score).

RiboMETH-seq was performed as previously described using Illumina technology{Marchand:2016ey, Marchand:2017fr}. Briefly, total RNA was first subjected to partial alkaline hydrolysis to generate RNA fragments ranging from 50 to 100 bp. Libraries were then prepared using NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set (Illumina) and multiplexed. Sequencing were performed using Hiseq sequencer (Illumina).

Human RNA reference sample was used as a calibrated source of rRNA to determine technical robustness and as an inter-run quality control for RiboMETH-seq approach. It corresponds to the commercial Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen) prepared from 20 different human adult and fetal normal major organs. In parallel, 20 primary breast tumours chosen randomly were processed twice independently to obtain a small series of technical duplicates.

After sequencing, FastQ files were treated bioinformatically to compute C-score associated to the 106 sites as already described{Marchand:2017fr}. Briefly, adapter sequences were trimmed off raw reads using Trimmomatic and the extracted reads were aligned on a human rRNA sequence (NR_046235) using Bowtie 3. 5' and 3' ends reads were counted at each rRNA nucleotide position and used to determine the C-scores as previously described{Birkedal:2015jf}. C-score at the nucleotid position n corresponds to the difference between maximum frequency (i.e.1) and the number of 5'/3' end read counts at position n+1 normalized to the mean average of raw counts from the 6 nucleotides located just upstream and downstream of the nucleotide position n. A comparison of slight modifications in calculating the C-score was tested using Receiver Operating Characteristics (ROC) curves by reducing the window of neighbouring nucleotides (6, 4 or 2) and/or by using either mean average or median of raw counts of neighbouring nucleotides (Extended Data Figure 1A). In the present study, a C'-score was used that corresponds to a 6 nucleotides window and a normalization to the median of raw counts of neighbouring nucleotides. This C'-score was termed C-score throughout the manuscript.

Statistical analyses and graphical representations

Hierarchical clustering. Comparison between the 195 primary breast tumours and their C-scores at the 106 individual rRNA 2'O-methylation sites was performed using hierarchical clustering. Briefly,..... On the hierarchical clustering graph, each row represents a single breast tumour, and each column a single rRNA 2'O-methylation site. In each sample, the C-score of each rRNA 2'O-methylation site is represented by the colour of matrix. Dendrogram representing similarities either in the breast tumours on the basis of their rRNA 2'O-methylation profiles or in the rRNA 2'O-methylation profiles between samples have been determined by.... Dendrograms allow the identification of clusters of both breast tumours exhibiting the most similar rRNA 2'O-methylation profiles and rRNA 2'O-methylation sites exhibiting the most similar variation across the primary breast tumours.

rRNA 2'O-methylation profiles. rRNA 2'O-methylation profiles were shown as either linear curves or box-and-whiskers plots. Linear curves represent the mean and standard deviation of C-scores issued from the 195 primary breast tumours at each rRNA 2'O-methylation sites. Box-and-whiskers plots were build for each of the 106 rRNA 2'O-methylation sites as following: band inside the box represents the median C-score at a given rRNA 2'O-methylation site; top of the boxes represents the first quartiles (i.e. C-score delimiting 25% of the tumours with the lowest C-scores) while bottom of the boxes represents the third quartiles (i.e. 75% of the population); top whisker represents the 2.5th percentiles while bottom whisker represents the 97.5th percentiles; and points represent the C-scores not included in the whiskers range. Difference between C-scores delimiting the 97.5th and the 2.5th percentiles corresponds to the interquartile range (IQR). Quality control of RiboMETH-seq raw data was performed by comparing both 5'/3' end raw counts and C-score using either individual linear curve or non-parametric Spearman correlation.

Association of rRNA 2'O-methylation with biological and clinical characteristics. Between-group comparisons were performed using a Chi-2's or Fisher's exact test for categorical data. Comparison of rRNA 2'O-methylation frequency between two groups of breast tumours was

performed using non-parametric Mann-Whitney tests. Overall survival (OS) corresponded to the timing from date of diagnosis to either death or last follow-up for censored patients. Survival curves for OS with associated log-rank tests were generated using the Kaplan Meier method. Survival median has been estimated using the inverted Kaplan-Meier method.

Principal component analysis (PCA). Comparison between the 195 primary breast tumours on the basis of their rRNA 2'O-methylation profile was performed using principal component analysis (PCA). Briefly,... Groups of primary breast tumours were identified using...

Statistical significance and tools. All P-values corresponded to two-tailed P-values. A P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using either R studio or GraphPad Prism v7.0a softwares (GraphPad Software, Inc). Graphical representations were depicted using either R studio or GaphPad Prism software.

rRNA 2'O-methylation mapping or Structure/function analyses?

Data availability. Deposit FastQ and/or raw counts as dataset in GEO ?

Methods reference (continuous numbering regarding Reference section)

References

1. Genuth, N.R., Barna, M., 2018. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* 1–22. doi:10.1038/s41576-018-0008-z
2. Tahmasebi, S., Khoutorsky, A., Mathews, M.B., Sonenberg, N., 2018. Translation deregulation in human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1–17. doi:10.1038/s41580-018-0034-x
3. Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K.M., Genuth, N.R., Röst, H.L., Teruel, M.N., Barna, M., 2017. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Molecular Cell* 67, 71–83.e7. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.021
4. Belin, S., Beghin, A., Solano-González, E., Bezin, L., Brunet-Manquat, S., Textoris, J., Prats, A.-C., Mertani, H.C., Dumontet, C., Diaz, J.-J., 2009. Dysregulation of Ribosome Biogenesis and Translational Capacity Is Associated with Tumor Progression of Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 4, e7147. doi:10.1371/journal.pone.0007147.g006
5. Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Gabriell, T., Morel, A.-P., Solano-González, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., Bourdon, J.-C., Jordan, L., Thompson, A., Tafer, Y., Cong, R., Bouvet, P., Saurin, J.-C., Catez, F., Prats, A.-C., Puisieux, A., Diaz, J.-J., 2013. p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell* 24, 318–330. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.013
6. Helm, M., Motorin, Y., 2017. Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nat. Rev. Genet.* 18, 275–291. doi:10.1038/nrg.2016.169
7. Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Krogh, N., Sabarinathan, R., Gorodkin, J., Nielsen, H., 2015. Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 451–455. doi:10.1002/anie.201408362
8. Marchand, V., Blanloeil-Oillo, F., Helm, M., Motorin, Y., 2016. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Research* 44, e135. doi:10.1093/nar/gkw547
9. Natchiar, S.K., Myasnikov, A.G., Kratzat, H., Hazemann, I., Klaholz, B.P., 2017. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature Publishing Group* 1–22. doi:10.1038/nature24482
10. Natchiar, S., Myasnikov, A., Hazemann, I., Klaholz, B., 2018. Visualizing the Role of 2'-OH rRNA Methylations in the Human Ribosome Structure. *Biomolecules* 8, 125. doi:10.1038/ncomms12856
11. Xue, S., Barna, M., 2012. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 355–369. doi:10.1038/nrm3359
12. Monaco, P., Marcel, V., Diaz, J.-J., Catez, F., 2018. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules* 8, 106. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.021
13. Decatur, W.A., Fournier, M.J., 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 344–351.
14. Cech, T.R., 2000. Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science* 289, 878–879.

15. Sharma, S., Marchand, V., Motorin, Y., Lafontaine, D.L.J., 2017. Identification of sites of 2'-O-methylation in human ribosomes. *Scientific Reports* 1–15. doi:10.1038/s41598-017-09734-9
16. Eralles, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S.E., Garcia, M., Lafôrets, F., Marcel, V., Baudin-Baillieu, A., Bertin, P., Couté, Y., Adrait, A., Meyer, M., Gabriell, T., Yusupov, M., Namy, O., Ohlmann, T., Motorin, Y., Catez, F., Diaz, J.-J., 2017. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 8, 201707674. doi:10.1093/nar/gkw1138
17. Krogh, N., Jansson, M.D., Häfner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H., Nielsen, H., 2016. Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Research* 44, 7884–7895. doi:10.1093/nar/gkw482
18. D'Souza, M.N., Gowda, N.K.C., Tiwari, V., Babu, R.O., Anand, P., Dastidar, S.G., Singh, R., Selvaraja, B., Pal, R., Ramesh, A., Chattarji, S., Chandran, S., Gulyani, A., Palakodeti, D., Muddashetty, R.S., 2018. FMRP Interacts with C/D Box snoRNA in the Nucleus and Regulates Ribosomal RNA Methylation. *ISCIENCE* 9, 399–411. doi:10.1016/j.isci.2018.11.007
19. Su, H., Xu, T., Ganapathy, S., Shadfan, M., Long, M., Huang, T.H.-M., Thompson, I., Yuan, Z.-M., 2014. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* 33, 1348–1358. doi:10.1038/onc.2013.89
20. Truitt, M.L., Ruggero, D., 2016. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat Rev Cancer* 16, 288–304. doi:10.1038/nrc.2016.27
21. Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., Muñoz, M., 2015. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* 24, S26–S35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008
22. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. doi:10.1038/35021093
23. Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., Nebout, M., Hazemann, I., Imbert, V.E.R., Khatter, H., Peyron, J.-F.C.O., Klaholz, B.P., 2016. Structure–function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics. *Nature Communications* 7, 1–8. doi:10.1038/ncomms12856
24. Parks, M.M., Kurylo, C.M., Dass, R.A., Bojmar, L., Lyden, D., Vincent, C.T., Blanchard, S.C., 2018. Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Sci Adv* 4, eaao0665. doi:10.1126/sciadv.aao0665
25. Wei, J., Kishton, R.J., Angel, M., Conn, C.S., Dalla Venezia, N., Marcel, V., Vincent, A., Catez, F., Ferré, S., Ayadi, L., Marchand, V., Dersh, D., Gibbs, J.S., Ivanov, I.P., Fridlyand, N., Couté, Y., Diaz, J.-J., Qian, S.-B., Staudt, L.M., Restifo, N.P., Yewdell, J.W., 2019. Ribosomal Proteins Regulate MHC Class I Peptide Generation for Immunosurveillance. *Molecular Cell* 1–18. doi:10.1016/j.molcel.2018.12.020
26. de Loubresse, N.G., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M.V., Yusupova, G., Yusupov, M., 2014. Garreau de Loubresse_Nature2014_Abio. *Nature* 1–17. doi:10.1038/nature13737

Extended Data Information

Extended Data information are given in a separate document.

Acknowledgements

This research project was funded by Fondation pour la recherche ARC (20161204686, MARACAS), PAIR Sein program (ARC_INCa_LNCC_7625, RiboTEM), INCa (PRT-K17, EMT-CoNCEPT), SIRIC program (INCa-DGOS-Inserm_12563, LyRICAN) and Synergie Lyon Cancer Foundation. F.NVL was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). F.C. is supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). J-J.D. and V.Marcel are supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). A.D. and J-C.B. are supported by Breast Cancer Now fellowship (2012MaySF127). The Tayside Tissue Bank is supported by the Chief Scientist Office (CSO), NHS and Dundee University.

Author Contributions

Conceptualization and methodology: J.K., A.V., J-J.D. and V.Marce.;

Investigation and validation: J.K., V.March., S.K.N., F.N.V.L., L.A., L.T., Y.M. and V.Marce.;

Formal analysis: J.K., S.K.N., F.C., B.P.K., A.V., J-J.D. and V.Marce.;

Resources: F.N.V.L., S.B., A.D., L.B.J., A.T. and J-C.B

Writing-original draft preparation: J.K., S.K.N., B.P.K., A.V., J-J.D. and V.Marce.

Writing-review and editing: J.K., V.March., S.K.N., F.N.V.L., J-C.B., F.C., A.P., Y.M., B.P.K., A.V., J-J.D. and V.Marce.;

Visualization and supervision: J-J.D. and V.Marce.;

Project administration and funding acquisition: A.P., J-J.D. and V.Marce.

All authors contributed to the final version of the manuscript.

Authors Information

The authors declare no conflict of interest.

Figure Legends

Figure 1. Variation in rRNA 2'O-methylation frequency in 195 human primary breast tumours. Frequency of rRNA 2'O-methylation (or C-score) was determined at the 106 rRNA sites using an innovative RNA-seq based method, RiboMETH-seq{Birkedal:2015jf, Marchand:2016ey}, in a series of 195 human primary breast tumours. Data are presented as a hierarchical clustering: each row represents a single breast tumour, and each column a single rRNA 2'O-methylation site. In each sample, the C-score of each rRNA 2'O-methylation site is represented by the colour of the following matrix: red squares, C-score is closed to 1; blue squares, C-score closed to 0.6; white squares, C-score closed to 0.8 (see colour scale). Dendrogram representing similarities in the breast tumours on the basis of their rRNA 2'O-methylation profiles is shown on the left and allows distinguishing 5 groups of breast tumours. Dendrogram representing similarities in the rRNA 2'O-methylation profiles between samples is shown on the top with a zoom on rRNA 2'O-methylation sites whose C-scores present strong variation across samples.

Figure 2. Existence of two classes of rRNA 2'O-methylation sites. **a**, Box-and-whiskers plot presents C-score variation among the 195 human primary breast tumours at each of the 106 rRNA 2'O-methylation sites ordered by increasing interquartile range (IQR). Based on linear regression, two classes of rRNA 2'O-methylation sites were identified: sites whose C-scores are the most stables (red); and sites whose C-scores are the most variants (blue). Boxes plot the first and the third quartiles, whisker the 2.5th and the 97.5th percentiles, band inside the median and points the C-scores not included in the whiskers range. **b-e**, Mapping of the two classes of rRNA 2'O-methylation sites on the human ribosome{Natchiar:2017ij, Khatter:2015fs} shown as entire entity (b) or as details of the 18S subunit (c-d) and of the peptide tunnel exit (e). Red: most stable sites; blue: most variant sites. **f**, Cumulative histogram represents the percentage of each of the two classes through evolution. Number of rRNA 2'O-

methylation sites included in each category is detailed. Universal: sites conserved from bacteria to humans; eukaryotes: sites conserved from yeast to humans; humans: sites only described in humans.

Figure 3. Association of variation in rRNA 2'O-methylation frequency and biological characteristics of primary breast tumours. **a-c**, Example of significant variations in rRNA 2'O-methylation frequency at the 18S-Gm1447 site between ER+ and ER- (a), PR+ and PR- (b), and luminal and HER2 or TNBC (c) breast tumours. **d**, Summary of the 4 rRNA 2'O-methylation sites whose frequency were significantly different regarding some characteristics of breast tumours. *P*-values are indicated in the squares and colours indicate either a decrease (blue) or an increase (red) in C-score between the two conditions indicated on the top. Grey: no significant difference. ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; Luminal: ER+ PR+/- HER2-; HER2: ER- PR- HER2+; TNBC: ER- PR- HER2-; G: grade.

Figure 4. Tendency towards difference in overall survival of breast cancer patients bearing tumours exhibiting distinct rRNA 2'O-methylation profiles. **a-b**, Kaplan-Meier curves depicts the overall survival of patients grouped on the basis of their rRNA 2'O-methylation profiles identified by hierarchical clustering approach (Fig.1) (a), the two groups presenting distinct percentage in the different breast cancer subtypes (b). **c-d**, Kaplan-Meier analyses presents the overall survival of patients bearing either luminal (c) or HER2 (d) breast tumours that exhibit distinct rRNA 2'O-methylation profiles. Luminal: ER+ PR+/- HER2-; HER2: ER- PR- HER2+; TNBC: ER- PR- HER2-.

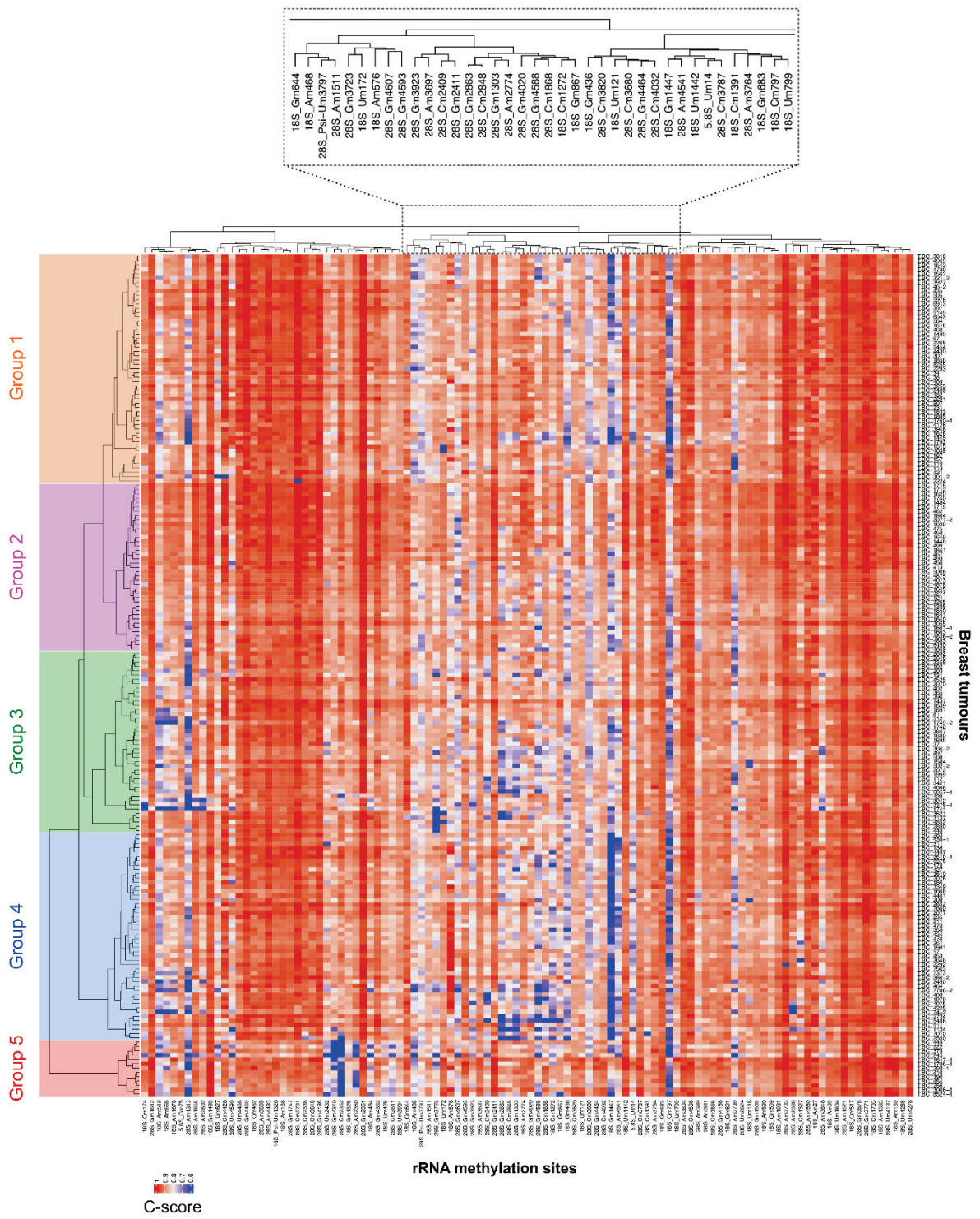


Figure 1

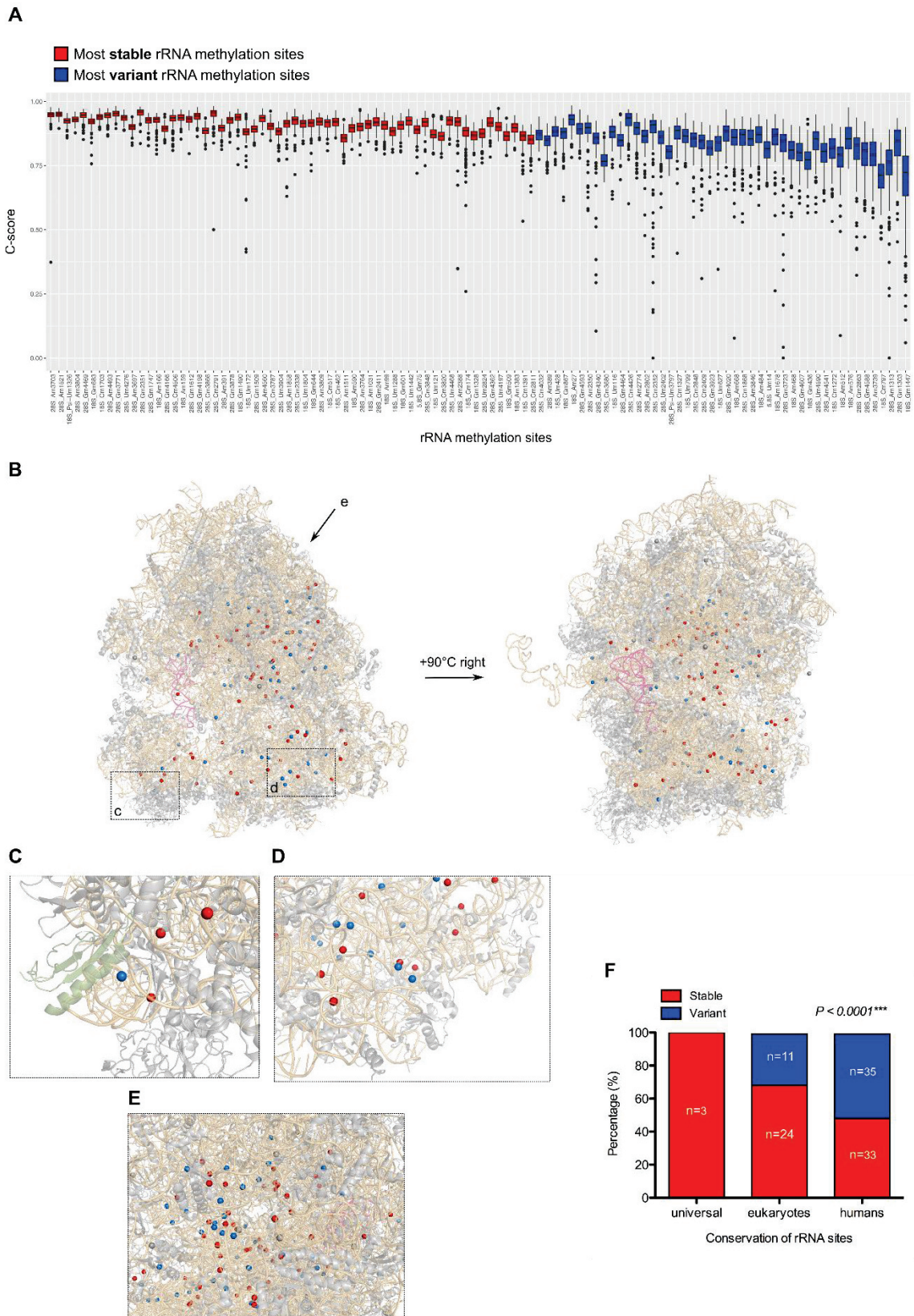


Figure 2

Revoir structure en fonction Bruno/Kundhavi

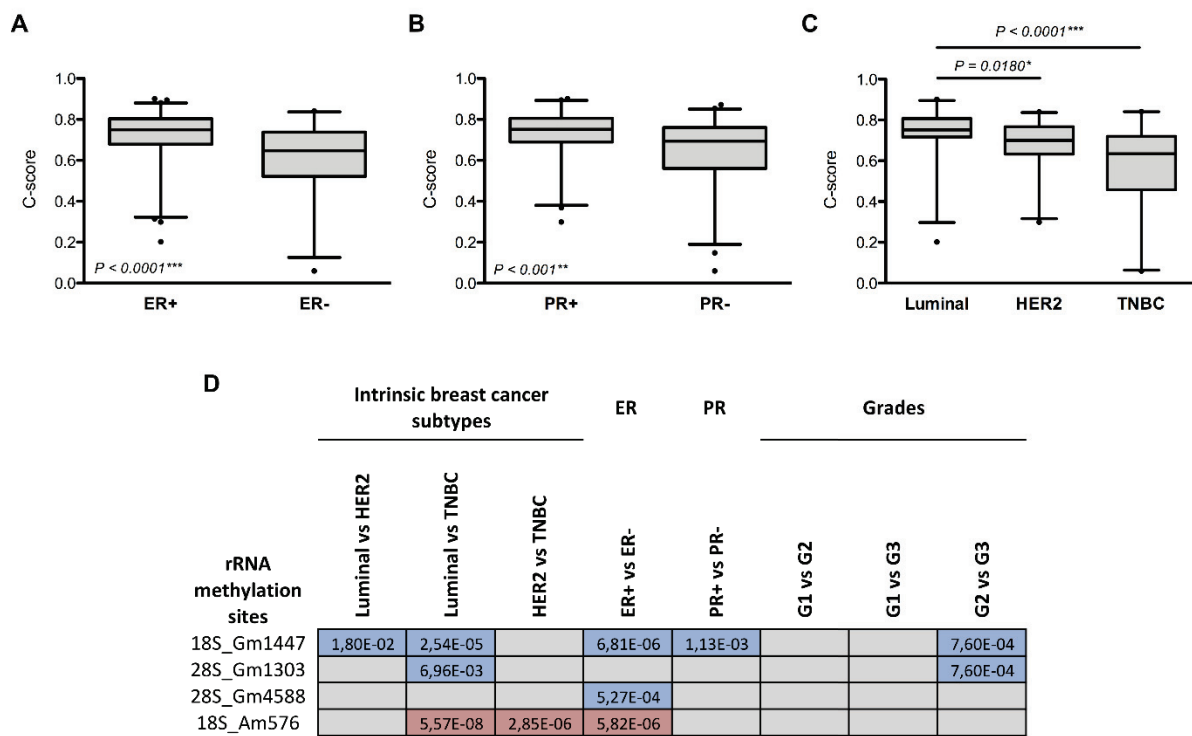


Figure 3

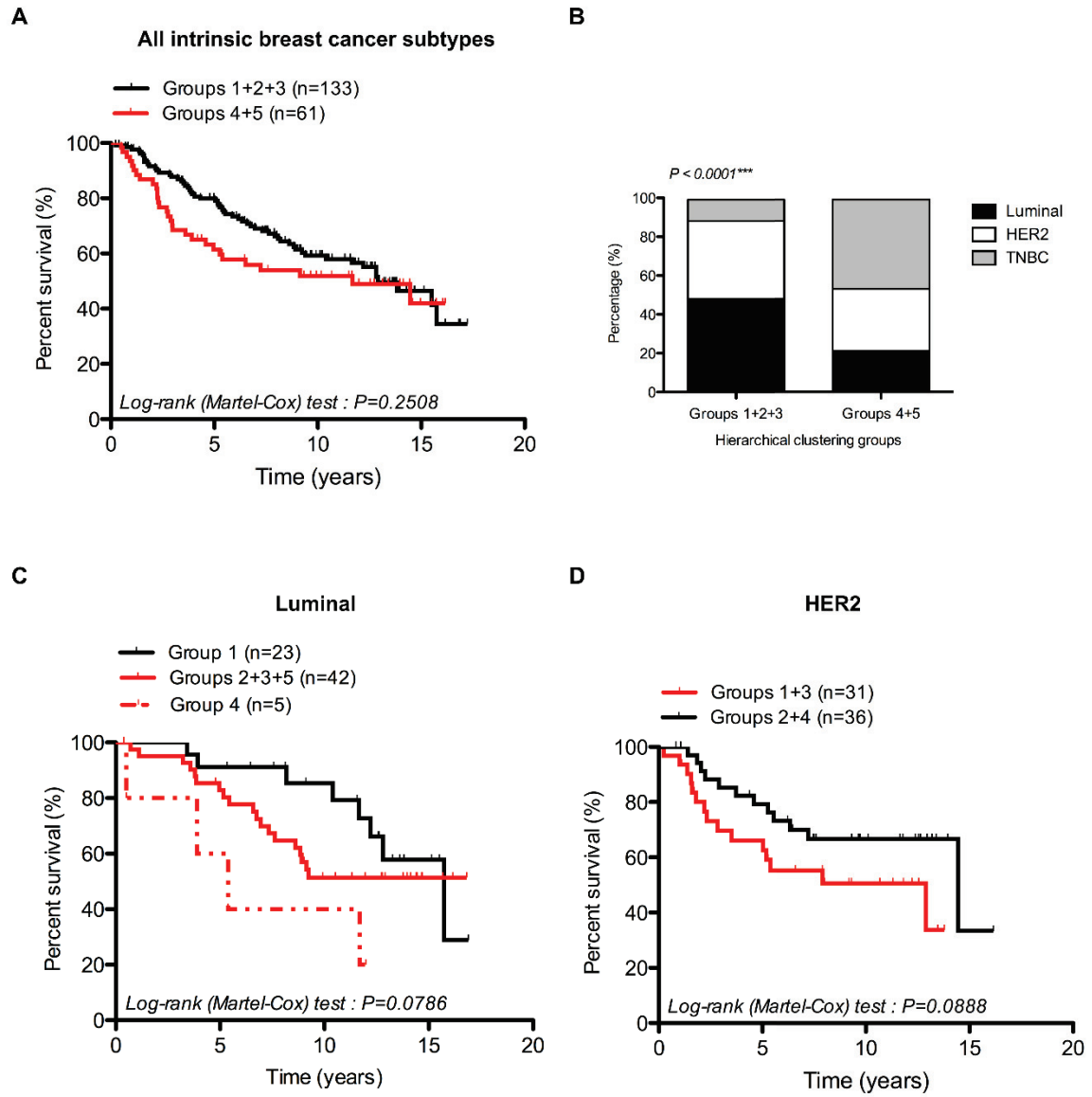
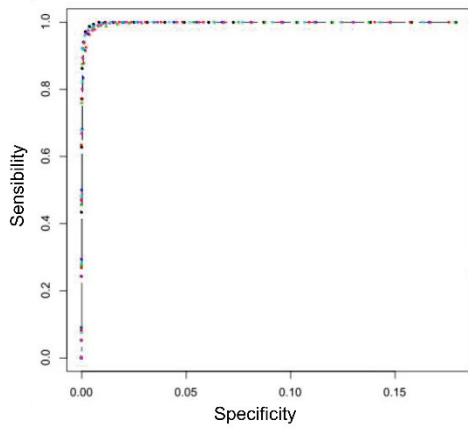


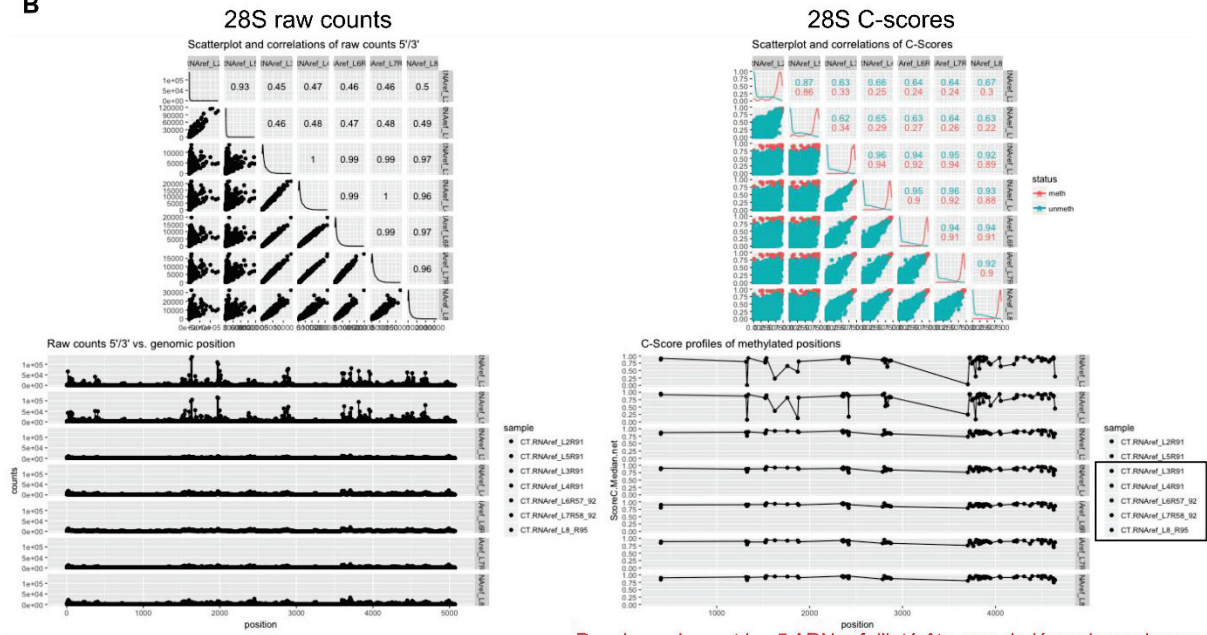
Figure 4

A

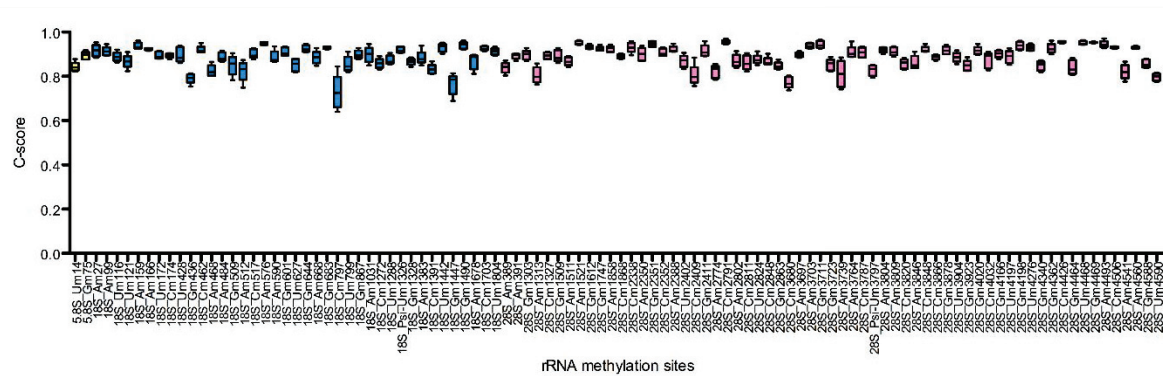


Method for average counts	Number of neighboring positions	C-score
mean	6	C-score M6 (Birkedal et al, 2015)
	4	C-score M4
	2	C-score M2
median	6	C-score Med6
	4	C-score Med4
	2	C-score Med2

B

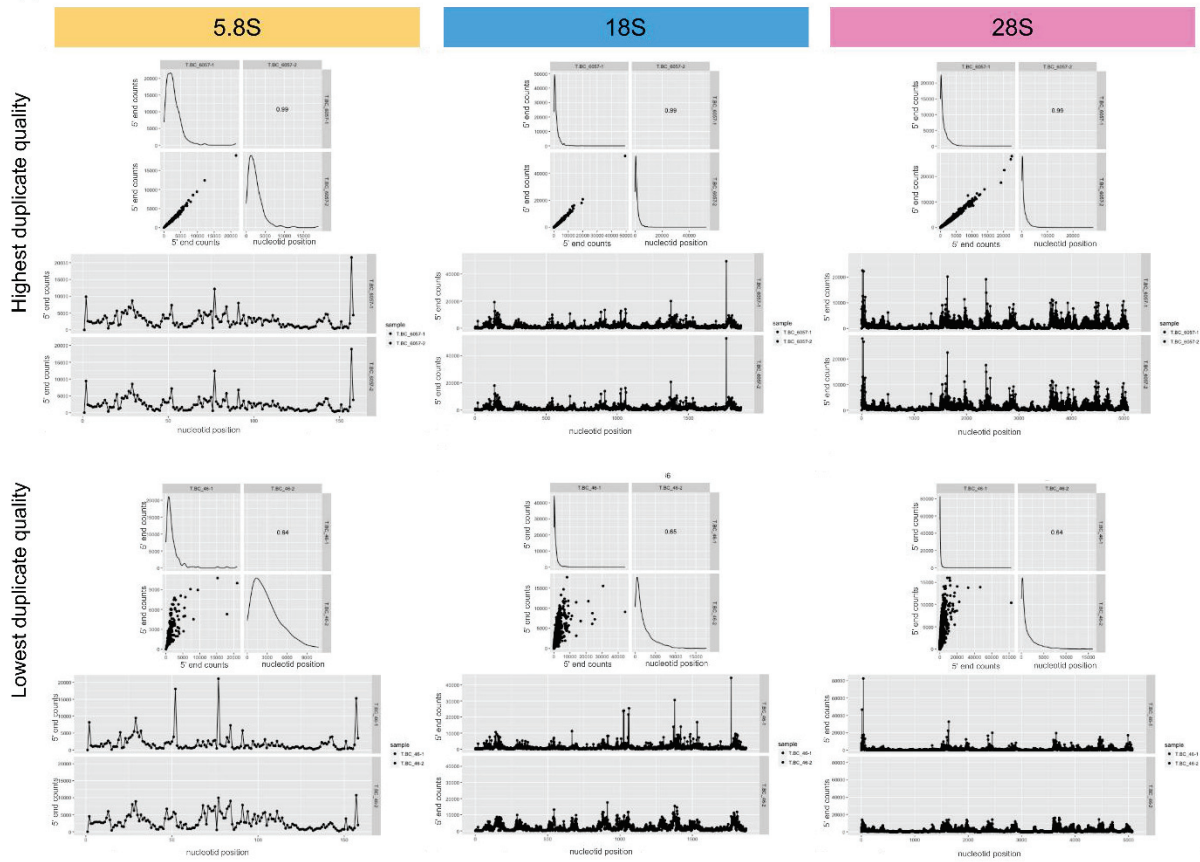


C

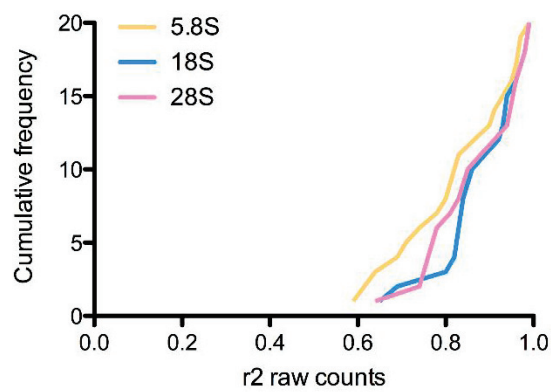


Supplementary Figure 1

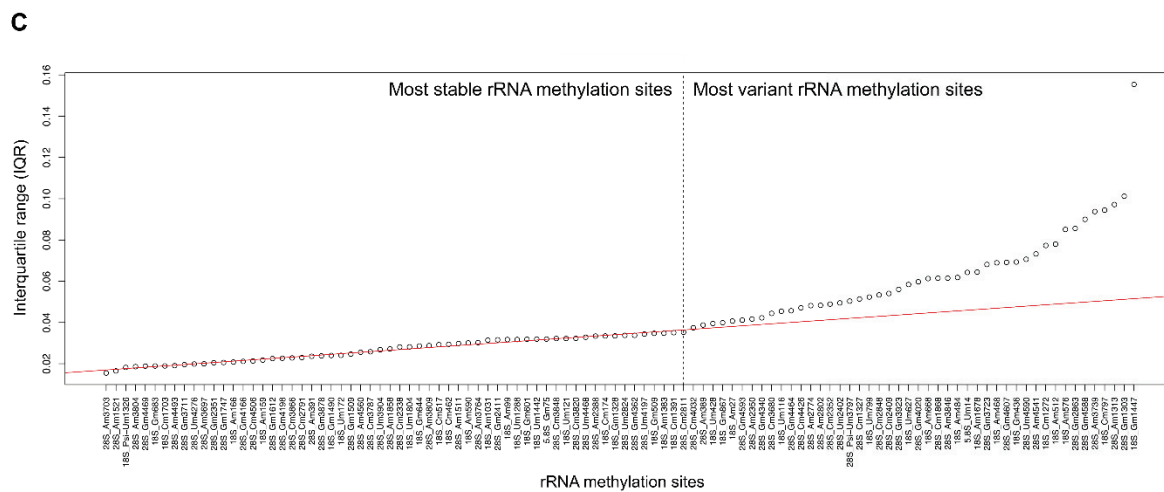
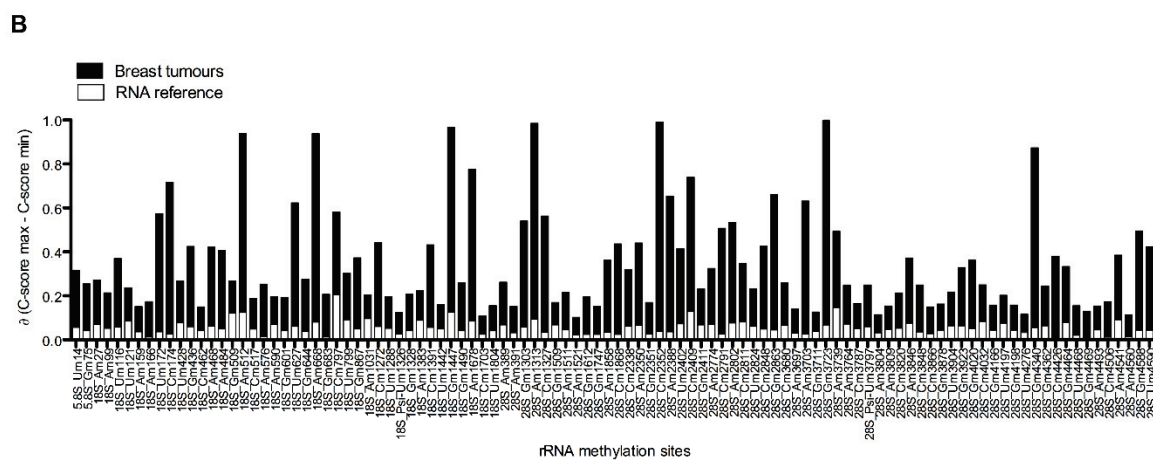
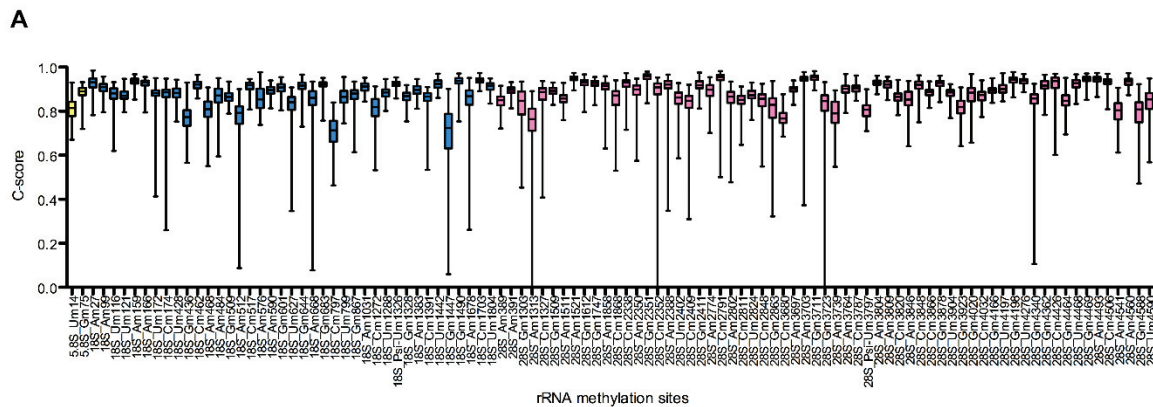
A



B

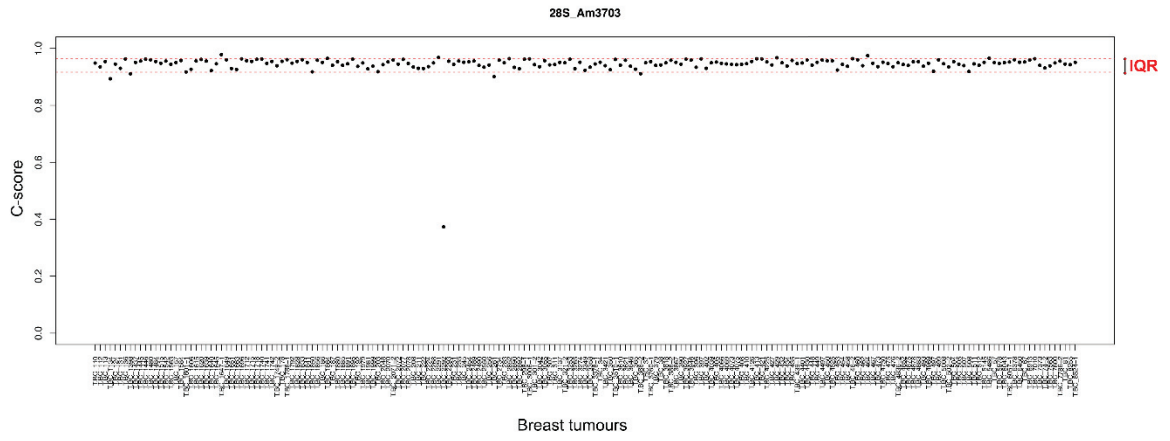


Supplementary Figure 2

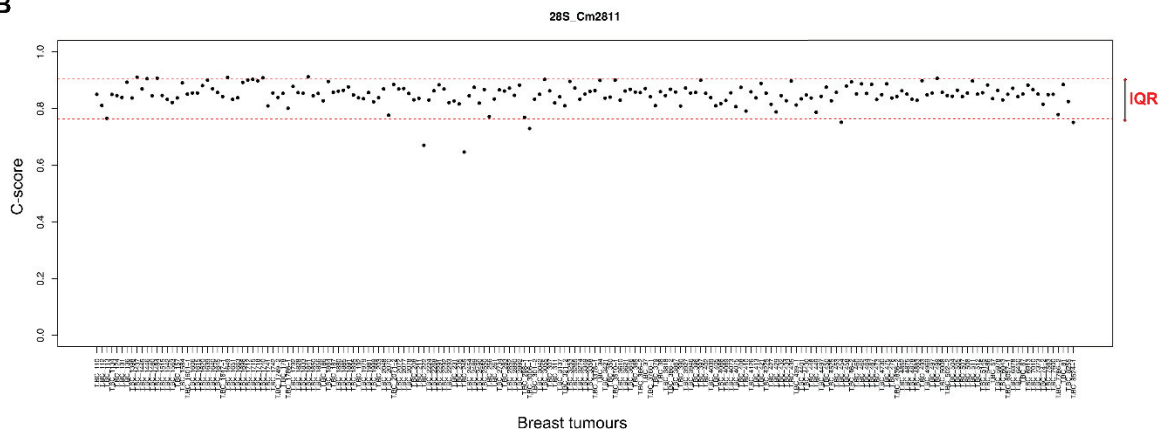


Supplementary Figure 3

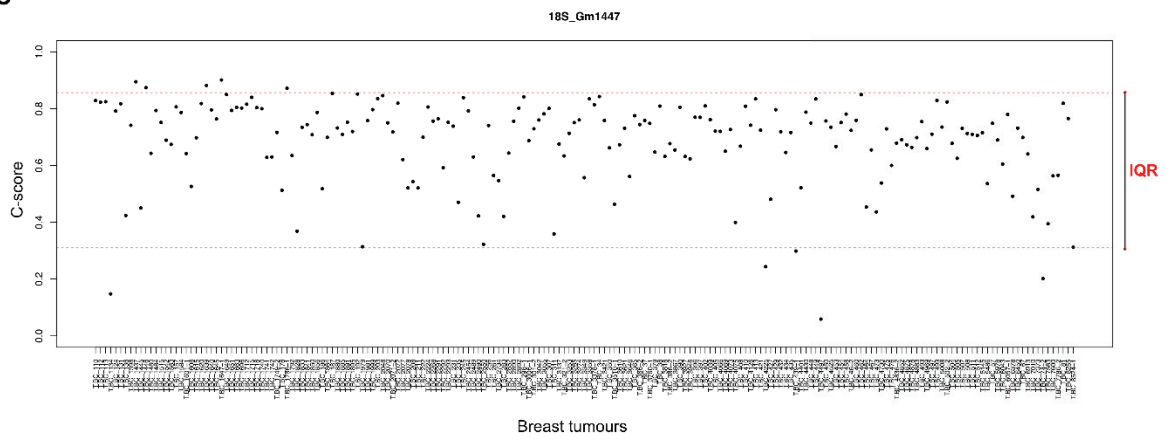
A



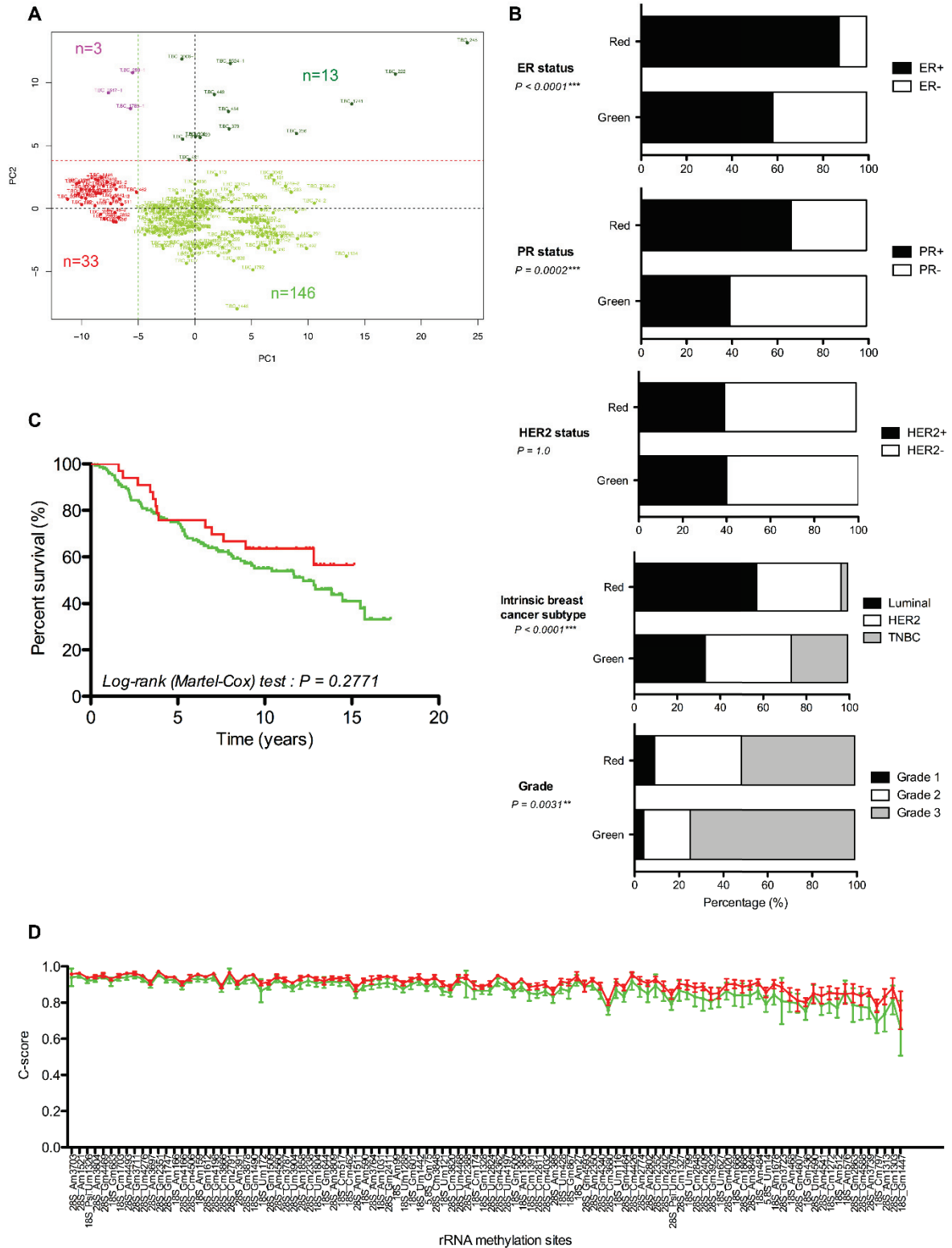
B



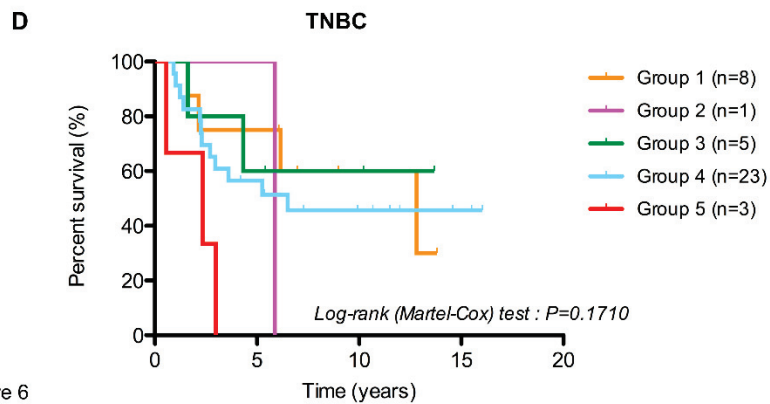
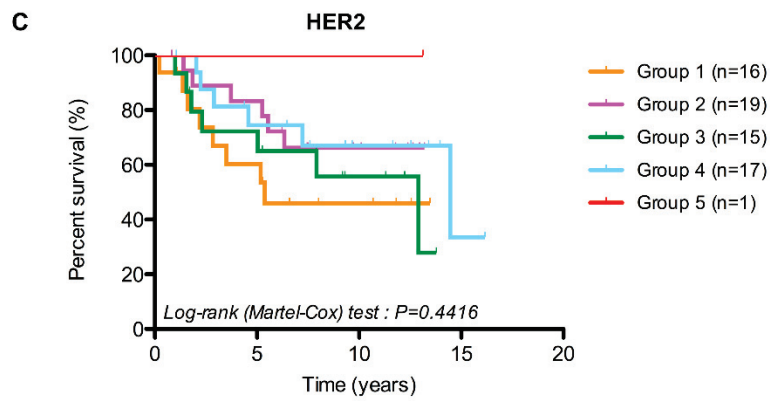
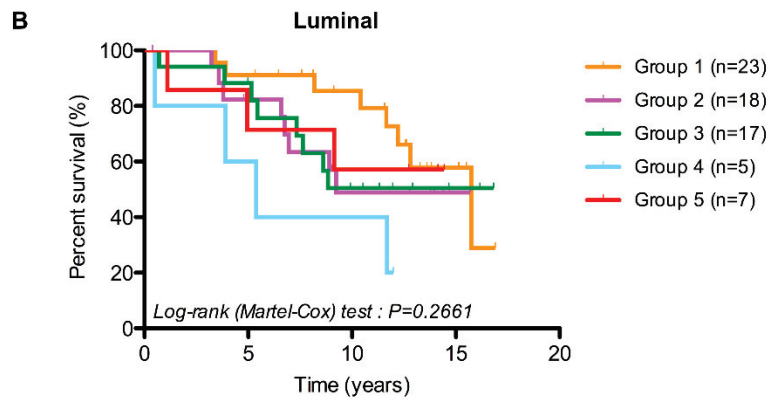
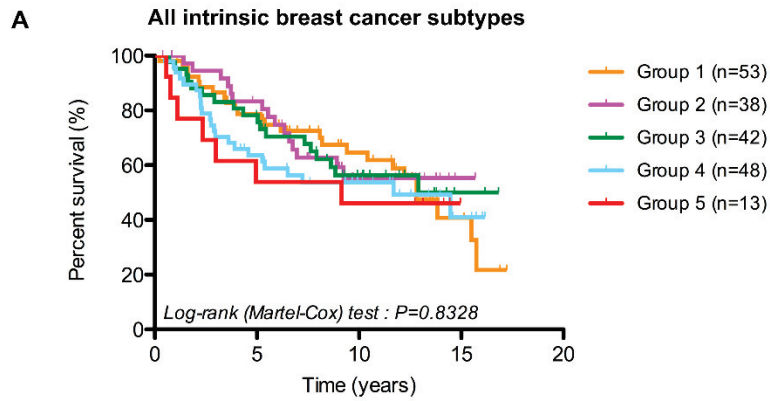
C



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

2. Analysis of the rRNA methylation complex components in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia – a pilot study

Title

Analysis of the rRNA methylation complex components in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia – a pilot study

Marek Ussowicz¹, Virginie Marcel³, Flora Nguyen Van Long³, Bernarda Kazanowska¹, Jean-Jacques Diaz^{3*}, Dariusz Wołowicz^{2*}

Affiliation:

1- Department of Pediatric Bone Marrow Transplantation, Oncology, and Hematology, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland

2- Department and Clinic of Haematology, Blood Neoplasms, and Bone Marrow Transplantation, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland

3- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, CEDEX 08, 69373 Lyon, France

Correspondence: Marek Ussowicz, Department of Pediatric Bone Marrow Transplantation, Oncology, and Hematology, Wroclaw Medical University, Borowska 213, 50-556 Wroclaw, POLAND; Tel: +4871-7332700; Fax: +4871 7332709; Email: USSOWICZ@TLEN.PL

Attribution for the work: data analysis and writing M.U.; concept: V.M., J-J.D.; data collection, molecular analysis: F.N.V.L., V.M. ; manuscript acceptance: D.W., B.K.; final manuscript acceptance:

Source of support: This work was supported by Ligue Nationale Contre le Cancer Comité Isère (RESIST, PPE 2018) and the French SIRIC program (LYriCAN, INCa-DGOS-Inserm_12563). VM and JJD are supported by Inserm. FNVL was a recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and the Fondation pour la recherche médicale (FRM).

Declarations of interest: none

ABSTRACT

Background

Dysregulation of ribosome biogenesis and alteration of ribosome composition, including alteration in ribosomal RNA (rRNA) 2'-O-ribose methylation, can play role in malignant transformation and cancer progression. Several studies recently reported that components of the rRNA methylation complex are associated with leukemogenesis. However, no study ever investigated the alteration of ribosome biogenesis factors in the most common pediatric malignancy – B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP ALL).

Objectives

To study the expression of factors building the rRNA methylation complex, either the protein components (FBL, NOP56, NOP58, NHP2L1) or some RNA components (box C/D snoRNAs: SNORD35B, SNORD65, SNORD46, SNORD50A, SNORD38B), as well as of CMYC, and NCL - a protein involved in rRNA synthesis, and clinical effects in children with BCP ALL.

Material and methods

The factors involved in ribosome biogenesis were studied in 28 children with BCP ALL by real-time PCR using the BioMark HD System (Fluidigm) in cDNA prepared from the bone marrow samples collected at diagnosis.

Results

The strong correlations were observed between NOP56, NOP58 and NCL, and multiple weaker correlations were observed in the box C/D snoRNA category, and between box C/D snoRNA and transcripts coding proteins of the rRNA methylation complex. The expression of analyzed transcripts did not correlate with initial white blood count or with bone marrow blast percentage. Ribosome biogenesis upregulation with overexpression of FBL and NOP56, and CMYC was found in patients, who subsequently relapsed and the upregulation signature was not associated with known risk predictors.

Conclusions

This is the first report on the clinical aspect of ribosome biogenesis in pediatric BCP ALL and it shows that overexpression of CMYC and C/D box nucleoproteins FBL and NOP56 is an

antecedent event in patients, who subsequently relapse. The dysregulation pattern is different from the previous reports in acute myeloid leukemia, suggesting that dysregulation of ribosome biogenesis is specific for BCP ALL.

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood with incidence of 46.7 cases per million children under 15 years of age per year [1]. The ALL is a group of various subtypes with most common being the B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP ALL). Although majority of children with ALL are cured with chemotherapy, up to 20% patients succumb to the disease mostly due to resistant or relapsing leukemia [2]. From clinical perspective, the pediatric ALL is highly heterogeneous entity and early identification of patients with suboptimal response is necessary for therapy intensification.

Among the genes associated with leukemogenesis and clinical response in leukemia, those involved in ribosome biogenesis are promising ones that only start to emerge [3-8]. In addition, several studies reported that the high proliferation rate of tumor cells is sustained by an increased ribosome biogenesis due to hyper-activation of RNA polymerase I (RNA pol I) associated with an increase in protein synthesis [9]. This view is sustained by the recent discovery that inhibiting RNA pol I activity specifically kills cancer cells but not normal ones in lymphoma [10].

The ribosomes are essential machinery in all cells that translate mRNA into protein. Due to their conserved sequence, their analysis was helpful in establishing evolutionary relationships between different organisms [11]. Moreover, ribosomes showed a conserved structure through evolution that is the basis of the conserved intrinsic activity of the ribosome in the tree of life. In eukaryote, the ribosomes consist of a small subunit containing one 18S ribosomal RNA (rRNA) and 33 ribosomal proteins (RPS), and a large subunit comprised of the 28S, 5.8S and 5S rRNAs as well as 47 ribosomal proteins (RPL). Production of such complex ribonucleoprotein machinery takes place in the nucleolus and up to 4500 nucleolar factors have been identified so far [12]. Ribosome biogenesis requires fine regulation of rRNA synthesis using RNA pol I to give rise to a pre-rRNA, a step that is regulated by several factors, including nucleolin (NCL). Recent study reports that *NCL* is a marker of prognosis in AML [5]. The pre-rRNA is then subjected to numerous cleavages, specific folding and extensive nucleotide modifications, which are necessary to maintain the conserved ribosome structure and thus its intrinsic translational activity [13]. However, recent findings showed that alterations of rRNA chemical modifications occur during tumor initiation and tumor progression directly affecting the translation of some mRNAs coding oncogenes or tumor suppressors [14-18]. Among rRNA chemical modifications, the 2'-O-ribose methylation of rRNA is the most abundant one, representing more than 50% of rRNA chemical modifications. They are catalyzed by a box C/D

small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) complex that contains three proteins involved in snoRNP structuration and assembly (NOP56, NOP58, NHP2L1), one methyl-transferase (FBL) and one box C/D small nucleolar RNA (snoRNA or SNORD), which pairs with the target RNAs determining the specific nucleotide to modification [18-21]. About 250 different box C/D snoRNAs have been identified that are necessary to methylate the 106 rRNA sites at their 2'-O ribose residues. Several box C/D snoRNAs have been shown to promote leukemogenesis, including SNORD50 in T-ALL or SNORD35 in AML [3,6]. Although many snoRNAs and factors, which are involved in ribosome biogenesis, have been identified to be associated with leukemogenesis or clinical outcome in different leukemia types, no study has ever investigated their alteration of expression and their clinical value in pediatric BCP ALL. Here, we have investigated the significance of factors involved in ribosome biogenesis in the proliferative capacity and relapse propensity.

Material and methods

Human samples

The study group consisted of 28 consecutive children diagnosed with BCP ALL treated at Department of Pediatric Hematology and Oncology (Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland). The clinical characteristics of the analyzed group is presented in table 1. The patients were treated within the ALL IC-BFM 2009 study and according to biological and clinical factors were stratified into 3 chemotherapy arms - standard/intermediate/high risk groups [22]. The response to the initial 7 days long therapy with glucocorticosteroids, defined as good (PGR) with the blast count below 1000/ μ L or poor (PPR) with blast count \geq 1000/ μ L, was used as a stratification factor. During observation period 3 patients showed bone marrow relapse, and none of the studied patients died. The parents gave their written informed consent for the treatment and analysis of clinical data and the study was approved by the Bioethical Committee at Wroclaw Medical University.

RNA quantification by medium throughput RT-qPCR

Initial diagnostic bone marrow samples were collected and suspended in Trizol Reagent (Thermo Fisher Scientific) for frozen conservation. RNA purification was then performed by adding chloroform to separate nucleic acids from proteins, before precipitation using isopropanol and 70% ethanol wash. Reverse transcription was performed in duplicate using the PrimeScript RT kit (Takara). Briefly, 200 ng of total RNA were retrotranscribed into cDNA using a mix of two kind of primers: 2.5 μ M oligo dT primers for mRNAs, which contain polyA at their 3'-end; and 5 μ M random 6-mer primers, which allow reverse transcription of all RNAs, containing or not a poly-A, including mRNAs and snoRNAs. RNA expression levels of genes of

interest were finally quantified in triplicate by real-time PCR using the microfluidic medium-throughput BioMark HD System (Fluidigm). Using the 48.48 Dynamic Array™ IFC (Fluidigm), this system allows performing RT-qPCR on 48 samples by using up to 48 couples of primers. As recommended by the supplier, cDNA was subjected to an initial step of pre-amplification for 10 cycles using the PreAmp Master Mix (Fluidigm) and a mix of all the primers of interest to increase the quantity of initial cDNA matrices since each well of the 48.48 Dynamic Array™ IFC corresponds to only 6 nl. Residues of primers were then degraded by incubation with the Exonuclease I (NEB). Pre-amplified cDNAs were then 1:10 diluted in 1X TE buffer prior the addition of 1X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm) and 1X SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (BioRad). In parallel, 2.5 μM of each couple of primers was mixed with 1X Assay Loading Reagent (Fluidigm) and 1X DNA Suspension Buffer. After the priming of the 48.48 Dynamic Array™ IFC in the IFC controller to prepare the microfluidic system to receive fluids, samples and assays were loaded on the chip by the IFC controller using controlled pressure, this loading method improving the technical reproducibility of the RT-qPCR. The loaded 48.48 Dynamic Array™ IFC was then introduced in the BioMark system (Fluidigm) to measure fluorescent EvaGreen at each end of PCR cycle. Raw data were analysed using the Fluidigm Real-Time PCR Analysis software (Fluidigm).

Each couple of primers was introduced in triplicate to obtain 3 CT values per samples. In addition to CMYC, ten genes involved in the ribosome biogenesis were quantified: the 4 genes coding proteins involved in rRNA 2'-O-ribose methylation complex (FBL, NOP56, NOP58, NHP2L1); 5 C/D snoRNAs or SNORDs (SNORD35B, SNORD65, SNORD46, SNORD50A, SNORD38B); and 1 gene involved in rRNA synthesis (NCL). RNA quantification was first normalized using mean of 6 housekeeping genes (ACTIN, GAPDH, HPRT1, PPIA, PGK1, RNU6B) then using Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen) for inter- and intra-run normalization, respectively, to calculate the relative fold-change using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Expression of ribosome biogenesis factors and snoRNAs was presented as mRNA relative levels.

Statistical analysis

Statistical analysis and data presentation were performed with the computer software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Associations between the mRNA relative levels were analyzed using Spearman's rank correlation. The Mann-Whitney U test was applied for comparison of 2 groups, and Kruskal-Wallis test for 3 or more groups. Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method and the differences in leukemia-free survival (LFS), defined as time from diagnosis to relapse, were analyzed between subgroups using log-rank test. A p value less than 0.05 was considered significant.

Results

The values of the mRNA relative levels were first tested for correlation with peripheral blood absolute blast count and with bone marrow blast percentage, but no statistically significant results were observed. Results are presented in the table 2. The RNA levels of all analyzed

genes were analyzed and several two-by-two correlations were identified (table 3). To determine whether correlations occur between the different gene categories (i.e. box C/D snoRNAs, proteins involved in the rRNA methylation complex or rRNA synthesis), graphical representation of correlation data was drawn (figure 1). Correlations were observed within the box C/D snoRNA category, and separately in the group containing the mRNA transcripts of the genes encoding the C/D box snoRNPs and NCL. The strongest correlations were observed between NOP56, NOP58 and NCL. In addition, multiple weaker correlations were observed in the box C/D snoRNA category, and between box C/D snoRNA and transcripts coding proteins of the rRNA methylation complex. For example, the SNORD35B expression correlated with NOP56/NOP58/NCL expression, while the SNORD46/SNORD38B correlated in turn with SNORD35B.

mRNA relative levels of all transcripts were analyzed for correlation with initial peripheral blast count, initial marrow blast percentage and factors used to establish the different risk stratification groups (high, intermediate and standard risk groups) (figure 2). The RNA levels of the NOP58 were associated with risk stratification ($p=0.04$). The response to the initial steroid therapy was assessed as PGR (Prednisone Good Response) in 25 children and PPR (Prednisone Poor Response) in 3 children. The mRNA relative levels for all tested genes were compared between groups with PGR and PPR (figure 3). In the PGR group only the NOP56 RNA levels were lower ($p=0.03$).

During observation period, 3 patients relapsed- all in the intermediate risk group, and all showed PGR. We then evaluated the association of expression of ribosome biogenesis factors with later stage of the BCP ALL disease. The groups of patients who either remained in complete remission or relapsed were compared for the mRNA relative levels of analyzed transcripts (figure 4). Initial RNA levels of FBL, NOP56, CMYC, SNORD35B, ~~SNORD38B~~, and SNORD46 were significantly higher in the patients who subsequently experienced the leukemia relapse than in the ones who remain in complete remission. For each factor identified as significant (FBL, NOP56, CMYC, SNORD35B, and SNORD46), the patients were grouped based on the RNA levels – first group 1-3 Q – below the 3rd quartile, and the second – 4 Q – above the 3rd quartile only (figure 5). The survival analysis revealed inferior pLFS in the FBL, CMYC, SNORD35B, and SNORD46 4 Q groups (1-3 Q vs 4 Q, 100 vs 57%, $p=0.0011$), and in all relapsing patients the analyzed RNA levels were seen above the 3rd quartile.

Overall, these data show that expression of some ribosome biogenesis factors at diagnosis might be associated with patient relapse.

Discussion

The association between ribosomal dysregulation and tumorigenesis is indisputable, as proven by increased carcinogenesis risk in constitutional diseases caused by ribosomal gene mutations [23]. In T-ALL, the ribosome function is indeed deregulated through mutations in RPL genes, leading to impaired ribosome biogenesis and translational fidelity [26-28]. Homeostasis of ribosomal machinery thus appears crucial for the preservation of steadfast protein synthesis and there are observations, that during tumorigenesis, including leukemogenesis, these mechanisms are flawed.

Our research on expression of different ribosomal biogenesis factors in the analyzed BCP-ALL group showed multiple positive correlations between mRNA expression levels. The correlation of NOP56/NOP58/NCL points to common regulation mechanisms responsible for ribosome biogenesis dysregulation in leukemic cells. The upregulation of box C/D snoRNP components can be caused by the dysregulation of the intracellular genetic homeostasis enacted by upstream regulators like TP53 and CMYC, both of them reported as strong regulators of box C/D snoRNAs, and other proteins involved in the rRNA methylation complex [6,16,30,31].

Interestingly, we observed signature of ribosome biogenesis upregulation at initial diagnosis in BCP ALL patients, who subsequently relapsed. The increased expression levels of CMYC and the components of the rRNA methylation complex like FBL and NOP56 were identified in patients, despite that leukemic clone in 3 out of 3 children did not show PPR or resistance to chemotherapy with delayed remission. The role of FBL and NOP56 proteins can be pivotal in an enhancement of ribosomal biogenesis. The animal studies showed that FBL regulates stem cell pluripotency, and genes knockdown led to significant delays in rRNA processing, growth inhibition, and apoptosis [34]. Thus, the upregulation of FBL can protect leukemic cells from self-elimination and sustains mechanism leading to further evolution. FBL was shown to be responsible for the decrease in translational quality control in response to p53 inhibition [16]. The FBL overexpression promoted in vitro MCF7 breast cancer cells proliferation and protected cells from doxorubicin and was associated with poor survival in tumor patients [16]. The lack of correlation of RNA expression with peripheral blast count and tumor burden suggests, that the leukemic cells does not require upregulation of protein synthesis machinery to maintain massive proliferation. The increased initial peripheral blast count in ALL is considered an unfavorable prognostic factor and is included into the stratification of therapeutic protocol with

a chance of chemotherapy intensification. In the analyzed cohort, the NCL gene – direct enhancer of ribosomal production – was not overexpressed. The normal expression of NCL-1 in *C. elegans* is correlated with repression of rRNA synthesis and decreased cell, and loss of function mutations in nucleolin gene lead to increased protein and rRNA production with increased nematodes body size [35]. In AML, the mutations of NPM1 lead to loss of interaction with NCL protein contributing to leukemogenesis [36]. NCL was found to be overexpressed in AML blasts and high NCL mRNA expression level was associated with a poor overall survival, particular in elderly patients [5]. Prognostic role of the NCL expression was not identified in our cohort, and the NCL upregulation was not identifying the patients at risk of relapse, suggesting that the intensified chemotherapy in pediatric ALL can compensate for this effect.

Only the NOP56 RNA levels were significantly higher in PPR subgroup, but NOP56 RNA level did not affect LFS. Steroid resistance in ALL is only partially elucidated by presence of complex mechanisms related to intracellular expression of the glucocorticosteroid receptor itself, signaling pathways modulating its function and enzymes modifying the availability of its ligands [37-39].

This effect emphasizes complexity of leukemic transformation with multiple dysregulated mechanisms of cellular homeostasis.

Conclusions

This is the first report on the clinical aspect of ribosome biogenesis in pediatric BCP ALL, identifying the overexpression of the rRNA methylation complex components, FBL, NOP56, CMYC, and SNORD46 as an antecedent event in patients, who subsequently relapse. The results may suggest that analyzed ribosome biogenesis factor expression levels are not related to known initial risk predictors. Due to low number of analyzed patients the study can lack the power to identify all factors associated with leukemia relapse. In order to validate presented findings and to determine the value of ribosomal profiling as potential new risk factors, studies in larger groups are necessary. In conclusion, observed dysregulation pattern in BCP ALL is different from the reports in acute myeloid leukemia, suggesting a specificity in ribosome biogenesis defects in BCP ALL compared to other leukemias.

Figure 1. The correlations between mRNA relative levels of analyzed transcripts. The lines represent the values of Spearman's rank correlation coefficient.

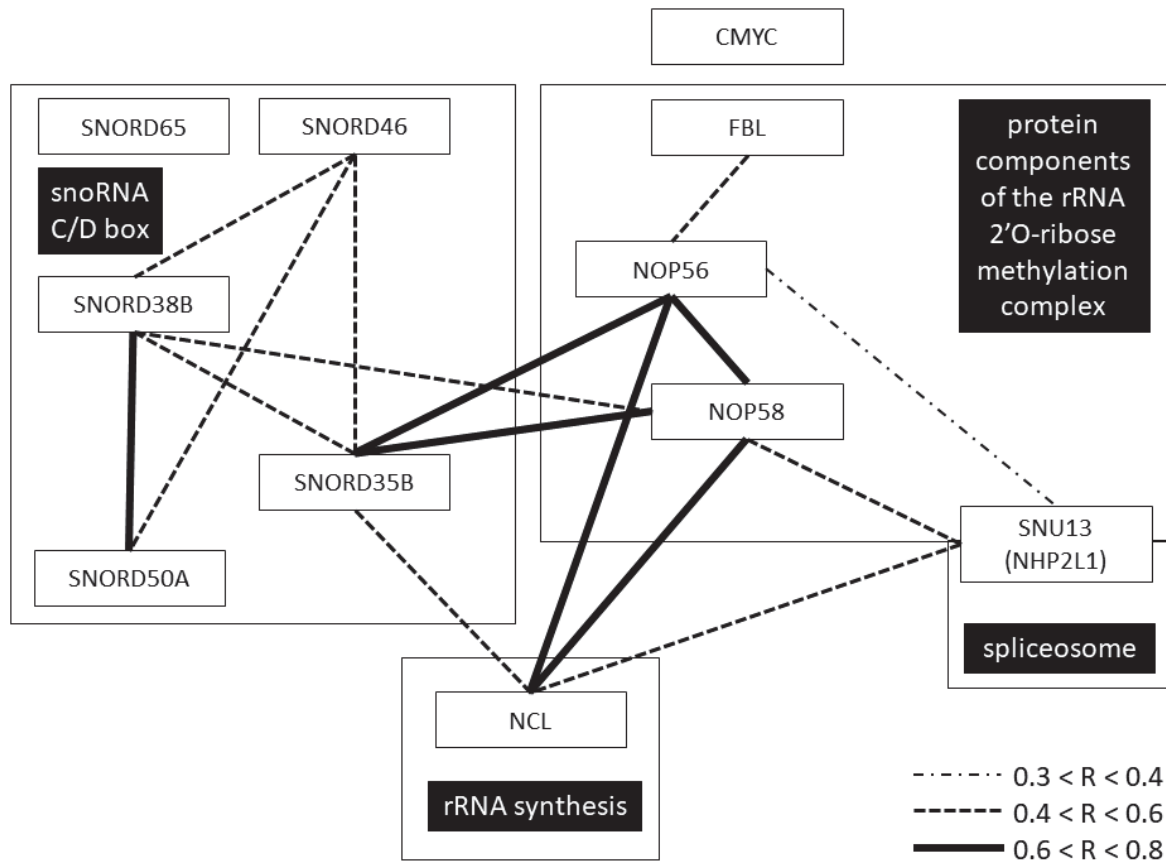


Figure 2. The mRNA relative levels of analyzed transcripts among patients within different risk stratification groups (HRG: high risk group; IRG: intermediate risk group; SRG: standard risk group). Bars and whiskers on the plot represent mean and SD. * - $p < 0.05$.

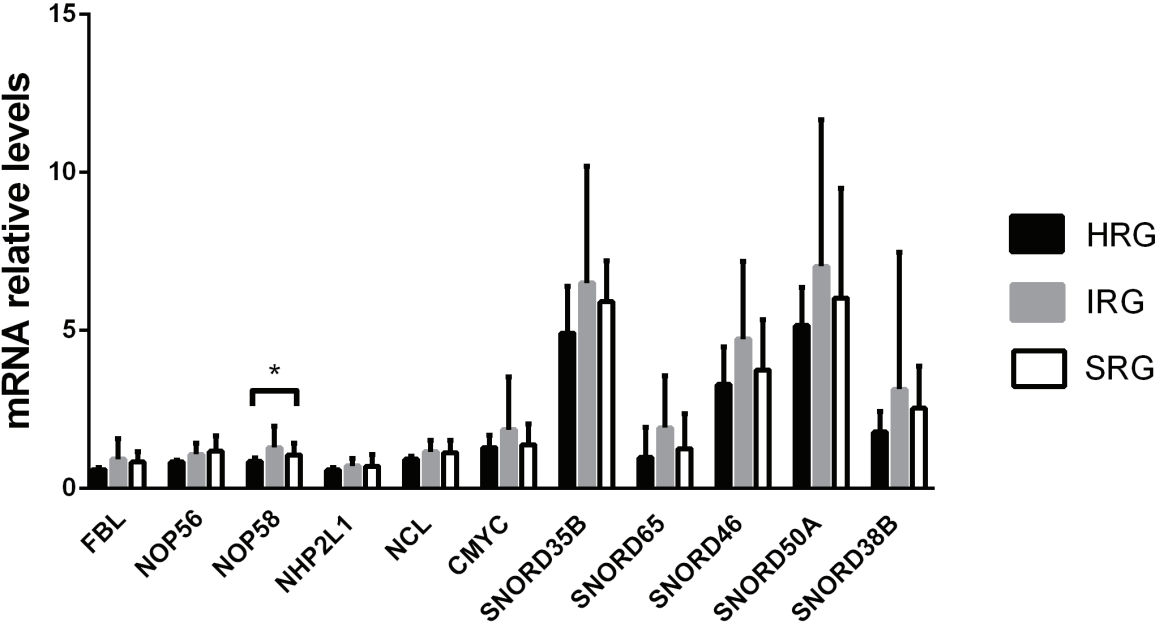


Figure 3. The RNA relative levels in patients with prednisone good-response (PGR), and prednisone poor-response (PPR). Bars and whiskers on the plot represent mean and SD. * - $p < 0.05$.

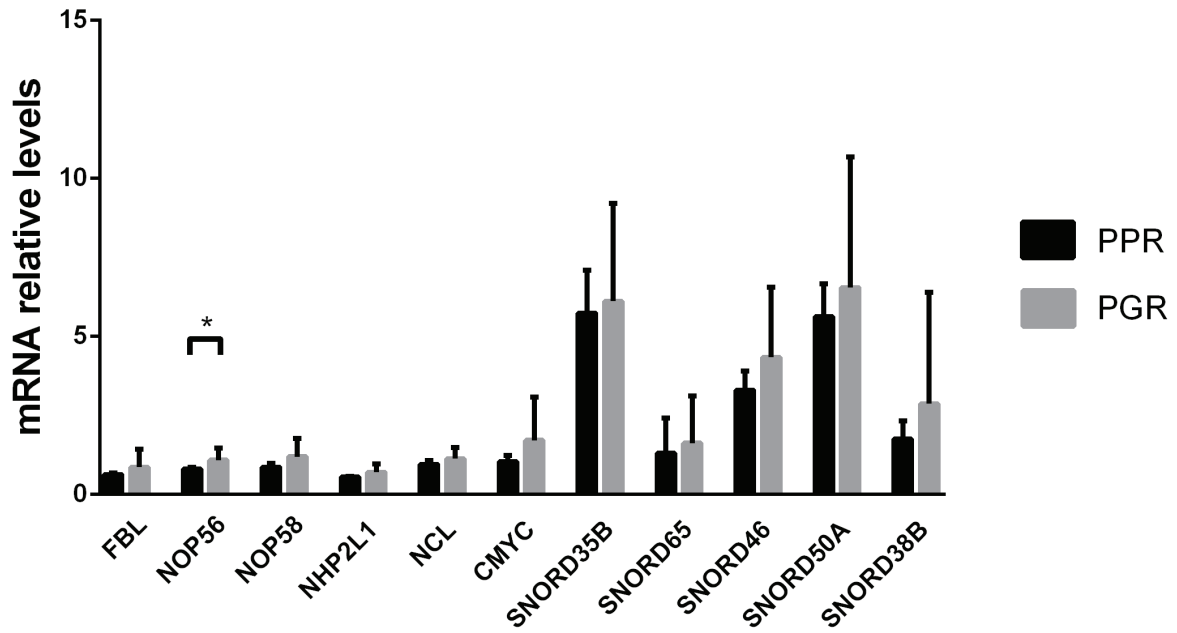


Figure 4. The mRNA relative levels at first diagnosis of analyzed transcripts between patients who maintained complete remission (CR) and those who relapsed. Bars and whiskers on the plot represent mean and SD. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$.

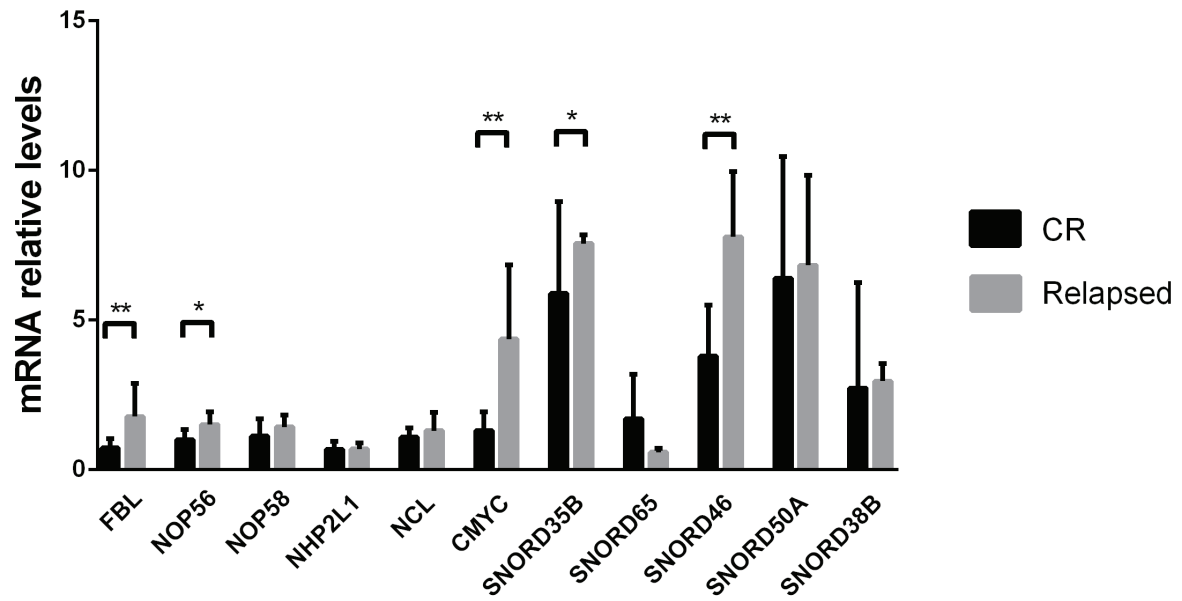
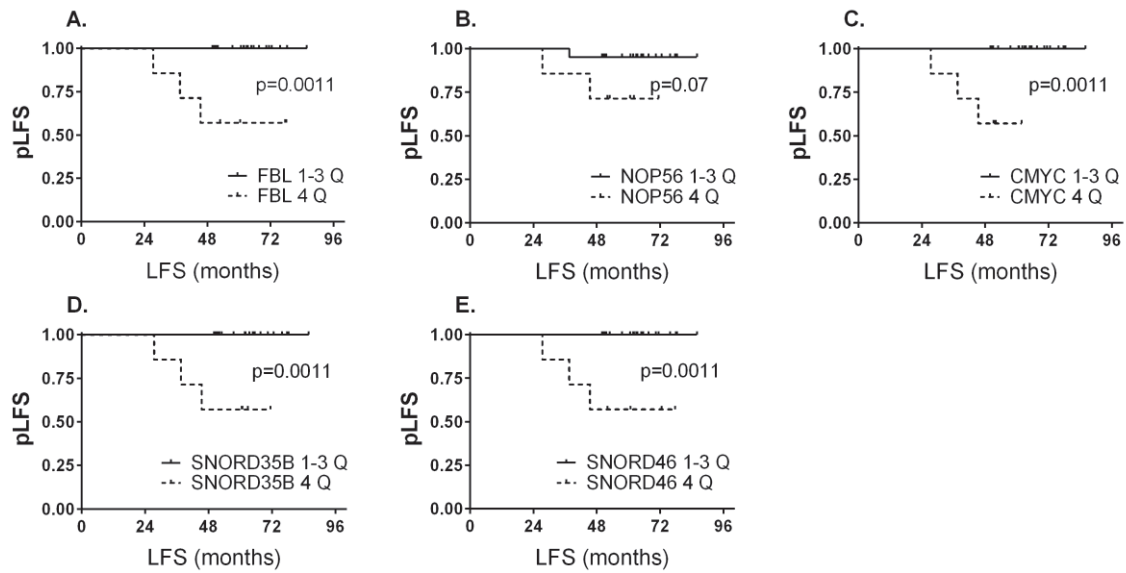


Figure 5. The probability of leukemia-free survival (pLFS) in the patients grouped according to RNA levels of FBL (A), NOP56 (B), CMYC (C), SNORD35B (D) , and SNORD46 (D). 1-3 Q – below 3rd RNA level quartiles, 4 Q – above the 3rd RNA level quartile.



3. Iron and hepcidin mediate human colorectal growth



Iron and hepcidin mediate human colorectal cancer cell growth

Journal:	<i>Endocrine-Related Cancer</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sornjai, Wannapa; Mahidol University Institute of Molecular Biosciences, Institute of Molecular Biosciences Nguyen Van Long, Flora; Université de Lyon, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon Pion, Nathalie; Université de Lyon, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon Pasquer, Arnaud; Hôpital Edouard Herriot, Chirurgie viscérale Saurin, Jean-Christophe ; Université de Lyon, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon Marcel, Virginie; Université de Lyon, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon Diaz, Jean-Jacques; Cancer Research Centre of Lyon, Cell Plasticity and Escape MERTANI, Hichem; Cancer Research Centre of Lyon, Cell Plasticity and Escape Smith, Duncan; Mahidol University Institute of Molecular Biosciences, Institute of Molecular Biosciences
Keywords:	hepcidin, colorectal cancer, iron

SCHOLARONE™
Manuscripts

1

2

Iron and hepcidin mediate human colorectal cancer cell growth

3

4

Wannapa Sornjai¹, Flora Nguyen Van Long², Nathalie Pion², Arnaud Pasquer², Jean-
Christophe Saurin², Virginie Marcel², Jean Jacques Diaz², Hichem C. Mertani^{2*} and Duncan

5

R. Smith^{1*}

6

7

8

¹ *Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, 25/25 Phuttamonthon Sai 4, Salaya,
Nakon Pathom, 73170 Thailand*

9

10

² *Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM 1052-CNRS 5286, Centre
Léon Bérard, Université Claude Bernard Lyon I, Université de Lyon, Lyon 69008 France*

11

12

13

*Correspondence should be addressed to:

14

Duncan R Smith, PhD, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya
Campus, 25/25 Phuttamonthon Sai 4, Salaya, Nakon Pathom, Thailand, 73170. Email:
duncan_r_smith@hotmail.com

15

16

OR

17

18

Hichem C. Mertani, PhD, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM
1052-CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Université Claude Bernard Lyon I, Université de
Lyon, Lyon France 69008. Email: hichem.mertani@lyon.unicancer.fr

19

20

21

Running head: Iron and hepcidin regulation of CRC cells

22

23

Keywords: Hepcidin, colorectal cancer, iron, proliferation, survival

24

25

Word count (Main text): 4,792

26

27

28 **Abstract**

29 High dietary iron intake is a risk factor for the development of colorectal cancer. However,
30 how iron subsequently impacts the proliferation of colorectal cancer cells remains unclear.
31 This study determined the expression of six iron regulatory genes in twenty-one human
32 colorectal cancer (CRC) biopsies and matched normal colonic tissue. The results show that
33 only *hepcidin* and *ferritin heavy chain* expression were increased in CRC biopsies as
34 compared to matched normal tissues. Four established human CRC cell lines, HT-29, HCT-
35 116, SW-620 and SW-480 were subsequently examined for their growth in response to
36 increasing concentrations of iron, and iron depletion. Real time cell growth assay showed a
37 significant inhibitory effect of acute iron loading in HCT-116 cells ($IC_{50} = 258.25 \mu M$ at
38 72h), and no significant effects in other cell types. However, ten week treatment with iron
39 significantly reduced HT-29 and SW-620 cell growth, whereas no effect was seen in HCT-
40 116 and SW-480 cells. Intracellular labile iron depletion induced the complete growth arrest
41 and detachment of all of the CRC cell types except for the SW-620 cell line which was not
42 affected in its growth. Treatment of starved CRC cells with hepcidin, the major regulator of
43 iron metabolism, induced a significant stimulation of HT-29 cell growth but did not affect the
44 growth of the other cell types. Collectively these results show that iron is central to CRC cell
45 growth in a manner that is not identical between acute and chronic loading, and that is
46 specific to the CRC cell type.

47

48

49

50

51 Introduction

52 Iron is an essential element for many biological activities and cellular processes as a
53 consequence of its characteristic that allows it to participate in oxidation-reduction reactions
54 (MacKenzie, et al. 2008). In humans and other species, iron supports protein formation by
55 complex interactions and is essential for enzymatic activity of ribonucleotide reductase,
56 NADH dehydrogenase, catalase, peroxidase and for the maturation of hemoglobin,
57 myoglobin and cytochrome. These proteins and enzymes are absolutely required for cell
58 proliferation, metabolism and growth (Crichton and Boelaert 2001). However, excess iron
59 also possesses the harmful property of generating highly reactive oxygen species (ROS) via
60 the Fenton reaction, inducing for example the formation of hydroxyl radicals from the
61 oxidation reaction between ferrous iron and hydrogen peroxide (Winterbourn 1995). These
62 free radicals may in some cases become toxic by induction of oxidative damage to lipids,
63 proteins and genomic DNA (Winterbourn 1995). DNA damage is associated with
64 tumorigenesis through enhanced genomic instability, chromosome rearrangements and
65 mutations of key tumor suppressor genes or proto-oncogenes (Dizdaroglu and Jaruga 2012).
66 Several studies have linked dysregulated iron metabolism to tumorigenesis (Wen, et al. 2014)
67 and have shown that supra physiological iron and increased ROS production could promote
68 tumorigenesis (Torti and Torti 2013).

69

70 According to GLOBOCAN 2012, colorectal cancer (CRC) is ranked as the second and third
71 cause of cancer in females and males respectively, and approximately 55% of the cases
72 occur in developed countries (Ferlay, et al. 2015). Increased iron levels in the diet,
73 associated with increased body iron stores, has been highlighted as a risk factor for human
74 CRC progression (Chua, et al. 2010; Nelson, et al. 1994; Xue and Shah 2013). Moreover,

75 both *in vitro* experiments and animal studies support the hypothesis that excess iron is
76 involved in the etiology of colorectal cancer (Padmanabhan, et al. 2015) and that
77 hemoglobin or its prosthetic group heme exert tumor initiating effects in human colonic cells
78 (Glei, et al. 2006). The hepcidin-ferroportin axis is a key regulator of systemic iron
79 homeostasis (Ganz and Nemeth 2011). Hepcidin is encoded by the *HAMP* gene on human
80 chromosome 19. This protein, which was initially characterized as antimicrobial peptide, is
81 also known as LEAP-1 protein, and it is found in both plasma and urine (Krause, et al. 2000;
82 Park, et al. 2001). Hepcidin binds to ferroportin protein (FPN1), the sole iron exporting-
83 protein on the cell membrane of iron-regulated cells (Abboud and Haile 2000; Donovan, et
84 al. 2000; McKie, et al. 2000). The binding induces internalization and degradation of
85 hepcidin-ferroportin complex leading to reduction of iron efflux to the plasma (Nemeth, et
86 al. 2004). The alteration of iron homeostasis via hepcidin-ferroportin has been actively
87 investigated in several cancers (Wu, et al. 2014), however, the precise role of iron regulation
88 in the pathogenesis of colorectal cancer is still unclear. Here, we sought to investigate the
89 contribution of iron regulators to human CRC cells and the role of iron and hepcidin in
90 mediating CRC cell growth. Gene expression of *hepcidin* and *ferritin heavy chain* were
91 increased in CRC biopsies as compared to matched normal tissues. Acute and chronic iron
92 loading were found to inhibit CRC cell growth in a cell-type specific manner and hepcidin
93 treatment was able to stimulate CRC cells also in a cell-type specific manner. Collectively
94 these findings demonstrate that regulation of iron metabolism is a potential target in human
95 CRC.

96

97

98

99 **Materials and Methods**

100 **Colorectal carcinoma samples**

101 Surgical samples were obtained at time of diagnosis from the Hepatogastroenterology
102 department of Edouard Herriot Hospital (Lyon, France) over the period of October 2010-June
103 2015 after obtaining individual informed consent and under hospital ethical approval from the
104 institutional review board in accordance with the Declaration of Helsinki. Based on the
105 American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system, CRC clinical samples were
106 derived from 4 patients classified as stage I, 10 patients classified as stage IIA, 5 patients
107 classified as stage IIIB, and two patients classified as stage IV. Normal matched tissue was
108 obtained from the macroscopically distinguishable non-tumorigenic area.

109

110 **CRC cell culture**

111 Four colorectal cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection,
112 namely HT-29 (HTB-38), HCT-116 (CCL-247), SW-620 (CCL-227) and SW-480 (CCI-228).
113 They were grown in DMEM 1X/Glutamax-1 (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10%
114 fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, Louis, MO) and 100 units/mL of
115 penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 37 °C with 5% CO₂. SW-480 and HT-29 cell
116 lines represent a differentiated phenotype with epithelioid morphology, whereas HCT-116
117 and SW-620 represent an undifferentiated mesenchymal phenotype with *in vivo* invasive
118 potential (Ahmed, et al. 2013a; Sack, et al. 2011).

119

120 **Chronic ferric ammonium citrate treatment**

121 CRC cell lines HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 cells were grown under standard
122 conditions with or without 100 µM ferric ammonium citrate (FAC; Sigma-Aldrich, Saint

123 Louis, MO). 80-90% confluent cells were passaged every 5 days and cells were continuously
124 grown with or without 100 μ M ferric ammonium citrate for 10 weeks.

125

126 **RNA extraction and cDNA synthesis**

127 CRC cells were lysed with 1 mL of TRIzol reagent (Life Technology, Inc., Cincinnati, OH).
128 Dissected colorectal tissues derived from colorectal cancer patients were crushed using an
129 RNase free pestle and lysed with 1 mL of TRIzol reagent. Total RNA was extracted
130 following the manufacturer's protocol. After that, 200 ng of total RNA was used as template
131 for RT-PCR. The cDNA was synthesized using 5 μ M random hexamers, 2.5 μ M oligo dT
132 primer in the presence of 1X PrimeScript buffer and PrimeScript RT enzyme mix I
133 (PrimeScript RT reagent kit; Takara Bio Inc., Shiga, Japan). Reactions were incubated at
134 37°C for 15 min and then terminated by incubation at 85°C for 5 sec.

135

136 **Real-time quantitative PCR**

137 The cDNA was used as a template for amplification using the LightCycler®480 SYBR green
138 I master kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and specific primers for
139 *hepcidin* (HAMP-f: 5'-CACAACAGACGGGACAACCTT-3' and HAMP-r: 5'-
140 TCCTTCGCCTCTGGAACA-3'), *ferroportin* (FPN1-f: 5'-
141 GGTTCTCACTTCCTGCTATATCC-3' and FPN1-r: 5'-
142 CTCCTGCAACAACAACAATCC-3'), *transferrin receptor 1* (TfR1-f: 5'-
143 TTTCCACCATCTCGGTCATC-3' and TfR1-r: 5'-GGGACAGTCTCCTTCCATATTC-3'),
144 *divalent metal transporter 1* (DMT1-f: 5'-CAGACATCAGAGAAGCCAACA-3' and
145 DMT1-r: 5'-CAAAGACAGCCATGACAAAGAG-3'), *ferritin heavy chain* (FtH-f: 5'-
146 CGTTTACCTGTCCATGTCTTACT-3' and FtH-r: 5'-TTTCTCAGCATGTTCCCTCTC-3'),

147 HFE (HFE-f 5'-CACCCCTAGTCATTGGAGTCATC-3' and HFE-r: 5'-
148 GAACCCTGCCTCTTCCTTAAT-3') and *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
149 (GAPDH-f: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' and GAPDH-r: 5'-
150 GCCCAATACGACCAAATCC-3').

151

152 The reaction was carried out in a Lightcycler480 Multiwell Plate 96 machine (Roche
153 Diagnostics). The amplification was performed with an initial 95 °C for 10 min, followed by
154 denaturation at 95 °C for 10 sec, annealing at 60 °C for 10 sec and extension at 72 °C for 10
155 sec until completed 45 cycles. Extracted RNA from human erythroid cells and Human
156 XpressRef Universal Total RNA (Qiagen, Hilden, Germany) were used as reference controls.
157 The relative expression level of iron regulatory genes in colorectal cancer cells was
158 calculated by the $2^{-\Delta CT}$ method ($\Delta CT = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}$).

159

160 **Colorimetric ferrozine-based labile iron assay**

161 CRC cells HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 were treated with various concentration of
162 ferric ammonium citrate (FAC) or deferoxamine (DFO) in 10% FBS DMEM 1X/Glutamax-1
163 for 24 h. After treatment, cells were lysed with 50 mM NaOH. The cell lysates were
164 incubated at room temperature with constant agitation for 2 h. After incubation, 100 μ l of
165 cell lysate was transferred into 96-well plate which contained 100 μ l of 10 mM HCl in each
166 well. The mixture was incubated with 30 μ L of iron detection reagent (ferrozine reagent) at
167 room temperature under dark conditions for 16 h, after which the absorbance was measured
168 at 562 nm. In this experiment, 0.5-6 ng/mL of FeCl₃ in 10 mM HCl was used as a standard.
169 Protein concentration of the cell lysates was measured using the Bradford assay. The labile
170 iron concentration was calculated as ng/mg protein.

171

172 Real-time cell growth analysis

173 Cell growth was determined using the xCELLigence real-time analysis (RTCA) system
174 (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA) which allows label-free and dynamic monitoring
175 of growth by measuring electrical impedance. CRC cell lines HT-29, HCT-116, SW-620 and
176 SW-480 were seeded into E-plates 16 at a density of 10^4 cells/well. This plate was inserted
177 into the xCELLigence station maintained in a humidified 37 °C incubator with 5% CO₂.
178 During incubation, the electrical impedance was monitored and measured every 15 min. After
179 24 h, cells were treated with various concentration of ferric ammonium citrate (FAC; Sigma)
180 or deferoxamine (DFO; Sigma). The electrical impedance was continuously monitored by
181 the RTCA-integrated software and presented as a cell index (CI) parameter providing
182 quantitative information about the density of growing cells. CI values curves were
183 normalized to the time point of FAC or DFO treatment and recorded for 4-6 days.

184

185 To determine the effect of hepcidin on colorectal cancer cell growth, HCT-29, HCT-116,
186 SW-620 and SW-480 cells were grown in an E-plate 16 in DMEM 1X/Glutamax-1
187 containing 10% FBS for 24 h. After that, cells were grown under a starvation condition by
188 incubation with FBS free DMEM 1X/Glutamax-1 for 24 h. Starved cells were then treated
189 with FBS free DMEM with or without 1 μM hepcidin peptide (Sigma-Aldrich). The
190 electrical impedance was continuously monitored for six days.

191

192 Statistical analysis

193 All experiments were performed as three independent biological replicates. Statistical
194 analysis was performed by using the XLStat software 2016.06.36781 (MS Excel). Data are

8

195 expressed as mean values \pm SEM. The expression of iron regulatory genes in clinical samples
196 and cell growth of CRC cells in different conditions were compared by two-independent
197 sample *t*-test. A *p* value of < 0.05 was considered to be a statistically significant difference.
198

For Review Only

199 **Results**200 **Expression of hepcidin and iron regulatory genes in CRC clinical samples**

201 To determine the expression of the *hepcidin* messenger RNA in colorectal cancer, 21 paired
202 clinical samples consisting of a portion of the resected tumour and matched adjacent normal
203 colonic tissue were examined. Based on the American Joint Committee on Cancer (AJCC)
204 staging system, specimens were derived from 4 patients classified as stage I, 10 patients
205 classified as stage IIA, 5 patients classified as stage IIIB, and two patients classified as stage
206 IV. Total RNA was extracted from all tissues and the expression of *hepcidin* was determined
207 by quantitative RT-qPCR. From the results (Figure 1A), *hepcidin* mRNA was detected in
208 38% (8 out of 21) of colorectal cancer tissue samples as compared to 29% (6 out of 21) of
209 normal matched colorectal tissue samples.

210

211 In order to further investigate iron regulation in colorectal cancer, the expression of the iron
212 regulatory genes *ferroportin* (FPN1), *transferrin receptor 1* (TFR1), *divalent metal*
213 *transporter 1* (DMT1), *ferritin heavy chain* (FtH) and *hemochromatosis* (HFE) was
214 investigated from the same CRC clinical samples. The results indicated that *FtH* mRNA was
215 significantly down-regulated in colorectal cancer samples (1.97 ± 1.12) when compared to
216 adjacent normal tissues (3.52 ± 2.36 ; p value = 0.022). *FPN1* mRNA expression was slightly
217 reduced in colorectal cancer specimens (0.0074 ± 0.0082) when compared to matched normal
218 tissues (0.0134 ± 0.0108 , p value = 0.137), but this did not reach statistical significance. The
219 expression of the other genes, *TFRI*, *DMT1* and *HFE* did not show significant difference
220 between colorectal cancer tissue and matched normal colonic tissue (Figure 1B).

221

222

223 **Expression of iron regulatory genes in CRC cell lines**

224 We examined the expression of iron transport regulatory genes in four CRC cell lines (SW-
225 620, SW-480, HT-29 and HCT-116). The cells were grown under standard conditions for 48
226 h, and the expression of *hepcidin*, together with that of *FPNI*, *TFRI* and *DMTI* was
227 determined by quantitative RT-qPCR. No expression of the *hepcidin* mRNA could be
228 detected in any of the four cell lines examined (data not shown), while expression of the iron
229 regulatory genes *FPNI*, *TFRI* and *DMTI* was detected in all four cell lines (Figure 2). The
230 level of expression of these genes was significantly lower in the four CRC cell lines as
231 compared to RNA extracted from day 10 erythroid cells (Sornjai, et al. 2016) or the
232 commercial mixed human reference RNA (Figure 2). Interestingly, the expression of *FPNI*
233 showed different levels of expression in the four CRC cell lines, with the highest expression
234 being observed in HT-29 cells, as compared to SW-620, HCT-116 and SW-480 cells. The
235 expression of *TFRI* and *DMTI* in HT-29 cells was also increased as compared to the other
236 CRC cell types to a 2-3 fold higher level (Figure 2).

237

238 **Ferric ammonium citrate-mediated CRC cell lines growth**

239 To determine the effect of iron on CRC cell growth, HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480
240 cells were grown in DMEM containing 10% FBS for 24 h. We first determined the level of
241 intracellular labile iron mobilized in each cell type cells following ferric ammonium citrate
242 (FAC) treatment at concentrations of 10, 50, 100, 200, 400 and 1000 μ M for 24 h in parallel
243 with untreated control cells. After incubation, the treated and untreated cells were collected
244 and labile iron was measured using a colorimetric ferrozine based assay as previously
245 described (Sornjai et al. 2016). Results indicate that the ratio of labile iron pool per protein
246 content was comprised between 2 ng/mg (HCT-116, SW-620) and 3 ng/mg (HT-29, SW-480)

247 with no significant differences between CRC cell types (Figure 3A). The ratio of labile iron
248 to protein cell content increased when cells were treated with concentrations of FAC above
249 10 μM (Figure 3A). FAC treatment at 50 μM significantly increased the labile iron pool only
250 in SW-620 as compared to control cells (Figure 3A), while the labile iron pool was
251 significantly increased in HCT-116 and SW-480 treated with 100 μM FAC or above, and in
252 HT-29 treated with 200 μM FAC or above.

253

254 We next analyzed the impact of FAC (50, 100, 200 and 400 μM) on CRC cell growth in real
255 time using the xCELLigence RTCA-DP instrument. The electronic impedance recorded
256 every 15 minutes is indicated as a cell index (CI) value and is positively correlated to cell
257 density (Figure 3B). CRC cells were treated with 50, 100, 200 or 400 μM FAC and the
258 growth monitoring was performed for 96 h and a normalized CI value at time of treatment
259 was calculated by the RTCA software and plotted as graph (Figure 3B). Statistical analysis
260 was performed on CI values at 24, 48 and 72 h after treatment, normalized against the CI
261 values at the treatment time points. All untreated CRC cell lines exhibited an exponential
262 growth until confluency was reached as indicated by a plateau of the CI value (Figure 3B).
263 Treatment of HT-29 cells with increasing concentrations of FAC did not significantly alter
264 their growth as compared to control (Figure 3B). The growth of SW-620 was significantly
265 decreased by 400 μM FAC treatment at 48 and 72 h (Figure 3B). SW-620 cell growth was
266 also reduced by 400 μM treatment with FAC at 24, 48 and 72h (Figure 3B). Interestingly,
267 HCT-116 cell line was the only one to exhibit a significant dose-dependent inhibition of cell
268 growth (IC_{50} : 258.25 μM at 72h) in response to increasing FAC treatment (Figure 3B).
269 These results show that acute treatment of CRC cells with high exogenous iron increases the

270 level of intracellular labile iron pool ultimately leading to a cell growth inhibition variable
271 according to the CRC cell types.

272

273 We next sought to determine whether chronic iron treatment would have a deleterious effect
274 on CRC phenotypic characteristics. Cells were grown in DMEM containing 10% FBS either
275 supplemented with or without 100 μ M ferric ammonium citrate for 10 weeks. The level of the
276 labile iron pool was then measured and the result showed that in the four CRC cell lines
277 chronically treated with iron, the labile iron pool was significantly increased as compared to
278 control cells (Figure 4). The effect of long term chronic iron treatment on CRC cell growth
279 was determined using the RTCA system. Chronically iron treated CRC cells were treated
280 either with or without 100 μ M ferric ammonium citrate and cell growth was analyzed for 6
281 days (Figure 5). Results (Figure 5) indicated that treatment of chronically iron-treated CRC
282 cells with 100 μ M FAC has an inhibitory effect in HT-29 and SW-620 cell types only. The
283 growth of HCT-116 and SW-480 was not altered by iron treatment (Figure 5). These results
284 suggest that chronic high iron exposure reduces the growth of some colorectal cancer cells,
285 but other cell types are relatively tolerant to the iron overload condition. To clarify the effect
286 of chronic iron overload on colorectal cancer cells, the expression level of iron regulatory
287 genes was investigated after 10 week of continuous cell culture with 100 μ M FAC. The
288 expression of iron transport and storage genes *FPN1*, *TFRI*, *DMT1* and *FtH* mRNA was
289 examined by RT-qPCR. The results (Figure 6) showed that expression of *FPN1*, *TFRI* and
290 *DMT1* was significantly down-regulated in all tested chronically iron treated cells, while *FtH*
291 mRNA expression was significantly up-regulated in all iron loaded cells as compared to the
292 untreated control cells. Thus CRC cells are capable to adapt to iron overload by decreasing

293 the expression of iron importer genes and increasing expression of iron storage genes (e.g.
294 *FtH*) in order to diminish the iron toxic effects.

295

296 **Effect of iron chelation on colorectal cancer cells**

297 We sought to determine the effect of iron deprivation on CRC cell growth by treating them
298 with deferoxamine (DFO) at 10, 50, 100, 200, 400 and 1,000 μM . The intracellular labile
299 iron pool was measured after 24 h of incubation. The result showed that labile iron level was
300 significantly depleted by 30-50% in HT-29, SW-620 and SW-480 cells when treated with 50-
301 1,000 μM DFO as compared to control cells, while in HCT-116 cells, the labile iron pool was
302 significantly reduced by 50% when they were incubated with 200-1,000 μM DFO as
303 compared to control cells (Figure 7A). These results indicate that deferoxamine is an
304 effective iron chelation agent that efficiently reduces the intracellular labile iron pool of CRC
305 cells.

306

307 Next, we determined the effects of iron chelation on cell growth using deferoxamine at 100
308 and 400 μM . HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 cells were grown on E-plate 16
309 containing 10% FBS, DMEM for 24 h, and either incubated with 10% FBS, DMEM as a
310 control or 100 and 400 μM of DFO in 10 % FBS, DMEM. Cell growth was monitored
311 further for 6 days (144 h) using the RTCA system as described above. The results obtained
312 indicate that iron chelation exerts a significant impact on four types of CRC cell growth
313 inhibition at both 100 and 400 μM DFO concentrations (Figure 7). The treatment with DFO
314 induced detachment and death of HT-29, SW-620 and SW-480 cells as indicated by the near
315 0 cell index that was attained between 5 and 6 days of treatment (Figure 7). In these three
316 CRC cell lines 100 and 400 μM exerted a similar growth-deleterious effect, but the 400 μM

317 concentration induced a strong stress-response that provoked a transient increase in the CI
318 (Figure 7). SW-620 cells exhibited a different growth response to DFO treatment as
319 compared to the other cell types, indeed, DFO at 100 and 400 μ M slowed down their growth
320 as compared to control cells, but did not induce their detachment and death (Figure 7) even
321 after 6 days of incubation (Figure 7).

322

323 **Effect of hepcidin on colorectal cancer cells**

324 To investigate the effect of hepcidin on colorectal cancer cell proliferation, HT-29, HCT-116,
325 SW-620 and SW-480 cells were grown in DMEM containing 10% FBS for 24 h in E-plate 16
326 plates. After that, all cells were maintained under starvation conditions by incubation with
327 FBS free DMEM for 24 h. The starved colorectal cancer cells were treated with FBS free
328 DMEM either supplemented with or without 1 μ M hepcidin. Labile iron levels of either
329 control or hepcidin treated colorectal cancer cells was determined after 24 h of hepcidin
330 treatment. The result showed there was no significant difference in labile iron levels as
331 compared between hepcidin treated colorectal cancer cells and control cells (Figure 8). The
332 effect of hepcidin on colorectal cancer cell proliferation was monitored for 144 h. From the
333 results (Figure 9), cell proliferation of hepcidin treated HCT-116, SW-620 and SW-480 cells
334 was somewhat greater than their corresponding untreated control cells, but the difference did
335 not reach statistical significance. Interestingly, hepcidin treatment had a significant effect on
336 increasing HT-29 proliferation as compared to the control untreated cells after 48 h of
337 treatment.

338

339

340

341 Discussion

342 The peptide hormone hepcidin is the master regulator of systemic iron homeostasis and is
343 predominantly produced by liver cells (Valore and Ganz 2008) under strict regulation of
344 circulating iron levels (Ganz and Nemeth 2011). Hepcidin exerts its biological function
345 through binding to the sole cellular iron exporter protein ferroportin, inducing its
346 internalization and degradation and leading to the reduction of iron efflux from cells to the
347 circulation (Abboud and Haile 2000; Donovan et al. 2000; McKie et al. 2000). Inhibiting
348 *FPN1* expression leads to reduced cellular iron export and sequestration of iron inside the cell
349 (Nemeth and Ganz 2006; Nemeth and Ganz 2009). Hepcidin expression has been reported in
350 non-liver cells (Donovan, et al. 2005; Zhang, et al. 2011), including cancer cells (Chen, et al.
351 2014; Zhang, et al. 2014). It has been shown that hepcidin represses the synthesis of
352 ferroportin protein in cancer cells (Pinnix, et al. 2010; Tesfay, et al. 2015; Zhang et al. 2014)
353 supporting its pro-oncogenic role associated with sequestration of iron within the tumor cells
354 to sustain cell growth (Wu et al. 2014). Thus, the dysregulation of the hepcidin-ferroportin
355 axis may induce tumor progression, but its implication in colorectal cancer is still poorly
356 understood. Therefore, we here determined the expression of *hepcidin* in biopsies of twenty-
357 one colorectal tumors and their normal adjacent mucosal tissue. The results showed that
358 *hepcidin* mRNA was expressed in 29% of normal colorectal tissue specimens and in 38% of
359 CRC clinical samples. A previous study has shown that *hepcidin* expression is detected in
360 9% of normal tissues and 34% of CRC samples (n=34) (Ward, et al. 2008) being consistent
361 with our results. These studies further implicate hepcidin in CRC progression possibly
362 through an autocrine/paracrine mechanism and could be associated with known upstream
363 hepcidin regulators. It has been reported that the plasma level of interleukin (IL)-6 (Chung
364 and Chang 2003; Knüpfers and Preiss 2010) and tumor *STAT3* expression (Lassmann, et al.

365 2007) are increased in CRC patients. IL-6 is a well-established activator of *hepcidin*
366 expression (Verga Falzacappa, et al. 2007; Wrighting and Andrews 2006). Heparin is also
367 regulated by bone morphogenic protein (BMP) which is known to be up-regulated in CRC
368 (Deng, et al. 2007). Recent studies on proteins involved in iron metabolism have shed new
369 light on the regulation of iron in CRC and iron regulatory proteins may play a vital role in
370 reprogramming iron homeostasis in cancer. In our study, the expression of iron regulatory
371 genes was investigated in colorectal cancer tissues. The results showed that *ferritin heavy*
372 *chain* mRNA is down-regulated in CRC as compared to normal tissues, while there was no
373 significant difference in *FPNI*, *TFR1*, *DMT-1* and *HFE* mRNA expression between tumor
374 and normal tissues. The decreased expression of *ferritin heavy chain* may be a consequence
375 of *c-myc* over-expression in CRC (Smith, et al. 1993) which has been identified as a repressor
376 of *ferritin-heavy chain* expression (Wu, et al. 1999). Iron content was previously shown to be
377 increased in CRC and the expression of some iron regulatory genes such as *DMT-1*, *duodenal*
378 *cytochrome b (DCYTB)* and *TfR1* was also increased, while the expression of others, such as
379 the *iron exporter gene HEPH* was decreased (Brookes, et al. 2006). Interestingly, increased
380 expression of *FPNI* was associated with abnormal localization of the protein within the
381 cytoplasm (Brookes et al. 2006).

382

383 As noted previously, iron is required for several biological processes linked to cell
384 proliferation. Here, we investigated the effect of iron on the growth of four different CRC
385 cell lines. Our data showed that although the intracellular labile iron pool was significantly
386 increased following iron treatment, there was no significant effect on cell growth. Only a high
387 concentration of iron (400 μ M) could significantly reduce HCT-116, SW-480 and SW-620
388 cell growth. These results indicate that intracellular iron has to reach a very high

389 concentration to stop cell growth possibly by inducing oxidative damage of proteins and
390 DNA as previously shown in the Caco-2 (Núñez, et al. 2001) and the HT-29 (Glei, et al.
391 2002) CRC cell lines. However, the opposite observation was found by Brookes and
392 colleagues who showed that iron treatment stimulated the proliferation of Caco-2 and SW-
393 480 cells (Brookes et al. 2006). Such discrepancy could be related to the modalities of iron
394 treatment, *i.e* acute *vs.* chronic, we thus sought to determine whether chronic iron treatment
395 would impact CRC cell growth. The results indicated differences in cell growth response
396 according to the specific CRC cell line examined. The HCT-116 and SW-480 CRC cells
397 maintained their normal growth under chronic iron treatment, while the growth of HT-29 and
398 SW-620 cells was decreased as compared to cells cultured in normal conditions. This
399 indicates that HCT-116 and SW-480 cells are well adapted to high iron condition consistent
400 with other reports (Brookes et al. 2006). To better understand this adaptation to chronic iron
401 we examined the expression of iron regulatory genes and we found increased expression of
402 the iron storage molecule *ferritin heavy chain messenger* RNA, and decreased expression of
403 iron importer genes *TFR1* and *DMT-1*. Interestingly, *FPN1* expression was also significantly
404 down-regulated in all chronic iron treated CRC cells, suggesting that down-regulation of
405 *FPN1* may help to retain iron inside the cells to support cell growth, while the down-
406 regulation of iron importer genes is a defense mechanism to limit excess iron uptake and
407 potential cell toxicity.

408

409 Cancer cells are more sensitive to iron deprivation than normal cells due to strict requirement
410 of iron for growth. This observation led many groups to investigate the role of iron chelators
411 as anti-tumor agents. Deferoxamine (DFO) is a well-known iron chelator that has been used
412 to ameliorate iron overload as well as to improve the quality of life of thalassemia patients

413 (Olivieri and Brittenham 1997). DFO is also known to inhibit cancer cell proliferation and to
414 induce apoptosis (Brard, et al. 2006; Fan, et al. 2001; Fukuchi, et al. 1994; Pahl, et al. 2001).
415 We here determined the effect of DFO on growth of colorectal cancer cells. Our result
416 showed that DFO treatment significantly reduced intracellular labile iron, and efficiently
417 inhibited the growth of the CRC cell lines HT-29, SW-480 and HCT-116 but had no effect on
418 SW-620 cell growth. This fact that SW-620 cell growth is not altered by iron chelators could
419 be related to the aggressive phenotype of SW-620 cell. This CRC cell line is derived from a
420 lymph node metastasis of a Dukes' stage C colorectal adenocarcinoma, and is more
421 metastatic than the HT-29, HCT-116 and SW-480 cell lines (Ahmed, et al. 2013b; Leibovitz,
422 et al. 1976). Such cell-specificity to iron presence needs to be further clarified before
423 developing efficient iron related chemotherapy in CRC cancers.

424

425 While DFO mediated depletion of intracellular iron content results in the inhibition of
426 colorectal cancer cells growth, the molecular mechanism is not understood. However, iron
427 depletion by a chelator is known to restrain the cell cycle by blocking iron access to
428 ribonucleotide reductase enzyme which is required for DNA synthesis (Richardson 2005), as
429 well as reducing the expression of cyclin D and inducing cell arrest (Nurtjahja-Tjendraputra,
430 et al. 2007). Another study has shown that DFO induces the up-regulation of growth arrest
431 and DNA damage (GADD) 45 α genes, a group of stress-response genes with functional roles
432 in cell cycle arrest and apoptosis (Saletta, et al. 2011). Furthermore, the iron chelators DFO
433 and Dp44mT have been shown to inhibit cancer metastasis through stabilization and
434 activation of NDRG1 expression which inhibit cancer progression (Chen, et al. 2012). Taken
435 together, the clinical use of iron chelators seems to be a potential therapeutic approach for

436 many cancers. Intensive studies on the specificity and molecular mechanism of these iron
437 chelators are now required.

438

439 Lastly, the effect of hepcidin hormone on CRC cell growth was examined under serum-
440 starved conditions. Based on the conventional *in vitro* culture system, colorectal cancer cells
441 were cultured under optimal conditions including amino acids, fetal bovine serum and
442 essential ions including iron. To determine precisely the effect of hepcidin alone on cell
443 growth, colorectal cancer cells were starved for 24 h and then treated with hepcidin hormone
444 in serum free media. The results indicate that hepcidin hormone alone can sustain cell
445 survival of HCT-116 and significantly maintain cell survival of HT-29 cells as compared to
446 control cells without hepcidin. On the other hand, this treatment showed no significant effect
447 on either SW-620 or SW-480 cells whose survival and growth in serum-free media were not
448 modified by hepcidin. Hepcidin effects on survival of HT-29 was correlated with high
449 expression of *FPNI* mRNA as compared to expression in the other cell types. As described
450 earlier, *FPNI* is an iron exporter protein and directly binds to hepcidin. Thus, our results
451 suggest that hepcidin treatment could induce *FPNI* degradation in HT-29 cells, inducing iron
452 sequestration inside the cells resulting in increased cell survival.

453

454

455

456

457

458

459

460

461 **Conflict of interest**

462 The authors declare no conflict of interest.

463

464 **Funding**

465 This work was supported by grants from La ligue Nationale Contre le Cancer, and the
466 Thailand Research Fund (BRG5780004; IRN58W0002). WS was supported by a Thai Royal
467 Golden Jubilee Ph. D. Research Scholarship (PHD/0101/2553) and the French Embassy in
468 Thailand.

469

470

471

472

473

474 **References**

- 475 Abboud S & Haile DJ 2000 A novel mammalian iron-regulated protein involved in
476 intracellular iron metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **275** 19906-19912.
- 477 Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE & Lothe
478 RA 2013a Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2**
479 e71.
- 480 Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknas M, Hektoen M, Lind GE & Lothe
481 RA 2013b Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2**
482 e71.
- 483 Brard L, Granai CO & Swamy N 2006 Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine
484 pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* **100** 116-
485 127.
- 486 Brookes MJ, Hughes S, Turner FE, Reynolds G, Sharma N, Ismail T, Berx G, McKie AT,
487 Hotchin N & Anderson GJ 2006 Modulation of iron transport proteins in human
488 colorectal carcinogenesis. *Gut* **55** 1449-1460.
- 489 Chen Q, Wang L, Ma Y, Wu X, Jin L & Yu F 2014 Increased hepcidin expression in non-
490 small cell lung cancer tissue and serum is associated with clinical stage. *Thorac Cancer* **5**
491 14-24.
- 492 Chen Z, Zhang D, Yue F, Zheng M, Kovacevic Z & Richardson DR 2012 The Iron Chelators
493 Dp44mT and DFO Inhibit TGF- β -induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Up-
494 Regulation of N-Myc Downstream-regulated Gene 1 (NDRG1). *Journal of Biological*
495 *Chemistry* **287** 17016-17028.
- 496 Chua AC, Kloplic B, Lawrance IC, Olynyk JK & Trinder D 2010 Iron: an emerging factor in
497 colorectal carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology* **16** 663-672.

- 498 Chung Y-C & Chang Y-F 2003 Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of
499 colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* **83** 222-226.
- 500 Crichton R & Boelaert JR 2001 *Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular*
501 *mechanisms to clinical consequences*: John Wiley & Sons.
- 502 Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W & Yang W-L 2007 Bone
503 morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes
504 migration and invasion of HCT116 cells. *Experimental Cell Research* **313** 1033-1044.
- 505 Dizdaroglu M & Jaruga P 2012 Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free*
506 *Radical Research* **46** 382-419.
- 507 Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut
508 B, Zapata A, et al. 2000 Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a
509 conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403** 776-781.
- 510 Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S & Andrews NC 2005 The
511 iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* **1**
512 191-200.
- 513 Fan L, Iyer J, Zhu S, Frick KK, Wada RK, Eskenazi AE, Berg PE, Ikegaki N, Kennett RH &
514 Frantz CN 2001 Inhibition of N-myc expression and induction of apoptosis by iron
515 chelation in human neuroblastoma cells. *Cancer Research* **61** 1073-1079.
- 516 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D &
517 Bray F 2015 Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major
518 patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **136** E359-E386.
- 519 Fukuchi K, Tomoyasu S, Tsuruoka N & Gomi K 1994 Iron deprivation-induced apoptosis in
520 HL-60 cells. *FEBS letters* **350** 139-142.

- 521 Ganz T & Nemeth E 2011 The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias
522 and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011** 538-542.
- 523 Glei M, Klenow S, Sauer J, Wegewitz U, Richter K & Pool-Zobel BL 2006 Hemoglobin and
524 hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary
525 human colonocytes. *Mutation Research* **594** 162-171.
- 526 Glei M, Latunde-Dada GO, Klinder A, Becker TW, Hermann U, Voigt K & Pool-Zobel BL
527 2002 Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell
528 line HT29 clone 19A. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental*
529 *Mutagenesis* **519** 151-161.
- 530 Knüpfer H & Preiss R 2010 Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients—a
531 summary of published results. *International Journal of Colorectal Disease* **25** 135-140.
- 532 Krause A, Neitz S, Mägert H-J, Schulz A, Forssmann W-G, Schulz-Knappe P & Adermann
533 K 2000 LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial
534 activity. *FEBS letters* **480** 147-150.
- 535 Lassmann S, Schuster I, Walch A, Göbel H, Jütting U, Makowiec F, Hopt U & Werner M
536 2007 STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-
537 inducible targets linked to cell survival and proliferation. *Journal of Clinical Pathology*
538 **60** 173-179.
- 539 Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC & Mabry ND 1976
540 Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research* **36**
541 4562-4569.
- 542 MacKenzie EL, Iwasaki K & Tsuji Y 2008 Intracellular iron transport and storage: from
543 molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **10** 997-
544 1030.

- 545 McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters
546 TJ, Farzaneh F, et al. 2000 A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1,
547 implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell* **5** 299-309.
- 548 Nelson RL, Davis FG, Sutter E, Sobin LH, Kikendall JW & Bowen P 1994 Body iron stores
549 and risk of colonic neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* **86** 455-460.
- 550 Nemeth E & Ganz T 2006 Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual Reviews of*
551 *Nutrition* **26** 323-342.
- 552 Nemeth E & Ganz T 2009 The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematologica* **122**
553 78-86.
- 554 Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T & Kaplan J
555 2004 Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its
556 internalization. *Science* **306** 2090-2093.
- 557 Núñez MT, Tapia V, Toyokuni S & Okada S 2001 Iron-induced oxidative damage in colon
558 carcinoma (Caco-2) cells. *Free Radical Research* **34** 57-68.
- 559 Nurtjahja-Tjendraputra E, Fu D, Phang JM & Richardson DR 2007 Iron chelation regulates
560 cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency-mediated growth
561 suppression. *Blood* **109** 4045-4054.
- 562 Olivieri NF & Brittenham GM 1997 Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia.
563 *Blood* **89** 739-761.
- 564 Padmanabhan H, Brookes MJ & Iqbal T 2015 Iron and colorectal cancer: evidence from
565 in vitro and animal studies. *Nutrition Reviews* **73** 308-317.
- 566 Pahl PM, Horwitz MA, Horwitz KB & Horwitz LD 2001 Desferri-exochelin induces death
567 by apoptosis in human breast cancer cells but does not kill normal breast cells. *Breast*
568 *Cancer Research and Treatment* **69** 69-79.

- 569 Park CH, Valore EV, Waring AJ & Ganz T 2001 Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide
570 synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry* **276** 7806-7810.
- 571 Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D'Agostino R, Kute T, Willingham MC, Hatcher H, Tesfay
572 L, Sui G, Di X, et al. 2010 Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression
573 and Prognosis. *Science Translational Medicine* **2** 43ra56-43ra56.
- 574 Richardson DR 2005 Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron
575 chelators for the treatment of cancer. *Current Medicinal Chemistry* **12** 2711-2729.
- 576 Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Kobelt D, Lemm M, Fichtner I, Schlag PM,
577 Shoemaker RH & Stein U 2011 Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-
578 mediated metastatic progression in colon cancer. *Journal of the National Cancer*
579 *Institute* **103** 1018-1036.
- 580 Saletta F, Rahmanto YS, Siafakas AR & Richardson DR 2011 Cellular iron depletion and the
581 mechanisms involved in the iron-dependent regulation of the growth arrest and DNA
582 damage family of genes. *Journal of Biological Chemistry* **286** 35396-35406.
- 583 Smith DR, Myint T & Goh HS 1993 Over-expression of the c-myc proto-oncogene in
584 colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer* **68** 407-413.
- 585 Sornjai W, Jaratsittisin J, Khungwanmaythawee K, Svasti S, Fucharoen S, Lithanatudom P &
586 Smith DR 2016 Dysregulation of ferroportin gene expression in beta(0)-thalassemia/Hb
587 E disease. *Annals of Hematology* **95** 387-396.
- 588 Tesfay L, Clausen KA, Kim JW, Hegde P, Wang X, Miller LD, Deng Z, Blanchette N,
589 Arvedson T, Miranti CK, et al. 2015 Hepsidin regulation in prostate and its disruption in
590 prostate cancer. *Cancer Research* **75** 2254-2263.
- 591 Torti SV & Torti FM 2013 Iron and cancer: more ore to be mined. *Nature Reviews Cancer* **13**
592 342-355.

- 593 Valore EV & Ganz T 2008 Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is
594 mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Molecules and Disease* **40**
595 132-138.
- 596 Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW & Muckenthaler
597 MU 2007 STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory
598 stimulation. *Blood* **109** 353-358.
- 599 Ward DG, Roberts K, Brookes MJ, Joy H, Martin A, Ismail T, Spychal R, Iqbal T & Tselepis
600 C 2008 Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis. *World Journal of*
601 *Gastroenterol* **14** 1339-1345.
- 602 Wen CP, Lee JH, Tai YP, Wen C, Wu SB, Tsai MK, Hsieh DP, Chiang HC, Hsiung CA, Hsu
603 CY, et al. 2014 High serum iron is associated with increased cancer risk. *Cancer*
604 *Research* **74** 6589-6597.
- 605 Winterbourn CC 1995 Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction.
606 *Toxicology Letters* **82** 969-974.
- 607 Wrighting DM & Andrews NC 2006 Interleukin-6 induces hepcidin expression through
608 STAT3. *Blood* **108** 3204-3209.
- 609 Wu KJ, Polack A & Dalla-Favera R 1999 Coordinated regulation of iron-controlling genes,
610 H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* **283** 676-679.
- 611 Wu XN, Su D, Wang L & Yu FL 2014 Roles of the hepcidin-ferroportin axis and iron in
612 cancer. *European Journal of Cancer Prevention* **23** 122-133.
- 613 Xue X & Shah Y 2013 Intestinal Iron Homeostasis and Colon Tumorigenesis. *Nutrients* **5**
614 2333.

615 Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T & Rouault TA 2011 Hepcidin
616 regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts.
617 *Blood* **118** 2868-2877.

618 Zhang S, Chen Y, Guo W, Yuan L, Zhang D, Xu Y, Nemeth E, Ganz T & Liu S 2014
619 Disordered hepcidin–ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cellular*
620 *Signalling* **26** 2539-2550.

621

622

623

624

625

626

627

628

For Review Only

629 **Figure legends**

630 **Figure 1. Hepcidin and iron regulatory genes expression in colorectal cancer tissues**

631 Colorectal tumor specimens (black bars) and adjacent normal colorectal tissues (white bars)
632 were collected from surgical resection of 21 colorectal cancer patients (P1-P21). Total RNA
633 was extracted and the expression of (A) hepcidin and (B) iron regulatory genes was
634 quantitated by RT-qPCR. The hepcidin expression level is presented as mean of $1/dCt$ ($dCt =$
635 $Ct_{HAMP} - Ct_{GAPDH}$). The expression level of iron regulatory genes was normalized against
636 GAPDH and data is shown as a relative expression ratio. Black lines represent mean of the
637 relative expression level and error bars represent SEM (*; p value < 0.05).

638

639 **Figure 2. The expression level of iron regulatory genes in colorectal cancer cell lines**

640 Colorectal cancer cell lines SW-620, SW-480, HT-29 and HCT-116 were grown in DMEM
641 containing 10% FBS for 48 h. The mRNA expression level of iron regulatory genes FPN1,
642 TFR1 and DMT1 were quantitated by RT-qPCR. The mRNA expression was normalized
643 against GAPDH and is presented as a relative expression ratio. The extracted RNA from day
644 10 erythroid cells (Erythroid) and mixed human RNA (Reference RNA) were used as a
645 controls. Error bars represent SEM (***) p value < 0.001 .

646

647 **Figure 3. Real-time cell analysis of colorectal cancer cell growth during ferric**
648 **ammonium citrate treatment**

649 (A) Colorectal cancer cell lines HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 were incubated with
650 various concentration of ferric ammonium citrate (FAC) for 24 h. Labile iron level was
651 measured using a colorimetric-ferrozine based assay. Error bars represent SEM. Labile iron
652 level of FAC treated cells were compared to control (*; p value < 0.05 , **; p value < 0.01 and

653 ***; p value < 0.001). **(B)** Cells were plated on E-plate 16 for 20-24 h and then were treated
654 with various concentration of ferric ammonium citrate (FAC). Cell index was monitored by
655 an xCELLigence RTCA system for a total of 96 h. Cell index at each time point was divided
656 by cell index value at time of FAC treatment (black line) and is presented as a normalized
657 cell index. The X-axis represents the incubation time, while the Y-axis represents a
658 normalized cell index value. Graphs present a representative experiment which was
659 performed independently in triplicate ($n=3$). The mean of the normalized cell index value is
660 plotted as bar graph of triplicates at 24, 48 and 72 h. Error bars represent SD (*; p value <
661 0.05 and **; p value < 0.01).

662

663 **Figure 4. Level of labile iron in colorectal cancer cells after chronic iron treatment**

664 Colorectal cancer cells were grown and subcultured either with (gray bars) or without (white
665 bars) 100 μ M ferric ammonium citrate (FAC) for 10 weeks. Labile iron level was measured
666 using colorimetric-ferrozine based assay. Error bars represent SD (*; p value < 0.05, **; p
667 value < 0.01 and ***; p value < 0.001).

668

669 **Figure 5. Real-time cell analysis of colorectal cancer cell growth after chronic iron 670 exposure**

671 HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 were grown and subcultured either with or without
672 100 μ M ferric ammonium citrate (FAC) for 10 weeks. These cells were plated on E-plate 16.
673 At 24 h, control cells (red line) were treated with 10% FBS DMEM while chronic iron treated
674 cells (green line) were treated with 10% FBS DMEM containing 100 μ M of FAC. Cell index
675 was monitored by xCELLigence RTCA system. Cell index at each time point was divided by
676 cell index value at time of treatment (black line) and is presented as a normalized cell index.

677 X-axis represents the incubation time, while Y-axis represents a normalized cell index value.
678 Graphs presents a representative experiment which was performed in triplicate (n=3). Mean
679 of normalized cell index value is plotted as bar graph. White and gray bars represent control
680 and chronic exposed cells, respectively. Error bars represent SD (*; p value < 0.05, **; p
681 value < 0.01).

682

683 **Figure 6. The expression level of iron regulatory genes in colorectal cancer cells after**
684 **chronic iron exposure**

685 The colorectal cancer cell lines HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 were grown and
686 subcultured in 10% FBS DMDM either with or without 100 μ M ferric ammonium citrate
687 (FAC) for 10 weeks. The expression of iron regulatory genes; FPN1, TFR1, DMT1 and FtH
688 was determined by RT-qPCR. The mRNA expression was normalized against control and is
689 presented as a fold change. White bars and gray bars represent control and chronic iron
690 exposed cells, respectively. Error bars represent SEM (*; p value < 0.05, **; p value < 0.01
691 and ***; p value < 0.001).

692

693 **Figure 7. Real-time cell analysis of colorectal cancer cell growth during iron chelator**
694 **treatment**

695 (A) Colorectal cancer cell lines HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 were incubated with
696 various concentration of deferoxamine (DFO) for 24 h. Labile iron level was measured using
697 a colorimetric-ferrozine based assay. Error bars represent SEM. Levels of labile iron of
698 DFO treated cells were compared to control. The colorectal cancer cells HT-29, HCT-116,
699 SW-620 and SW-480 were plated on E-plate 16 for 20-24 h. Then, cells were treated with
700 100 and 400 μ M of deferoxamine (DFO). (B) Cell index was continuously monitored by
701 xCELLigence RTCA system for 144 h. Cell index at each time point was divided by cell

702 index value at time of DFO treatment (black line) and presented as normalized cell index. X-
703 axis represents an incubation time, while Y-axis represents a normalized cell index value.
704 Graphs show a representative experiment which was performed in triplicate (n=3). Mean of
705 normalized cell index value is plotted as bar graph of triplicates after DFO treatment at 24, 48
706 and 72 and 96 h. Error bars represent SD (*; p value < 0.05, **; p value < 0.01, ***; p value
707 < 0.001).

708

709 **Figure 8 Labile iron level of colorectal cancer cells after hepcidin treatment**

710 Colorectal cancer cell lines were grown in 10% FBS DMEM for 24 h. These cells were
711 maintain under starvation conditions for 24 h and were then incubated in FBS free DMEM
712 containing with (gray bars) or without (white bars) 1 μ M hepcidin peptide for 24 h. Labile
713 iron level was measured using colorimetric-ferrozine based assay. Error bars represent SD.

714

715 **Figure 9. Real-time cell growth analysis**

716 The colorectal cancer cell lines HT-29, HCT-116, SW-620 and SW-480 were plated on E-
717 plate 16 for 24 h. Then, cells were starved by incubation with FBS free DMEM (SF line) for
718 24 h. After that, cells were treated either with (green line) or without (red line) 1 μ M
719 hepcidin in FBS free DMEM media. Cell index was continuously monitored by
720 xCELLigence RTCA system for 144 h. Cell index at each time point was divided by cell
721 index value at time of hepcidin treatment (Hepcidin line) and is presented as normalized cell
722 index. X-axis represents an incubation time, while Y-axis represents a normalized cell index
723 value. This experiment was performed in triplicate (n=3). Mean of normalized cell index
724 value is plotted as bar graph of triplicates after hepcidin treatment at 24, 48 and 72 and 96 h.

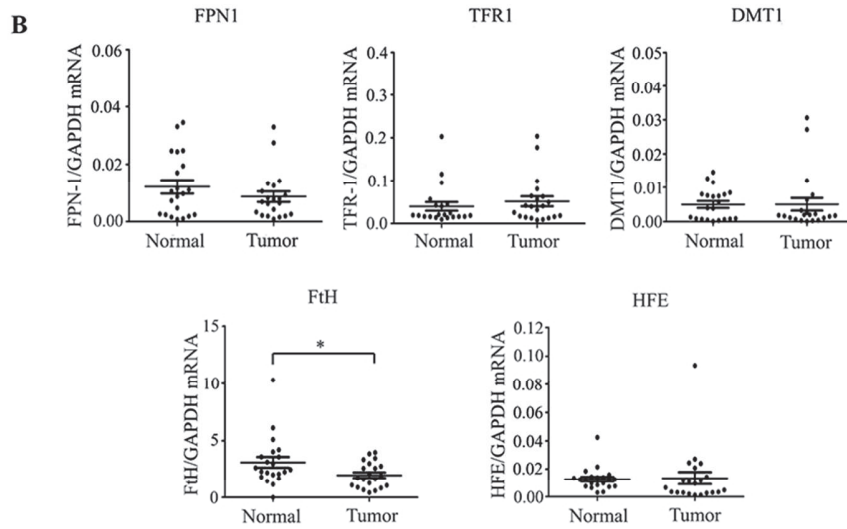
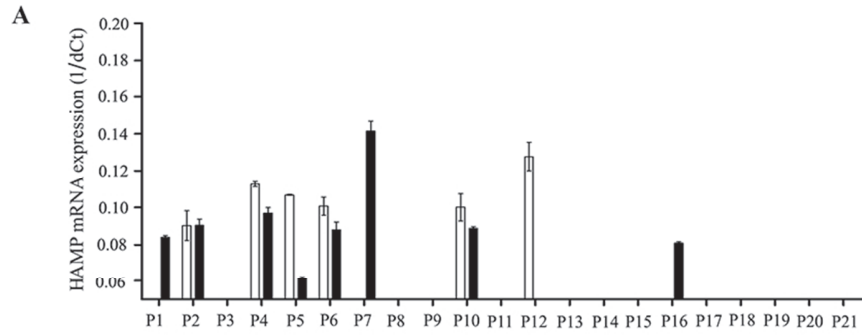
725 White and gray bar represent control and hepcidin treated cells, respectively. Error bars

726 represent SD (*; p value < 0.05).

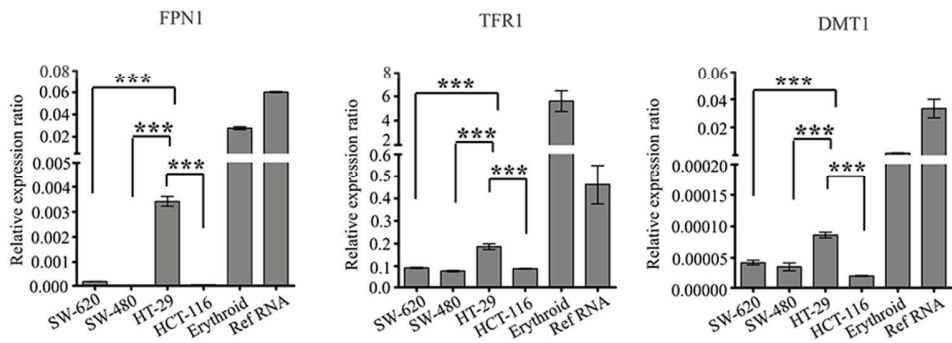
727

728

For Review Only

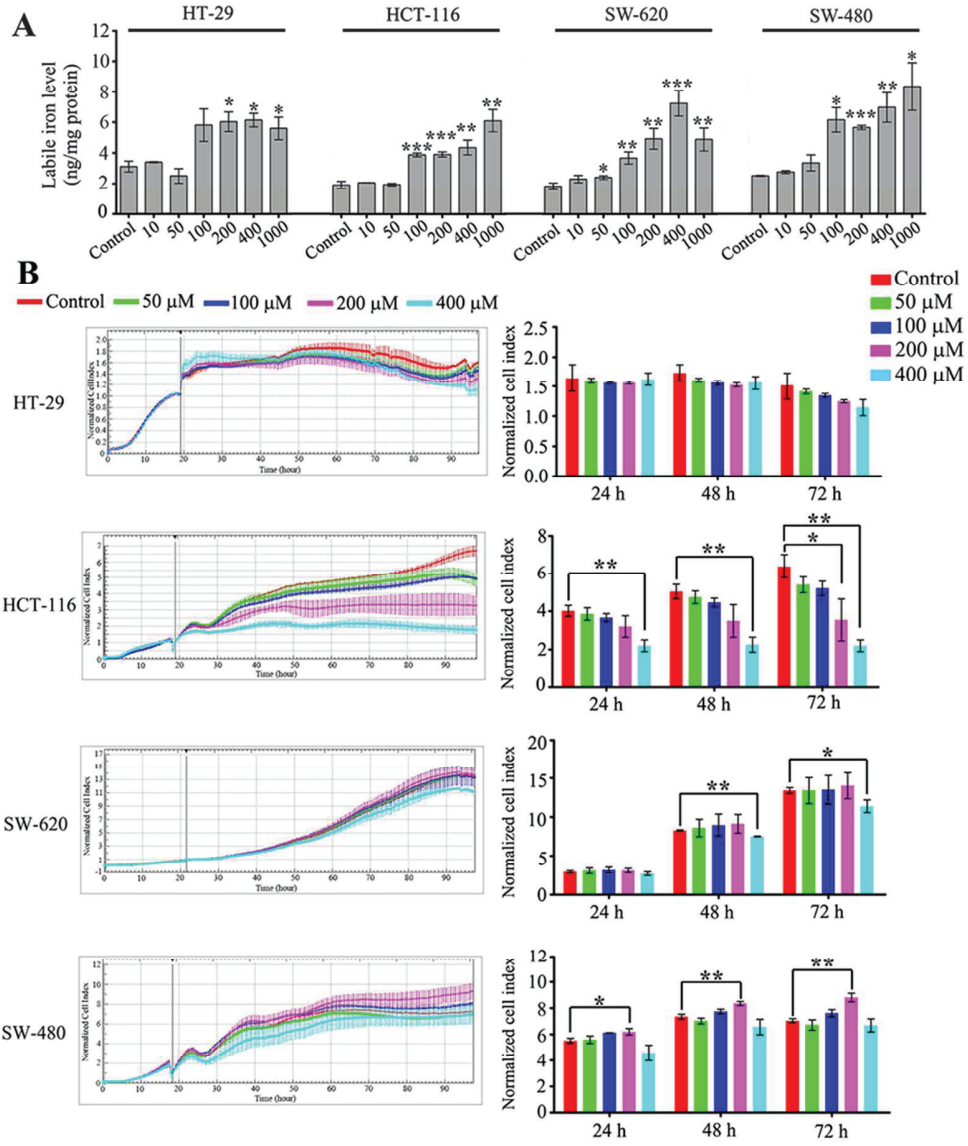


80x81mm (300 x 300 DPI)

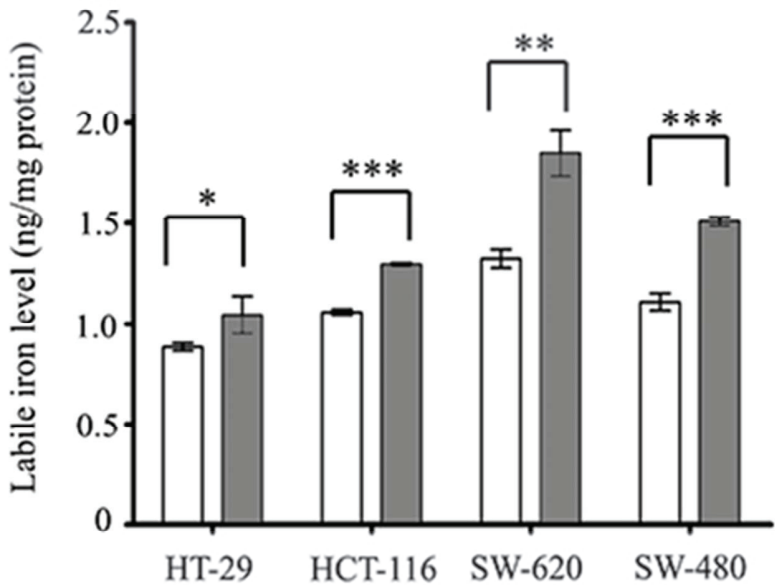


80x32mm (300 x 300 DPI)

Review Only

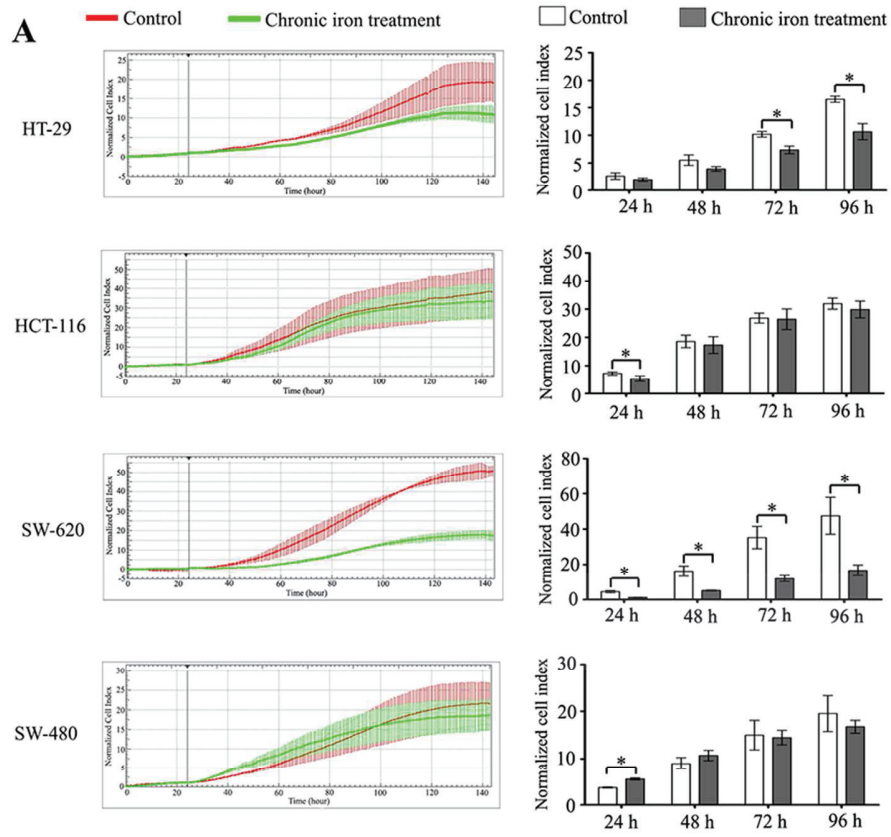


80x94mm (300 x 300 DPI)



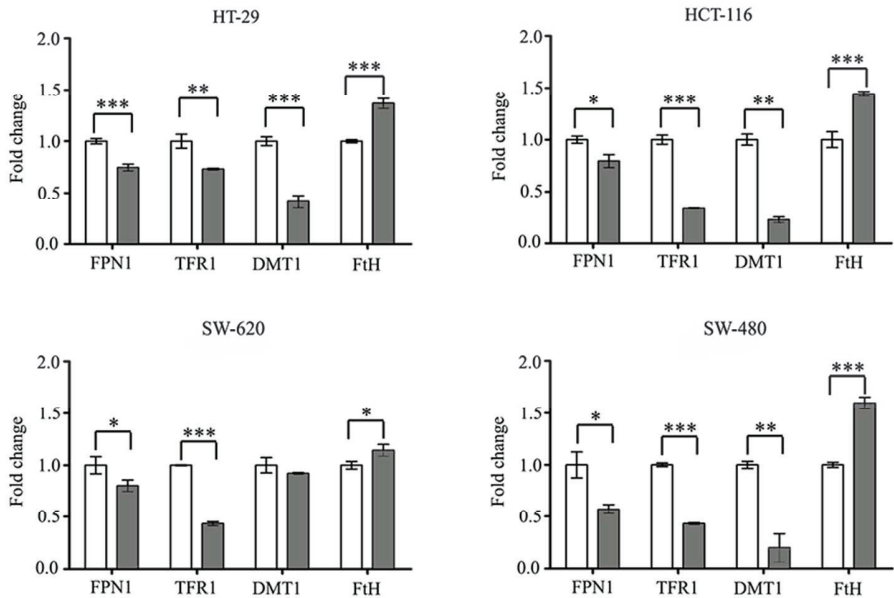
50x37mm (300 x 300 DPI)

Only

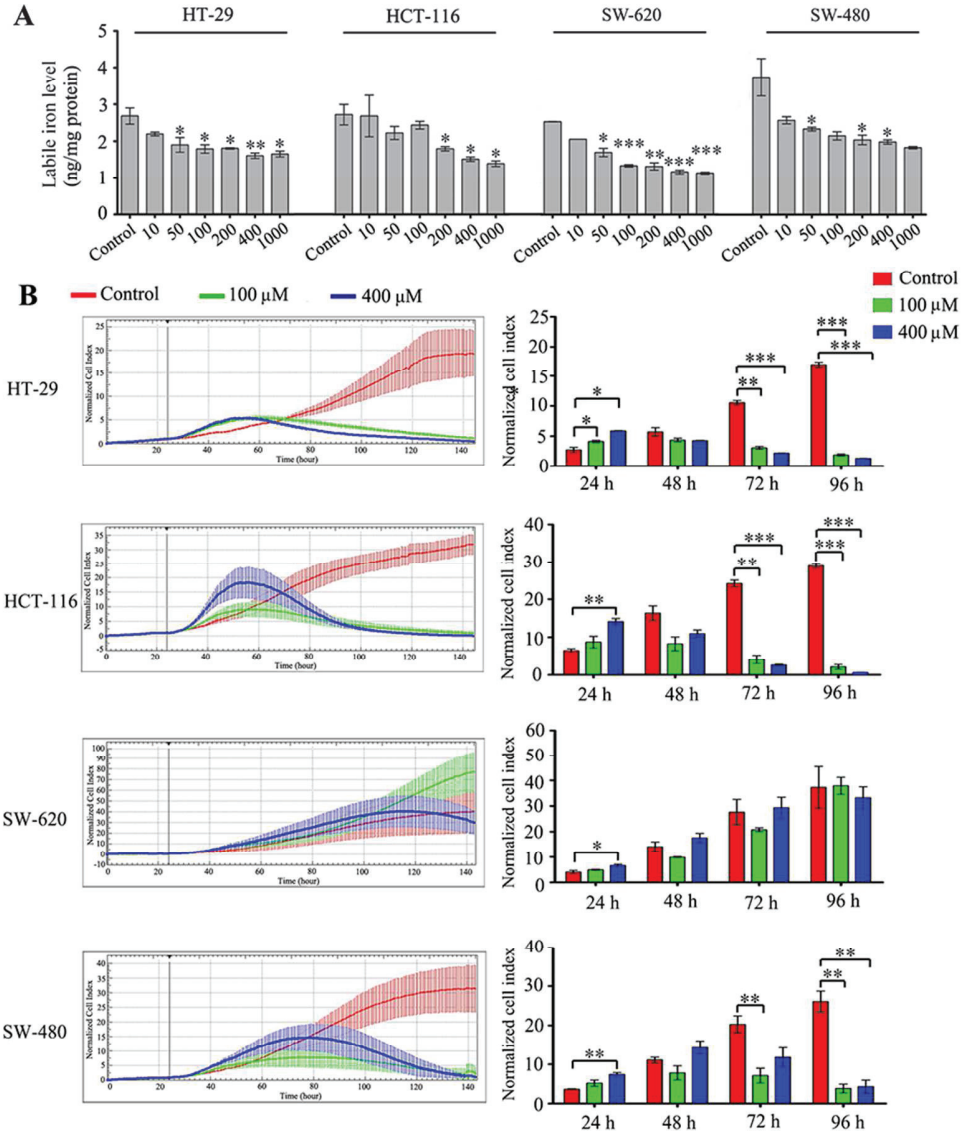


80x71mm (300 x 300 DPI)

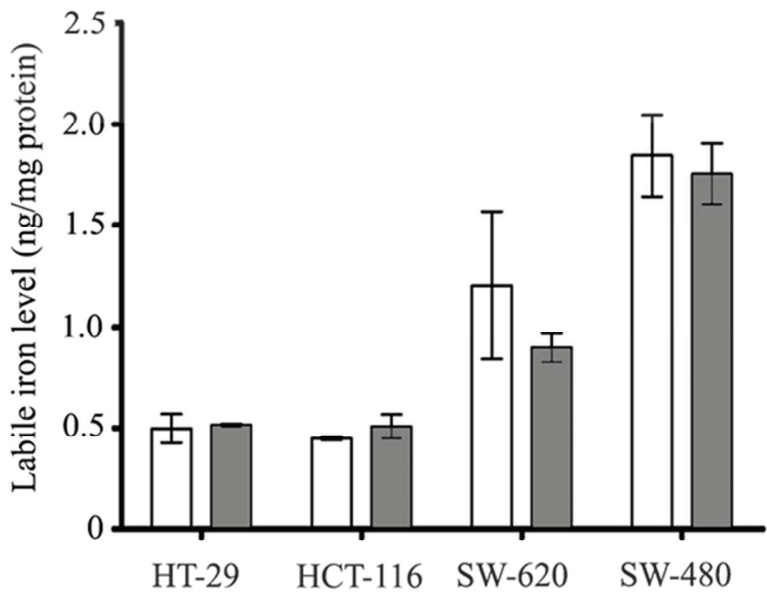




80x51mm (300 x 300 DPI)

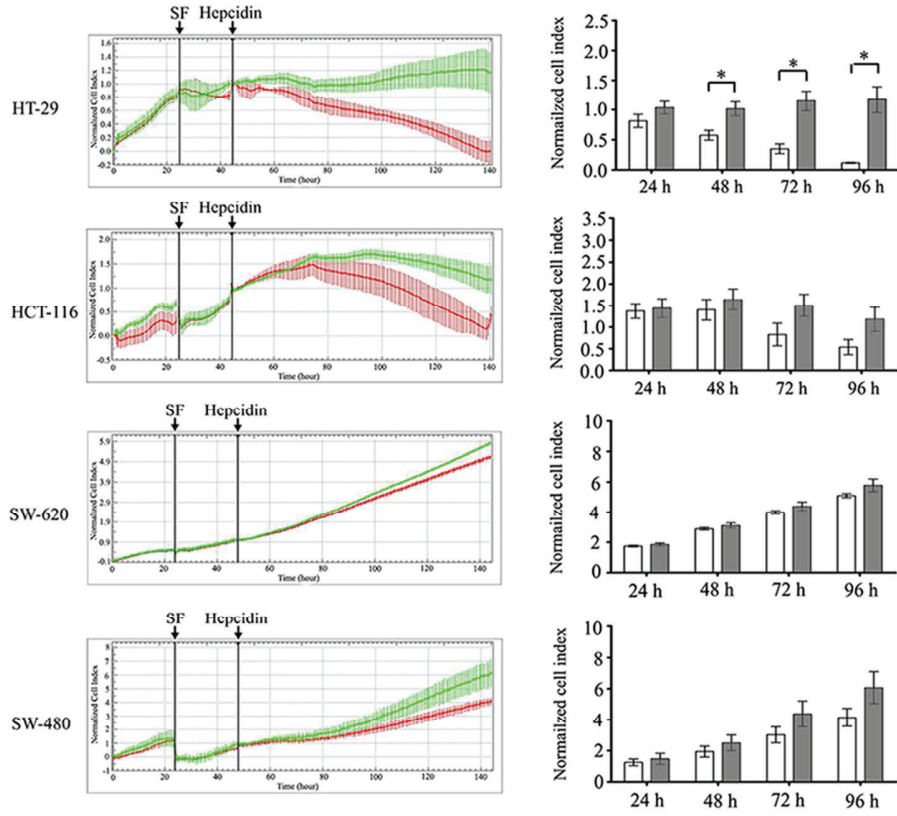


80x95mm (300 x 300 DPI)



60x44mm (300 x 300 DPI)

Only



99x85mm (300 x 300 DPI)

II. Liste des communications orales et posters

1. Communications orales

- **Juin 2018** – Poster teaser à la 5^{ème} journée scientifique du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon.
Variation of ribosome composition and translational reprogramming during human mammary Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Villeurbanne, France.
- **Avril 2018** – Short presentation (Sessions Rapid Fire) au Forum de la Recherche en Cancérologie Rhône-Alpes Auvergne. *Variation of ribosome composition and translational reprogramming during human mammary Epithelial-to-Mesenchymal Transition.* Villeurbanne, France.
- **Juil 2017** – Présentation à la retraite de département « Plasticité des Cellules Cancéreuses » du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon. *Dual association of the 2'-O-ribose methyltransferase FBL and poor prognosis in breast cancer.* Aussois, France.
- **Juin 2016** – Présentation à la retraite de département « Plasticité des Cellules Cancéreuses » du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon. *A medium-throughput RT-qPCR approach : sharing experiences of the Biomark HD Device.* Aussois, France.

a. Exemples des posters



Identification of different expression patterns of fibrillarin in human samples: Evidence of ribosome composition heterogeneity in breast cancers

Flora Nguyen Van Long¹, Audrey Lardy-Cleaud², Paul Rollet¹, Nathalie Pion¹, Sylvie Chabaud², David Perol², Jean-Christophe Bourdon³, Fabrice André⁴, Isabelle Treilleux⁵, Jean-Jacques Diaz¹ and Virginie Marcel¹

¹ Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Université Lyon 1, Nuclear domains and pathologies team, Lyon, France

² Centre Léon Bérard, Biostatistics unit, DRCL, UBET, Lyon, France

³ Ninewells Hospital, University of Dundee, Dundee, Scotland, United Kingdom

⁴ Gustave Roussy Cancer Institute, Villejuif, France

⁵ Centre Léon Bérard, Plateforme Anatomopathologie Recherche, Lyon, France

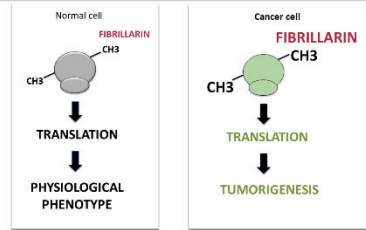
Acknowledgements: Gilles Clapissou (Centre Léon Bérard, CRB), Amélie Colombe Vermorel and Laetitia Odeyer (Plateforme Anatomopathologie Recherche, Centre Léon Bérard)

INTRODUCTION

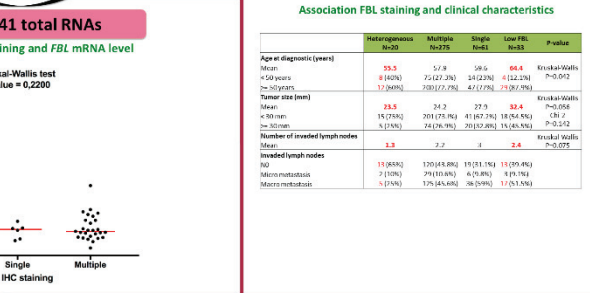
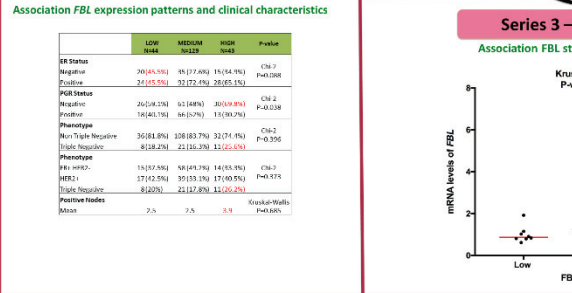
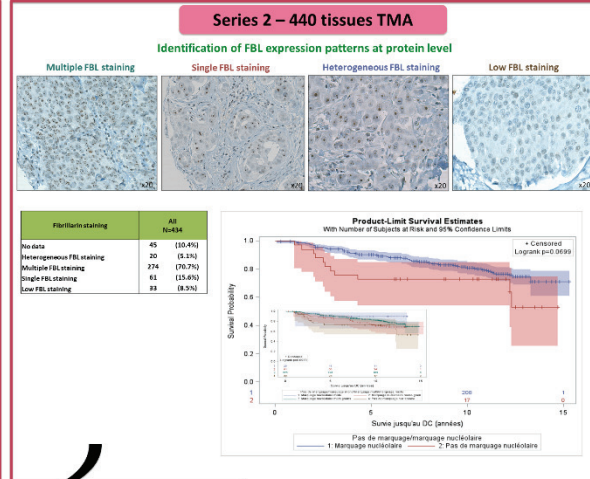
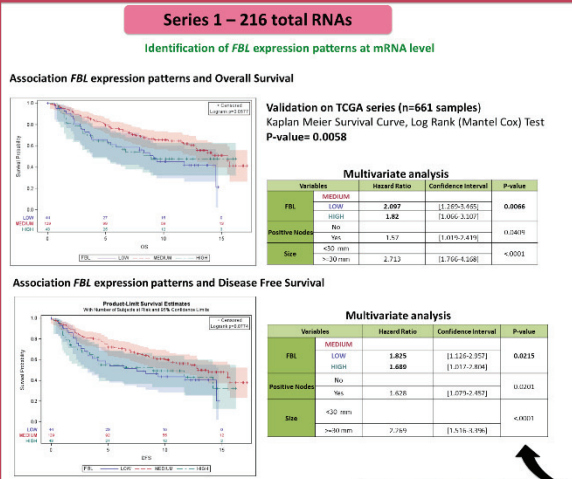
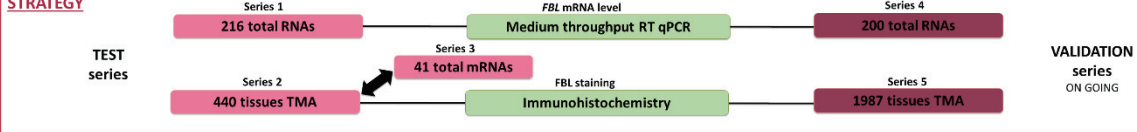
Ribosomes are the machineries translating mRNAs into proteins. For a long time, ribosome was regarded as a single entity with the same translational activity. However, it emerged the concept of specialized ribosome meaning that modifications of ribosome composition induce changes of its translational activity contributing to the development of particular phenotypes.

We showed for the first time that ribosome composition is modified in a breast cancer cellular model by alterations of rRNA 2'-O-ribose methylation (methylation) inducing changes of ribosome translational activities. Alterations of rRNA methylation result from an increase of the rRNA methyltransferase fibrillarin (FBL) favouring translation of a mRNA subset coding for oncoproteins and promoting mammary tumorigenesis.

However the different FBL expression patterns in human breast tumors and their associated clinical characteristics remain unknown.

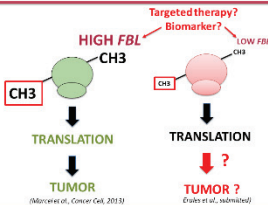


STRATEGY



CONCLUSION

- Series 1: HIGH and LOW FBL mRNA level are independent prognostic marker
- Series 2: Low FBL staining is associated with poor survival and associated with older patients, bigger tumor size and high number of invaded lymph nodes
- Series 3: Low FBL staining tends to be associated with lower FBL mRNA levels



PERSPECTIVES

- Does HIGH and LOW FBL mRNA level induce alterations of rRNA methylation?
- Does LOW FBL favour the development of a particular tumoral phenotype?
- Could FBL be used as biomarker and/or targeted treatment for breast cancer?



Variation of ribosome composition and translational reprogramming during human mammary Epithelial-to-Mesenchymal Transition

Flora Nguyen Van Long¹, Nathalie Pion¹, Yohann Couté², Anne-Pierre Morel³, Virginie Marchand⁴, Yuri Motorin⁴, Oliver Namy⁵, Alain Puisieux³, Jean-Jacques Diaz¹ and Virginie Marce¹

¹ Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Université Lyon 1, Nuclear domains and pathologies team, Lyon, France

² Large scale laboratory of biology, UMR_S 1038 Inserm/CEA/Université de Grenoble Alpes, EDyP Laboratory, Grenoble, France

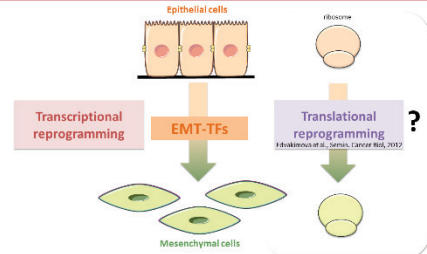
³ Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Université Lyon 1, EMT and cancer cell plasticity team, Lyon, France

⁴ NGS platform, Bioingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

⁵ Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Université Paris-Sud, Paris, France

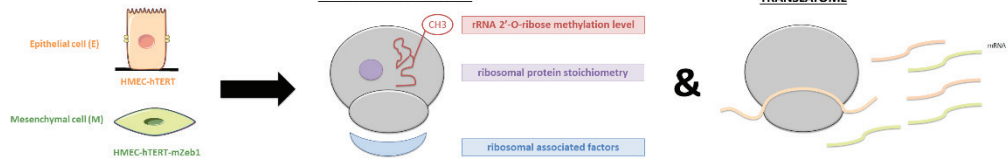
INTRODUCTION

Ribosomes are machineries responsible for translating mRNA into proteins, composed of 4 ribosomal RNAs (rRNAs) and 80 ribosomal proteins (RPs). For a long time, ribosome was thought to be a unique entity with the same translation activity. However it recently emerged that ribosome is a direct regulator of translation. **Ribosomes can exhibit different composition** at protein and rRNA levels that modify the ribosome structure and modulate its translation activity. Our team showed for the first time that ribosomes displaying an **altered rRNA 2'-O-methylation patterns** present distinct translation activities by **favouring the translation Internal Ribosome Entry Site (IRES)-dependent of specific mRNAs** (Marcel *et al.*, Cancer Cell, 2013 and Erales *et al.*, PNAS, 2017). Claudin-low tumors are one of the most aggressive breast cancer subtypes that derive from the transdifferentiation of epithelial cells to mesenchymal cells by the **Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)** process. EMT is driven by a transcriptional reprogramming induced by an overexpression of EMT transcription factors (EMT-TFs) that favours the expression of mesenchymal markers while inhibiting the epithelial ones. It recently appeared that a translational reprogramming also plays a key role in the establishment and maintaining of EMT by an **increase of IRES-dependent translation** of some mRNAs coding for **EMT-TF and mesenchymal markers**.

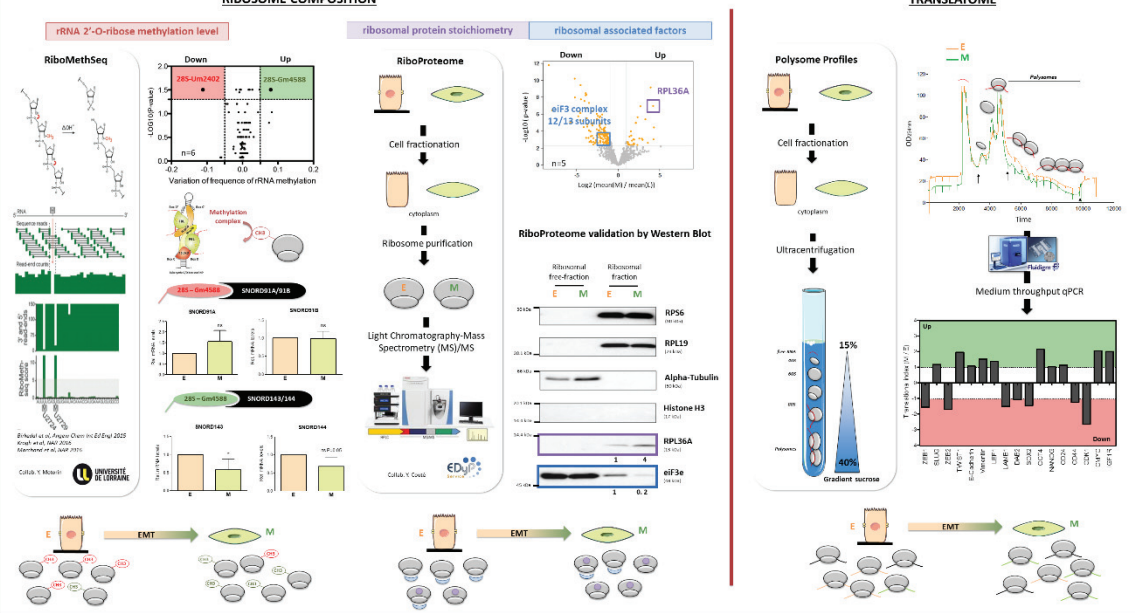


Are ribosomes involved in the translational reprogramming that occurs during EMT?

STRATEGY

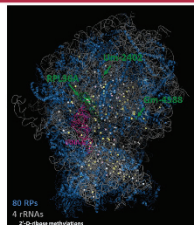


RESULTS



CONCLUSIONS

- ❖ **Ribosome composition** are modified between epithelial and mesenchymal cells :
 - At rRNA levels with 2 sites differently 2'-O-ribose methylated induced by variation of site-specific snRNAs expression
 - At protein levels with different stoichiometry of RPL36A
 - Decrease of ribosomal associated factors : eIF3 complex
- ❖ Translation of some mRNAs coding for EMT-TF and EMT markers are different between epithelial and mesenchymal cells.



PERSPECTIVES

- ❖ Complete analysis of translome in epithelial and mesenchymal cells is ongoing by Riboseq (Collab. Olivier Namy, Paris-Sud)
- ❖ Does ribosomes with different composition are responsible of the translational reprogramming in EMT? (in vitro translation assays)
- ❖ Could ribosomes be used as novel biomarkers and therapeutic targets for Claudin-low tumors?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Khalaf, M., Baumgart, M., Gettinger, S., Doddamane, I., Tuck, D., Hou, S., Chen, N., Sullivan, C., Lezon-Geyda, K., Zelterman, D., et al. (2015). Phase 1b study of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus in combination with nanoparticle albumin-bound paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer* *121*, 1817–1826.
- Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., et al. (2007). The transcription factor ZEB1 (dEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* *26*, 6979–6988.
- Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2009). Open Access Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* *11*, 46.
- Aktas, B.H., Qiao, Y., Ozdelen, E., Schubert, R., Sevinc, S., Harbinski, F., Grubissich, L., Singer, S., Halperin, J.A., Aktas, B.H., et al. (2013). Small-molecule targeting of translation initiation for cancer therapy. *Oncotarget* *4*, 1606–1617.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3983–3988.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., and Al., E. (2002). Cell Junctions. In *Molecular Biology of the Cell*, (New York: Garland Science), p.
- Altman, J.K., Szilard, A., Konicek, B.W., Iversen, P.W., Kroczyńska, B., Glaser, H., Sassano, A., Vakana, E., Graff, J.R., and Plataniias, L.C. (2013). Inhibition of Mnk kinase activity by cercosporamide and suppressive effects on acute myeloid leukemia precursors. *Blood* *121*, 3675–3681.
- Amsterdam, A., Sadler, K.C., Lai, K., Farrington, S., Bronson, R.T., Lees, J.A., and Hopkins, N. (2004). Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol.* *2*, E139.
- Anderson, W.F., Jatoi, I., Tse, J., and Rosenberg, P.S. (2010). Male Breast Cancer : A Population-Based Comparison With Female Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*.
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Bastien Almagro, S., Menoni, H., Mongé Lard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., et al. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* *25*, 1669–1679.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* *14*, 79–89.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H.,

- Johannsson, O., Borg, A., et al. (2003). Departments of 16 Obstetrics and Gynecology and 17 Oncology. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 1117–1130.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstråle, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlén, S., Hydbring, P., Söderberg, O., Grummt, I., et al. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* *7*, 303–310.
- Armstrong, A.J., Marengo, M.S., Oltean, S., Kemeny, G., Bitting, R.L., Turnbull, J.D., Herold, C.I., Marcom, P.K., George, D.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2011). Circulating Tumor Cells from Patients with Advanced Prostate and Breast Cancer Display Both Epithelial and Mesenchymal Markers. *Mol. Cancer Res.* *9*, 997–1007.
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., et al. (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br. J. Cancer* *94*, 259–267.
- Aspesi, A., and Ellis, S.R. (2019). Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *19*, 228–238.
- Assouline, S., Culjkovic, B., Cocolakis, E., Rousseau, C., N, B., Amri, A., Caplan, S., Leber, B., Roy, D., Miller, W.J., et al. (2009). Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood* *114*, 257–260.
- Awan, F.T., Gore, L., Gao, L., Sharma, J., Lager, J., and Costa, L.J. (2016). Phase Ib trial of the PI3K/mTOR inhibitor voxtalisib (SAR245409) in combination with chemoimmunotherapy in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies. *Br. J. Haematol.* *175*, 55–65.
- Aza-Blanc, P., Yanagiya, A., Sonenberg, N., Svitkin, Y.V., Adachi, H., Mikami, S., Imataka, H., Suyama, E., Ronai, Z.A., and Martineau, Y. (2012). Translational Homeostasis via the mRNA Cap-Binding Protein, eIF4E. *Mol. Cell* *46*, 847–858.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* *289*, 905–920.
- Barna, M., Pusic, A., Zollo, O., Costa, M., Kondrashov, N., Rego, E., Rao, P.H., and Ruggero, D. (2008). Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* *456*, 971–975.
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahnoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., et al. (2012). Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 520–529.
- Bastide, A., and David, A. (2018). The ribosome, (slow) beating heart of cancer (stem) cell. *Oncogenesis* *7*.
- Basu, B., Dean, E., Puglisi, M., Greystoke, A., Ong, M., Burke, W., Cavallin, M., Bigley, G., Womack, C., Harrington, E.A., et al. (2015). First-in-Human Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Dual mTORC 1/2 Inhibitor AZD2014. *Clin. Cancer Res.* *21*, 3412–3419.
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and García de Herreros, A. (2000). The

transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* *2*, 84–89.

Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome Profiling Shows That miR-430 Reduces Translation Before Causing mRNA Decay in Zebrafish. *Science* (80-.). *336*, 233–237.

Belin, S., Beghin, A., Solano-González, E., Bezin, L., Brunet-Manquat, S., Textoris, J., Prats, A.C., Mertani, H.C., Dumontet, C., and Diaz, J.J. (2009). Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* *4*, 1–13.

Bellodi, C., Krasnykh, O., Haynes, N., Theodoropoulou, M., Peng, G., Montanaro, L., and Ruggero, D. (2010). Loss of Function of the Tumor Suppressor DKC1 Perturbs p27 Translation Control and Contributes to Pituitary Tumorigenesis. *Cancer Res.* *70*, 6026–6035.

Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* (80-.). *330*, 1203–1209.

Bendell, J.C., Kelley, R.K., Shih, K.C., Grabowsky, J.A., Bergsland, E., Jones, S., Martin, T., Infante, J.R., Mischel, P.S., Matsutani, T., et al. (2015). A phase I dose-escalation study to assess safety, tolerability, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of the dual mTORC1/mTORC2 kinase inhibitor CC-223 in patients with advanced solid tumors or multiple myeloma. *Cancer* *121*, 3481–3490.

De Benedetti, A., and Graff, J.R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* *23*, 3189–3199.

Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 261–278.

Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Krogh, N., Sabarinathan, R., Gorodkin, J., and Nielsen, H. (2015). Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *54*, 451–455.

Blackwell, K., Burris, H., Gomez, P., Lynn Henry, N., Isakoff, S., Campana, F., Gao, L., Jiang, J., Macé, S., and Tolaney, S.M. (2015). Phase I/II dose-escalation study of PI3K inhibitors pilaralisib or voxtalisib in combination with letrozole in patients with hormone-receptor-positive and HER2-negative metastatic breast cancer refractory to a non-steroidal aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res. Treat.* *154*, 287–297.

Blanco, S., Bandiera, R., Popis, M., Hussain, S., Lombard, P., Aleksic, J., Sajini, A., Tanna, H., Cortés-Garrido, R., Gkatza, N., et al. (2016). Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature* *534*, 335–340.

Bloom, H.J., and Richardson, W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer* *11*, 359–377.

Boisvert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 574–585.

- Bordeleau, M.E., Mori, A., Oberer, M., Lindqvist, L., Chard, L.S., Higa, T., Belsham, G.J., Wagner, G., Tanaka, J., and Pelletier, J. (2006). Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat. Chem. Biol.* 2, 213–220.
- Bordeleau, M.E., Robert, F., Gerard, B., Lindqvist, L., Chen, S.M.H., Wendel, H.G., Brem, B., Greger, H., Lowe, S.W., Porco, J.A., et al. (2008). Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *J. Clin. Invest.* 118, 2651–2660.
- Bouffard, S., Dambroise, E., Brombin, A., Lempereur, S., Hatin, I., Simion, M., Corre, R., Bourrat, F., Joly, J.-S., and Jamen, F. (2018). Fibrillarin is essential for S-phase progression and neuronal differentiation in zebrafish dorsal midbrain and retina. *Dev. Biol.* 437, 1–16.
- Bowman, L.H., Rabin, B., and Schlessinger, D. (1981). Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 9, 4951–4966.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., and Weinberg, R.A. (2018). EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 18, 128–134.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2007). A Hypoxia-Controlled Cap-Dependent to Cap-Independent Translation Switch in Breast Cancer. *Mol. Cell* 28, 501–512.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003178.
- Bruno, P.M., Liu, Y., Park, G.Y., Murai, J., Koch, C.E., Eisen, T.J., Pritchard, J.R., Pommier, Y., Lippard, S.J., and Hemann, M.T. (2017). A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat. Med.* 23, 461–471.
- Burger, K., Mühl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hölzel, M., et al. (2010). Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem.* 285, 12416–12425.
- Bywater, M.J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., et al. (2012). Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell* 22, 51–65.
- Cairns, C.A., and White, R.J. (1998). p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J.* 17, 3112–3123.
- Callagy, G., Cattaneo, E., Daigo, Y., Happerfield, L., Bobrow, L.G., Pharoah, P.D.P., and Caldas, C. (2003). Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagnostic Mol. Pathol.* 12, 27–34.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto,

- M.A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* 24, 466–480.
- Cardoso, F., Harbeck, N., Barrios, C.H., Bergh, J., Cortés, J., El Saghir, N., Francis, P.A., Hudis, C.A., Ohno, S., Partridge, A.H., et al. (2017). Research needs in breast cancer. *Ann. Oncol.* 28, 208–217.
- Carlo, M.I., Molina, A.M., Lakhman, Y., Patil, S., Woo, K., DeLuca, J., Lee, C.-H., Hsieh, J.J., Feldman, D.R., Motzer, R.J., et al. (2016). A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist* 21, 787-788d.
- Catez, F., Venezia, N.D., Marcel, V., Zorbas, C., Lafontaine, D.L.J., and Diaz, J.-J. (2018). Ribosome biogenesis: an emerging druggable pathway for cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* 159, 74–81.
- Ceccarelli, C., Trerè, D., Santini, D., Taffurelli, M., Chieco, P., and Derenzini, M. (2000). AgNORs in breast tumours. *Micron* 31, 143–149.
- Cencic, R., Carrier, M., Galicia-Vázquez, G., Bordeleau, M.E., Sukarieh, R., Bourdeau, A., Brem, B., Teodoro, J.G., Greger, H., Tremblay, M.L., et al. (2009). Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol. *PLoS One* 4.
- Cencic, R., Hall, D.R., Robert, F., Du, Y., Min, J., Li, L., Qui, M., Lewis, I., Kurtkaya, S., Dingleline, R., et al. (2011). Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1046–1051.
- Cencic, R., Robert, F., Galicia-Vázquez, G., Malina, A., Ravindar, K., Somaiah, R., Pierre, P., Tanaka, J., Deslongchamps, P., and Pelletier, J. (2013). Modifying chemotherapy response by targeted inhibition of eukaryotic initiation factor 4A. *Blood Cancer J.* 3, 1–8.
- Chaudhury, A., Hussey, G.S., Ray, P.S., Jin, G., Fox, P.L., and Howe, P.H. (2010). TGF- β -mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat. Cell Biol.* 12, 286–293.
- Chaudhury, A., Cheema, S., Fachini, J.M., Kongchan, N., Lu, G., Simon, L.M., Wang, T., Mao, S., Rosen, D.G., Ittmann, M.M., et al. (2016). CELF1 is a central node in post-transcriptional regulatory programmes underlying EMT. *Nat. Commun.* 7, 1–15.
- Cheang, M.C.U., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., et al. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 736–750.
- Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J., and Schreiber, S.L. (2006). Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine

residue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4947–4951.

Chen, L., Aktas, B.H., Wang, Y., He, X., Sahoo, R., Zhang, N., Denoyelle, S., Kabha, E., Yang, H., Freedman, R.Y., et al. (2012). Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation. *Oncotarget* 3, 869–881.

Cmejlova, J., Dolezalova, L., Pospisilova, D., Petrylova, K., Petrak, J., and Cmejla, R. (2006). Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 91, 1456–1464.

Cohen, E.E.W., Wu, K., Hartford, C., Kocherginsky, M., Eaton, K.N., Zha, Y., Nallari, A., Maitland, M.L., Fox-Kay, K., Moshier, K., et al. (2012). Phase I studies of sirolimus alone or in combination with pharmacokinetic modulators in advanced cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 18, 4785–4793.

Colis, L., Peltonen, K., Sirajuddin, P., Liu, H., Sanders, S., Ernst, G., Barrow, J.C., and Laiho, M. (2014). DNA intercalator BMH-21 inhibits RNA polymerase I independent of DNA damage response. *Oncotarget* 5.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet (London, England)* 358, 1389–1399.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet (London, England)* 360, 187–195.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., Van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and Van Roy, F. (2001). The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion. *Mol. Cell* 7, 1267–1278.

Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., and Bouvet, P. (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* 40, 9441–9454.

Couch, F.J., DeShano, M.L., Blackwood, M.A., Calzone, K., Stopfer, J., Campeau, L., Ganguly, A., Rebbeck, T., and Weber, B.L. (1997). BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 336, 1409–1415.

Craene, B. De, and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 13, 97–110.

De Craene, B., Gilbert, B., Stove, C., Bruyneel, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005). The Transcription Factor Snail Induces Tumor Cell Invasion through Modulation of the Epithelial Cell Differentiation Program.

Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features.

Dalla Venezia, N., Vincent, A., Marcel, V., Catez, F., Diaz, J.-J., Dalla Venezia, N., Vincent, A., Marcel, V., Catez, F., and Diaz, J.-J. (2019). Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control. *Int. J. Mol. Sci.* 20,

1226.

Damgaard, C.K., and Lykke-Andersen, J. (2011). Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev.* *25*, 2057–2068.

Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S., and de Herreros, A.G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* *286*, 12024–12032.

Demetri, G.D., Chawla, S.P., Ray-Coquard, I., Le Cesne, A., Staddon, A.P., Milhem, M.M., Penel, N., Riedel, R.F., Bui-Nguyen, B., Cranmer, L.D., et al. (2013). Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* *31*, 2485–2492.

Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin. Cancer Res.* *13*, 4429–4434.

Derenzini, M. (2000). The AgNORs. *Micron* *31*, 117–120.

Derenzini, M., Montanaro, L., and Treré, D. (2009). What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology* *54*, 753–762.

DeSantis, C.E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B.O., and Jemal, A. (2015). International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *24*, 1495–1506.

Descamps, G., Gomez-Bougie, P., Tamburini, J., Green, A., Bouscary, D., Maïga, S., Moreau, P., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2012). The cap-translation inhibitor 4EGI-1 induces apoptosis in multiple myeloma through Noxa induction. *Br. J. Cancer* *106*, 1660–1667.

Desnoyers, G., Frost, L.D., Courteau, L., Wall, M.L., and Lewis, S.M. (2015). Decreased eIF3e Expression Can Mediate Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Activation of the TGF Signaling Pathway. *Mol. Cancer Res.* *13*, 1421–1430.

Destouches, D., Page, N., Hamma-Kourbali, Y., Machi, V., Chaloin, O., Frechault, S., Birmpas, C., Katsoris, P., Beyrath, J., Albanese, P., et al. (2011). A Simple Approach to Cancer Therapy Afforded by Multivalent Pseudopeptides That Target Cell-Surface Nucleoproteins. *Cancer Res.* *71*, 3296–3305.

Dever, T.E., and Green, R. (2012). Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, 1–16.

Dever, T.E., Dinman, J.D., and Green, R. (2018). Translation elongation and recoding in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*, 1–20.

Diab, S., Kumarasiri, M., Yu, M., Teo, T., Proud, C., Milne, R., and Wang, S. (2014). MAP kinase-interacting kinases - Emerging targets against cancer. *Chem. Biol.* *21*, 441–452.

- Diab, S.G., Clark, G.M., Osborne, C.K., Libby, A., Allred, D.C., and Elledge, R.M. (1999). Tumor Characteristics and Clinical Outcome of Tubular and Mucinous Breast Carcinomas. *J. Clin. Oncol.* *17*, 1442–1442.
- Doi, T., Muro, K., Boku, N., Yamada, Y., Nishina, T., Takiuchi, H., Komatsu, Y., Hamamoto, Y., Ohno, N., Fujita, Y., et al. (2010). Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1904–1910.
- Dolly, S.O., Wagner, A.J., Bendell, J.C., Kindler, H.L., Krug, L.M., Seiwert, T.Y., Zauderer, M.G., Lolkema, M.P., Apt, D., Yeh, R.F., et al. (2016). Phase I study of apitolisib (GDC-0980), dual phosphatidylinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* *22*, 2874–2884.
- Dong, X.-Y., Rodriguez, C., Guo, P., Sun, X., Talbot, J.T., Zhou, W., Petros, J., Li, Q., Vessella, R.L., Kibel, A.S., et al. (2008). SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1031–1042.
- Dong, X.-Y., Guo, P., Boyd, J., Sun, X., Li, Q., Zhou, W., and Dong, J.-T. (2009). Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J. Genet. Genomics* *36*, 447–454.
- Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 69–84.
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.-N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., et al. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* *21*, 169–175.
- Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J.P., et al. (2009). Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* *69*, 7653–7661.
- Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., O'Brien, S.E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M.K., Siddiqui-Jain, A., et al. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* *71*, 1418–1430.
- Eades, G., Yao, Y., Yang, M., Zhang, Y., Chumsri, S., and Zhou, Q. (2011). miR-200a Regulates SIRT1 Expression and Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)-like Transformation in Mammary Epithelial Cells *.
- Ellis, I.O., Galea, M., Broughton, N., Locker, A., Blamey, R.W., and Elston, C.W. (1992). Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* *20*, 479–489.
- Elston, C.W., and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* *19*, 403–410.

- Emmott, E., Jovanovic, M., and Slavov, N. (2019). Ribosome Stoichiometry: From Form to Function. *Trends Biochem. Sci.* *44*, 95–109.
- Erales, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S.E., Garcia, M., Laforêts, F., Marcel, V., Baudin-Baillieu, A., et al. (2017). Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201707674.
- Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A., and Amalric, F. (1988). A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* *175*, 525–530.
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L.P., Davicioni, E., Triche, T.J., et al. (2009). Translational Activation of Snail1 and Other Developmentally Regulated Transcription Factors by YB-1 Promotes an Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell* *15*, 402–415.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.
- Fan, Q.W., Knight, Z.A., Goldenberg, D.D., Yu, W., Mostov, K.E., Stokoe, D., Shokat, K.M., and Weiss, W.A. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* *9*, 341–349.
- Fancello, L., Kampen, K.R., Hofman, I.J.F., Verbeeck, J., De Keersmaecker, K., Fancello, L., Kampen, K.R., Hofman, I.J.F., Verbeeck, J., and Keersmaecker, K. De (2017). The ribosomal protein gene RPL5 is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget* *8*, 14462–14478.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., et al. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* *24*, 4660–4671.
- Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., and Shokat, K.M. (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* *7*, e38.
- Feoktistova, K., Tuvshintogs, E., Do, A., and Fraser, C.S. (2013). Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13339–13344.
- Ferzoco, R.M., and Ruddy, K.J. (2016). The Epidemiology of Male Breast Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* *18*, 1–6.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* *527*, 472–476.
- Franz, D.N., Belousova, E., Sparagana, S., Bebin, E.M., Frost, M., Kuperman, R., Witt, O., Kohrman, M.H., Flamini, J.R., Wu, J.Y., et al. (2013). Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): A multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* *381*, 125–132.
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S.M., Östman, A., and Landegren, U. (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* *20*, 473–477.

- Friedrich, J.K., Panov, K.I., Cabart, P., Russell, J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2005). TBP-TAF Complex SL1 Directs RNA Polymerase I Pre-initiation Complex Formation and Stabilizes Upstream Binding Factor at the rDNA Promoter. *J. Biol. Chem.* *280*, 29551–29558.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* *313*, 17–42.
- Frye, M., Jaffrey, S.R., Pan, T., Rechavi, G., and Suzuki, T. (2016). RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat. Rev. Genet.* *17*, 365–372.
- FS., CG., A.J.K., A., D.B., DK., P., LL., C., and Laroux (1996). Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: Implications for tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* *65*, 785–790.
- Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., Liao, L., and Xu, J. (2011). The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* *21*, 275–289.
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I.H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L.A., et al. (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14134–14139.
- Gachet, S., El-Chaar, T., Avran, D., Genesca, E., Catez, F., Quentin, S., Delord, M., Thérizols, G., Briot, D., Meunier, G., et al. (2018). Deletion 6q Drives T-cell Leukemia Progression by Ribosome Modulation. *Cancer Discov.* *8*, 1614–1631.
- Gajadhar, A.S., Bogdanovic, E., Munoz, D.M., and Guha, A. (2012). In Situ Analysis of Mutant EGFRs Prevalent in Glioblastoma Multiforme Reveals Aberrant Dimerization, Activation, and Differential Response to Anti-EGFR Targeted Therapy. *Mol. Cancer Res.* *10*, 428–440.
- Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., et al. (2006). Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2733–2743.
- Ghobrial, I.M., Siegel, D.S., Vij, R., Berdeja, J.G., Richardson, P.G., Neuwirth, R., Patel, C.G., Zohren, F., and Wolf, J.L. (2016). TAK-228 (formerly MLN0128), an investigational oral dual TORC1/2 inhibitor: A phase I dose escalation study in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma, or Waldenström's macroglobulinemia. *Am. J. Hematol.* *91*, 400–405.
- Gillis, L.D., and Lewis, S.M. (2013). Decreased eIF3e/Int6 expression causes epithelial-to-mesenchymal transition in breast epithelial cells. *Oncogene* *32*, 3598–3605.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* *1*, 555–567.
- Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* *17*, 1476–1486.

- Gligorov, J., Doval, D., Bines, J., Alba, E., Cortes, P., Pierga, J.-Y., Gupta, V., Costa, R., Srock, S., de Ducla, S., et al. (2014). Maintenance capecitabine and bevacizumab versus bevacizumab alone after initial first-line bevacizumab and docetaxel for patients with HER2-negative metastatic breast cancer (IMELDA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* *15*, 1351–1360.
- Godet, A.-C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., and Prats, A.-C. (2019). IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. Preprints.
- Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., and Panel members (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *24*, 2206–2223.
- Golomb, L., Volarevic, S., and Oren, M. (2014). p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Lett.* *588*, 2571–2579.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., Vincent, T.M., Lynch, R.L., Monteith, D., Weir, S.N., Schwier, P., Capen, A., Goode, R.L., Dowless, M.S., et al. (2007). Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J. Clin. Invest.* *117*, 2638–2648.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., Lynch, R.L., Dumstorf, C.A., Dowless, M.S., McNulty, A.M., Parsons, S.H., Brail, L.H., Colligan, B.M., Koop, J.W., et al. (2009). eIF4E activation is commonly Elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res.* *69*, 3866–3873.
- Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). the mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.
- Grummt, I., and Längst, G. (2013). Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells ☆. *BBA - Gene Regul. Mech.* *1829*, 393–404.
- Guo, R., Lv, Y., Ouyang, Y., Liu, S., and Li, D. (2017). The Role of miR-497/EIF3A Axis in TGFβ1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Extracellular Matrix in Rat Alveolar Epithelial Cells and Pulmonary Fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* *118*, 3401–3408.
- Gupta, S. V, Sass, E.J., Davis, M.E., Edwards, R.B., Lozanski, G., Heerema, N.A., Lehman, A., Zhang, X., Jarjoura, D., Byrd, J.C., et al. (2011). Resistance to the Translation Initiation Inhibitor Silvestrol is Mediated by ABCB1/P-Glycoprotein Overexpression in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *AAPS J.* *13*.
- Hadjiolova, K. V, Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A.A., and Bachellerie, J.P. (1993). Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* *212*, 211–215.
- Hajra, K.M., Y-S Chen, D., and Fearon, E.R. (2002). The SLUG Zinc-Finger Protein Represses E-Cadherin in Breast Cancer 1.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.

- Harrison, S.J., Khot, A., Brajanovski, N., Cameron, D., Hein, N., McArthur, G.A., Lim, J.K.C., O'Brien, S., Ryckman, D.M., Yu, G.I., et al. (2015). A phase 1, open-label, dose escalation, safety, PK and PD study of a first in class PolI inhibitor (CX-5461) in patients with advanced hematologic malignancies (HM). *J. Clin. Oncol.* *33*, e22212–e22212.
- Hawkins, B.C., Lindqvist, L.M., Nhu, D., Sharp, P.P., Segal, D., Powell, A.K., Campbell, M., Ryan, E., Chambers, J.M., White, J.M., et al. (2014). Simplified silvestrol analogues with potent cytotoxic activity. *ChemMedChem* *9*, 1556–1566.
- Heiss, N.S., Knight, S.W., Vulliamy, T.J., Klauck, S.M., Wiemann, S., Mason, P.J., Poustka, A., and Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.* *19*, 32–38.
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T.M., and Grummt, I. (1998). Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J.* *17*, 7373.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *6*, 225–242.
- Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V.M., Francí, C., Gutierrez, A., Lia Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Croce, L. Di, Helin, K., et al. (2008). Polycomb Complex 2 Is Required for E-cadherin Repression by the Snail1 Transcription Factor \dagger . *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4772–4781.
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., et al. (2009). Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 3822–3829.
- Hinnebusch, A.G. (2014). The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Annu. Rev. Biochem.* *83*, 779–812.
- Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, 1–26.
- Hinnebusch, A.G., Ivanov, I.P., and Sonenberg, N. (2016). <Hinnebusch2016.Pdf>. 352.
- Hiscox, S., Jiang, W.G., Obermeier, K., Taylor, K., Morgan, L., Burmi, R., Barrow, D., and Nicholson, R.I. (2006). Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of β -catenin phosphorylation. *Int. J. Cancer* *118*, 290–301.
- Hofman, I.J.F., van Duin, M., De Bruyne, E., Fancello, L., Mulligan, G., Geerdens, E., Garelli, E., Mancini, C., Lemmens, H., Delforge, M., et al. (2017). RPL5 on 1p22.1 is recurrently deleted in multiple myeloma and its expression is linked to bortezomib response. *Leukemia* *31*, 1706–1714.
- Hollstein, U. (1974). Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chem. Rev.* *74*, 625–652.
- Hong, D.S., Kurzrock, R., Oh, Y., Wheler, J., Naing, A., Brail, L., Callies, S., Andre, V., Kadam, S.K., Nasir, A.,

- et al. (2011). A phase 1 dose escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of eIF-4E antisense oligonucleotide LY2275796 in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* *17*, 6582–6591.
- Hood, K.A., West, L.M., Northcote, P.T., Berridge, M. V., and Miller, J.H. (2001). Induction of apoptosis by the marine sponge (*Mycale*) metabolites, mycalamide A and pateamine. *Apoptosis* *6*, 207–219.
- Horos, R., IJspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I.P., et al. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* *119*, 262–272.
- Huang, R., Wu, T., Xu, L., Liu, A., Ji, Y., and Hu, G. (2002). Upstream binding factor up-regulated in hepatocellular carcinoma is related to the survival and cisplatin-sensitivity of cancer cells. *FASEB J.* *16*, 293–301.
- Huang, R.Y.-J., Guilford, P., and Thiery, J.P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* *125*, 4417–4422.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1269–1275.
- Hudes, G., O’Toole, T., Tomczak, P., Bodrogi, I., Sosman, J., Kapoor, A., Staroslawska, E., Kovacevic, Z., McDermott, D., Dutcher, J., et al. (2007). Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *356*, 2271–2281.
- Hunter, D.J., Spiegelman, D., Adami, H., Brandt, P.A. Van Den, Folsom, A.R., Goldbohm, R.A., Graham, S., Howe, G.R., Kushi, L.H., Marshall, J.R., et al. (1997). Non-dietary factors as risk factors for breast cancer , and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer. *Cancer Causes Control* *8*, 49–56.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Iliopoulos, D., Lindahl-Allen, M., Polytarchou, C., Hirsch, H.A., Tschlis, P.N., and Struhl, K. (2010). Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol. Cell* *39*, 761–772.
- INCa (2013). Les traitements des cancers du sein GUIDES PATIENTS. 120.
- Ingolia, N.T. (2016). Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell* *165*, 22–33.
- INSERM Classification histologique et pathologie moléculaire.
- Institut National du Cancer Anatomie du sein - Cancer du sein.
- Institut National du Cancer (2016). Les cancers en France - Edition 2016.
- Iwakawa, H. oki, and Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* *25*, 651–665.
- Iyer-Bierhoff, A., Krogh, N., Tessarz, P., Ruppert, T., Nielsen, H., and Grummt, I. (2018). SIRT7-Dependent

Deacetylation of Fibrillarin Controls Histone H2A Methylation and rRNA Synthesis during the Cell Cycle. *Cell Rep.* 25, 2946-2954.e5.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.

Jechlinger, M., Grunert, S., Tamir, I.H., Janda, E., Lüdemann, S., Waerner, T., Seither, P., Weith, A., Beug, H., and Kraut, N. (2003). Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 22, 7155–7169.

Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* 19, 104–113.

Kallergi, G., Papadaki, M.A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., and Agelaki, S. (2011). Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients.

Kalluri, R., and Weinberg, R. a (2009). Review series The basics o epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428.

Kampen, K.R., Sulima, S.O., Verbelen, B., Girardi, T., Vereecke, S., Rinaldi, G., Verbeeck, J., Op de Beeck, J., Uyttebroeck, A., Meijerink, J.P.P., et al. (2019). The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* 33, 319–332.

De Keersmaecker, K., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., et al. (2013). Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 45, 186–190.

Kentsis, A., Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L., and Borden, K.L.B. (2004). Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 18105–18110.

Kentsis, A., Volpon, L., Topisirovic, I., Soll, C.E., Culjkovic, B., Shao, L., and Borden, K.L.B. (2005). Further evidence that ribavirin interacts with eIF4E. *Rna* 11, 1762–1766.

Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645.

Kim, L.C., Cook, R.S., and Chen, J. (2017). MTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* 36, 2191–2201.

King, H.A., Cobbold, L.C., and Willis, A.E. (2010). The role of IRES *trans* -acting factors in regulating translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1581–1586.

King, M.-C., Marks, J.H., Mandell, J.B., and New York Breast Cancer Study Group (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302, 643–646.

Klinge, S., and Woolford, J.L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 116–

131.

Koh, C.M., Gurel, B., Sutcliffe, S., Aryee, M.J., Schultz, D., Iwata, T., Uemura, M., Zeller, K.I., Anele, U., Zheng, Q., et al. (2011). Tumorigenesis and Neoplastic Progression Alterations in Nucleolar Structure and Gene Expression Programs in Prostatic Neoplasia Are Driven by the MYC Oncogene. *AJPA* 178, 1824–1834.

Komar, A.A., and Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle* 10, 229–240.

Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Ishijima, J., Shiroishi, T., Barna, M., and Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383–397.

Konicek, B.W., Stephens, J.R., McNulty, A.M., Robichaud, N., Peery, R.B., Dumstorf, C.A., Dowless, M.S., Iversen, P.W., Parsons, S., Ellis, K.E., et al. (2011). Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. *Cancer Res.* 71, 1849–1857.

Koromilas, A.E., Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* 11, 4153–4158.

Kressler, D., Hurt, E., and Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803, 673–683.

Krieg, J., Olivier, A.R., and Thomas, G. (1988). [39] Analysis of 40S ribosomal protein S6 phosphorylation during the mitogenic response. *Methods Enzymol.* 164, 575–581.

Krogh, N., Jansson, M.D., Häfner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H., and Nielsen, H. (2016a). 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.

Krogh, N., Jansson, M.D., Häfner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H., and Nielsen, H. (2016b). 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.

Kuznetsov, G., Xu, Q., Rudolph-Owen, L., TenDyke, K., Liu, J., Towle, M., Zhao, N., Marsh, J., Agoulnik, S., Twine, N., et al. (2009). Potent in vitro and in vivo anticancer activities of des-methyl, des-amino pateamine A, a synthetic analogue of marine natural product pateamine A. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1250–1260.

Lacey, J. V., Chung, N.T., and Bernstein, L. (2013). Breast Cancer Epidemiology. In *Women and Health*, (Elsevier), pp. 1099–1112.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.

Lee, A.S., Kranzusch, P.J., Doudna, J.A., and Cate, J.H.D. (2016). eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature* 536, 96–99.

- Lee, A.S.Y., Kranzusch, P.J., and Cate, J.H.D. (2015). EIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature* 522, 111–114.
- Lehmann-Che, J., Hamy, A.-S., Porcher, R., Barritault, M., Bouhidel, F., Habuellelah, H., Leman-Detours, S., de Roquancourt, A., Cahen-Doidy, L., Bournstyn, E., et al. (2013). Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res.* 15, R37.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 2750–2767.
- Levy, S., Avni, D., Hariharan, N., Perry, R.P., and Meyuhas, O. (1991). Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3319–3323.
- Li, C.I., Anderson, B.O., Daling, J.R., and Moe, R.E. (2003). Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 289, 1421–1424.
- Li, Q.-Q., Xu, J.-D., Wang, W.-J., Cao, X.-X., Chen, Q., Tang, F., Chen, Z.-Q., Liu, X.-P., and Xu, Z.-D. (2009). Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 15, 2657–2665.
- Li, S., Jia, Y., Jacobson, B., McCauley, J., Kratzke, R., Bitterman, P.B., and Wagner, C.R. (2013). Treatment of breast and lung cancer cells with a N-7 benzyl guanosine monophosphate tryptamine phosphoramidate pronucleotide (4Ei-1) results in chemosensitization to gemcitabine and induced eIF4E proteasomal degradation. *Mol. Pharm.* 10, 523–531.
- Lim, S., Becker, A., Zimmer, A., Lu, J., Buettner, R., and Kirfel, J. (2013). SNAI1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Confers Chemoresistance and Cellular Plasticity by Regulating Genes Involved in Cell Death and Stem Cell Maintenance. *PLoS One* 8, e66558.
- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B.K., and Lu, J. (2010). Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 29, 4896–4904.
- Liu, L., Dilworth, D., Gao, L., Monzon, J., Summers, A., Lassam, N., and Hogg, D. (1999). Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat. Genet.* 21, 128–132.
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., Mcdermott, S.P., Landis, M.D., et al. (2014). Stem Cell Reports Article Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* 2, 78–91.
- Liu, T., Nair, S.J., Lescarbeau, A., Belani, J., Peluso, S., Conley, J., Tillotson, B., O'Hearn, P., Smith, S., Slocum, K., et al. (2012). Synthetic Silvestrol Analogues as Potent and Selective Protein Synthesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* 55, 8859–8878.
- Lopes, A.M., Miguel, R.N., Sargent, C.A., Ellis, P.J., Amorim, A., and Affara, N.A. (2010). The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during

spermatogenesis. *BMC Mol. Biol.* *11*, 33.

Low, W.K., Dang, Y., Schneider-Poetsch, T., Shi, Z., Choi, N.S., Merrick, W.C., Romo, D., and Liu, J.O. (2005). Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A. *Mol. Cell* *20*, 709–722.

M., H., E., P., P., K., and A., K. (2001). Grand multiparity and the risk of breast cancer: Population-based study in Finland. *Cancer Causes Control* *12*, 491–500.

Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* *449*, 682–688.

Macmahon, B., Cole, P., Lin, T.M., Lowe, C.R., Mirra, A.P., Ravnihar, B., Salber, E.J., Valaoras, V.G., and Yuasa, S. (1970). Age at First Birth and Breast Cancer Risk. *Bull. World Heal. Organ.* 209–221.

Makker, V., Recio, F.O., Ma, L., Matulonis, U.A., Lauchle, J.O., Parmar, H., Gilbert, H.N., Ware, J.A., Zhu, R., Lu, S., et al. (2016). A multicenter, single-arm, open-label, phase 2 study of apitolisib (GDC-0980) for the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma (MAGGIE study). *Cancer* *122*, 3519–3528.

Makki, J. (2015). Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* *8*, 23–31.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* *133*, 704–715.

Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.-P., Solano-González, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., et al. (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* *24*, 318–330.

Marcel, V., Catez, F., and Diaz, J.J. (2015). P53, a translational regulator: Contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene* *34*, 5513–5523.

Marcel, V., Catez, F., Berger, C.M., Perrial, E., Plesa, A., Thomas, X., Mattei, E., Hayette, S., Saintigny, P., Bouvet, P., et al. (2017). Expression profiling of ribosome biogenesis factors reveals nucleolin as a novel potential marker to predict outcome in AML patients. *PLoS One* *12*, 1–17.

Marcel, V., Van Long, F.N., and Diaz, J.-J. (2018). 40 years of research put p53 in translation. *Cancers (Basel)* *10*.

Marchand, V., Blanloeil-Oillo, F., Helm, M., and Motorin, Y. (2016). Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic Acids Res.* *44*, e135–e135.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell* *3*, 707–716.

Markman, B., Taberero, J., Krop, I., Shapiro, G.I., Siu, L., Chen, L.C., Mita, M., Melendez cuero, M., Stutvoet, S., Birle, D., et al. (2012). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the oral phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR inhibitor BGT226 in patients with advanced solid tumors. *Ann. Oncol.*

23, 2399–2408.

Marmot, M.G., Altman, D.G., Cameron, D.A., Dewar, J.A., Thompson, S.G., and Wilcox, M. (2013). The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Br. J. Cancer* *108*, 2205–2240.

Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102–1107.

Martineau, Y., Müller, D., and Pyronnet, S. (2014). Targeting protein synthesis in cancer cells. *Oncoscience* *1*, 484.

Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. *Science* (80-.). *317*, 1764–1767.

May, C.D., Sphyris, N., Evans, K.W., Werden, S.J., Guo, W., and Mani, S.A. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* *13*, 1–10.

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

McPherson, K; Stell, CM, D.J. (2000). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors and Genetics Risk Factors for Breast Cancer. *Br. Med J.* *321*, 624–628.

Meyer, K.D., Jaffrey, S.R., Elemento, O., Skabkin, M.A., Qian, S.-B., Patil, D.P., Zhou, J., Pestova, T.V., and Zinoviev, A. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* *163*, 999–1010.

Micalizzi, D.S., Maheswaran, S., and Haber, D.A. (2017). A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev.* *31*, 1827–1840.

Miller, G., Panov, K.I., Friedrich, J.K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2001). hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA polymerase I to rRNA gene promoters. *EMBO J.* *20*, 1373–1382.

Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N.E. (2007). Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* *357*, 2666–2676.

Mills, E.W., and Green, R. (2017). Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science* (80-.). *358*, eaan2755.

Monaco, P. Lo, Marcel, V., Diaz, J.-J., and Catez, F. (2018). 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules* *8*, 106.

Montanaro, L., Brigotti, M., Clohessy, J., Barbieri, S., Ceccarelli, C., Santini, D., Taffurelli, M., Calienni, M., Teruya-Feldstein, J., Trerè, D., et al. (2006). Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. *J. Pathol.* *210*, 10–18.

- Montanaro, L., Treré, D., and Derenzini, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am. J. Pathol.* *173*, 301–310.
- Montanaro, L., Calienni, M., Bertoni, S., Rocchi, L., Sansone, P., Storci, G., Santini, D., Ceccarelli, C., Taffurelli, M., Carnicelli, D., et al. (2010). Novel Dyskerin-Mediated Mechanism of p53 Inactivation through Defective mRNA Translation. *Cancer Res.* *70*, 4767–4777.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* *3*, e2888.
- Morel, A.P., Hinkal, G.W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., Devouassoux-Shisheboran, M., Treilleux, I., Tissier, A., Gras, B., et al. (2012). EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.* *8*.
- Morel, A.P., Ginestier, C., Pommier, R.M., Cabaud, O., Ruiz, E., Wicinski, J., Devouassoux-Shisheboran, M., Combaret, V., Finetti, P., Chassot, C., et al. (2017). A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nat. Med.* *23*, 568–578.
- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., María Rodríguez-Pinilla, S., Villa, S., Bolós, V., Jordá, M., Fabra, A., Portillo, F., et al. (2006). Genetic Profiling of Epithelial Cells Expressing E-Cadherin Repressors Reveals a Distinct Role for Snail, Slug, and E47 Factors in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Res.* *66*, 9543–9556.
- Motzer, R., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J., Figlin, R., Hollaender, N., et al. (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* *372*, 449–456.
- Mouneimne, G., and Brugge, J.S. (2009). YB-1 translational control of epithelial-mesenchyme transition. *Cancer Cell* *15*, 357–359.
- Mukhopadhyay, R., Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., and Fox, P.L. (2009). The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 324–331.
- Mullineux, S.-T., and Lafontaine, D.L.J. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie* *94*, 1521–1532.
- Murano, K., Okuwaki, M., Hisaoka, M., and Nagata, K. (2008). Transcription Regulation of the rRNA Gene by a Multifunctional Nucleolar Protein, B23/Nucleophosmin, through Its Histone Chaperone Activity. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3114–3126.
- Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L., and Strobel, S.A. (2000). A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* (80-.). *289*, 947–950.
- N., F., R., B., E., B., L., A., R.A., H., H., L., W.W., D.H., M., R., A., T., J., C., et al. (2016). A phase II study of BEZ235 in patients with everolimus-resistant, advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *Anticancer Res.* *36*, 713–720.

Naing, A., Aghajanian, C., Raymond, E., Olmos, D., Schwartz, G., Oelmann, E., Grinsted, L., Burke, W., Taylor, R., Kaye, S., et al. (2012). Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD8055 in advanced solid tumours and lymphoma. *Br. J. Cancer* *107*, 1093–1099.

Nanbry, C., Lafon, I., Audigier, S., Gensac, M.-C., Vagner, S., Huez, G., and Prats, A.-C. (1997). Alternative Translation of the Proto-oncogene *c-myc* by an Internal Ribosome Entry Site *. *J. Biol. Chem.* *272*, 32061–32066.

Nandagopal, N., and Roux, P.P. (2015). Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation* *3*, e983402.

Natchiar, S.K., Myasnikov, A.G., Kratzat, H., Hazemann, I., and Klaholz, B.P. (2017). Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* *551*, 472–477.

National Cancer Institute (2015). Female Breast Cancer - Cancer Stat Facts.

Nielsen, T.O., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressle, L., Akslén, L.A., et al. (2004). Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5367–5374.

Nieto, M.A., Huang, R.Y.Y.J., Jackson, R.A.A., and Thiery, J.P.P. (2016). Emt: 2016. *Cell* *166*, 21–45.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* (80-.). *289*, 920–930.

Nygård, O., and Nika, H. (1982). Identification by RNA-protein cross-linking of ribosomal proteins located at the interface between the small and the large subunits of mammalian ribosomes. *EMBO J.* *1*, 357–362.

Oettel, S., Härtel, F., Kober, I., Iben, S., and Seifart, K.H. (1997). Human transcription factors III C 2 , III C 1 and a novel component III C 0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes (Oxford University Press).

Ogle, J.M., Carter, A.P., and Ramakrishnan, V. (2003). Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 259–266.

Ohtsu, A., Ajani, J.A., Bai, Y.-X., Bang, Y.-J., Chung, H.-C., Pan, H.-M., Sahnoud, T., Shen, L., Yeh, K.-H., Chin, K., et al. (2013). Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study. *J. Clin. Oncol.* *31*, 3935–3943.

Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N., and Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J. Biol. Chem.* *8*, 45.

Orringer, M.B., Beer, D.G., Chen, G., Iannettoni, M.D., Giordano, T.J., Taylor, J.M.G., Gharib, T.G., Kardia, S.L.R., Misek, D.E., Hanash, S.M., et al. (2003). Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* *1*, 304–313.

Oshiro, N., Yoshino, K.I., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells* *9*, 359–366.

- Pace, L.E., and Keating, N.L. (2014). A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* *311*, 1327–1335.
- Papadopoulos, K.P., Tabernero, J., Markman, B., Patnaik, A., Tolcher, A.W., Baselga, J., Shi, W., Egile, C., Ruiz-Soto, R., Laird, A.D., et al. (2014). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245409 (XL765), a novel, orally administered PI3K/mTOR inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* *20*, 2445–2456.
- Papadopoulos, K.P., Egile, C., Ruiz-Soto, R., Jiang, J., Shi, W., Bentzien, F., Rasco, D., Abrisqueta, P., Vose, J.M., and Tabernero, J. (2015). Efficacy, safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of SAR245409 (voxtalisib, XL765), an orally administered phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor: A phase I expansion cohort in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Leuk. Lymphoma* *56*, 1763–1770.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., et al. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* *27*, 1160–1167.
- Passmore, L.A., Schmeing, T.M., Maag, D., Applefield, D.J., Acker, M.G., Algire, M.A.A., Lorsch, J.R., and Ramakrishnan, V. (2007). The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome. *Mol. Cell* *26*, 41–50.
- Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donzé, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* *371*, 762–767.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., and Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 306–319.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* *334*, 320–325.
- Pelletier, J., Thomas, G., and Volarevic, S. (2017). Players and Therapeutic Avenues. *Nat. Publ. Gr.*
- Peltonen, K., Colis, L., Liu, H., Trivedi, R., Moubarek, M.S., Moore, H.M., Bai, B., Rudek, M.A., Bieberich, C.J., and Laiho, M. (2014). A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* *25*, 77–90.
- Peña, C., Hurt, E., and Panse, V.G. (2017). Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 689–699.
- Penzo, M., and Montanaro, L. (2018). Turning uridines around: Role of rRNA pseudouridylation in ribosome biogenesis and ribosomal function. *Biomolecules* *8*, 1–10.
- Penzo, M., Rocchi, L., Brugiére, S., Carnicelli, D., Onofrillo, C., Couté, Y., Brigotti, M., and Montanaro, L. (2015). Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. *FASEB J.* *29*, 3472–3482.

- Penzo, M., Montanaro, L., Treré, D., Derenzini, M., Penzo, M., Montanaro, L., Treré, D., and Derenzini, M. (2019). The Ribosome Biogenesis—Cancer Connection. *Cells* 8, 55.
- Perez, R.E., Navarro, A., Rezaiekhaliq, M.H., Mabry, S.M., and Ekekezie, I.I. (2011). TRIP-1 regulates TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition of human lung epithelial cell line A549. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 300, L799–L807.
- Perl, A., Kasner, M., Tsai, D., Vogl, D., Loren, A., Schuster, S., Porter, D., Stadtmauer, E., Goldstein, S., Frey, N., et al. (2009). A Phase I Study of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Sirolimus and MEC Chemotherapy in Relapsed and Refractory Acute Myelogenous Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 15, 6732–6739.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Perry, R.P., and Kelley, D.E. (1970). Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: Characteristic dose-response of different RNA species. *J. Cell. Physiol.* 76, 127–139.
- Petz, M., Them, N., Huber, H., Beug, H., and Mikulits, W. (2012a). La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* 40, 290–302.
- Petz, M., Them, N.C.C., Huber, H., and Mikulits, W. (2012b). PDGF enhances IRES-mediated translation of Laminin B1 by cytoplasmic accumulation of La during epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* 40, 9738–9749.
- Pharoah, P.D.P., Day, N.E., Duffy, S., Easton, D.F., and Ponder, B.A.J. (1997). Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 71, 800–809.
- Philips, F.S., Schwartz, H.S., Sternberg, S.S., and Tan, C.T.C. (1960). THE TOXICITY OF ACTINOMYCIN D*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89, 348–360.
- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., et al. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1659–1672.
- Piccart, M., Hortobagyi, G.N., Campone, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., Ito, Y., Noguchi, S., Perez, A., Rugo, H.S., Deleu, I., et al. (2014). Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: Overall survival results from BOLERO-2. *Ann. Oncol.* 25, 2357–2362.
- Pich, A., Chiusa, L., and Margaria, E. (2000). Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 31, 133–141.
- Pichiorri, F., Palmieri, D., De Luca, L., Consiglio, J., You, J., Rocci, A., Talabere, T., Piovan, C., Lagana, A., Cascione, L., et al. (2013). In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. *J. Exp. Med.* 210, 951–968.
- Piserà, A., Campo, A., and Campo, S. (2018). Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and

its role in cancer development and treatment. *J. Genet. Genomics* 45, 13–24.

Poulard, C., Rambaud, J., Le Romancer, M., and Corbo, L. (2014). Proximity Ligation Assay to Detect and Localize the Interactions of ER α with PI3-K and Src in Breast Cancer Cells and Tumor Samples. (Humana Press, New York, NY), pp. 135–143.

Powles, T., Wheeler, M., Din, O., Geldart, T., Boleti, E., Stockdale, A., Sundar, S., Robinson, A., Ahmed, I., Wimalasingham, A., et al. (2016a). A Randomised Phase 2 Study of AZD2014 Versus Everolimus in Patients with VEGF-Refractory Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *Eur. Urol.* 69, 450–456.

Powles, T., Lackner, M.R., Oudard, S., Escudier, B., Ralph, C., Brown, J.E., Hawkins, R.E., Castellano, D., Rini, B.I., Staehler, M.D., et al. (2016b). Randomized open-label phase II trial of apitolisib (GDC-0980), a novel inhibitor of the PI3K/mammalian target of rapamycin pathway, versus everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 34, 1660–1668.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68.

Prat, A., Cheang, M.C.U., Martín, M., Parker, J.S., Carrasco, E., Caballero, R., Tyldesley, S., Gelmon, K., Bernard, P.S., Nielsen, T.O., et al. (2013a). Prognostic Significance of Progesterone Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 203–209.

Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C.U., Anders, C.K., Carey, L.A., and Perou, C.M. (2013b). Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 18, 123–133.

Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 16, 488–494.

Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557–572.

Ramalingam, S., Gediya, L., Kwegyir-Afful, A.K., Ramamurthy, V. priyadarsini, Purushottamachar, P., Mbatia, H., and Njar, V.C.O. (2014). First MNKs degrading agents block phosphorylation of eIF4E, induce apoptosis, inhibit cell growth, migration and invasion in triple negative and Her2-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncotarget* 5, 530–543.

Ramsay, D.T., Kent, J.C., Hartmann, R.A., and Hartmann, P.E. (2005). Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *J. Anat.* 206, 525–534.

Raška, I., Koberna, K., Malínský, J., Fidlerová, H., and Mašata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol. Cell* 96, 579–594.

Richter, J.D., and Collier, J. (2015). Pausing on Polyribosomes: Make Way for Elongation in Translational Control. *Cell* 163, 292–300.

Rickards, B., Flint, S.J., Cole, M.D., and LeRoy, G. (2007). Nucleolin Is Required for RNA Polymerase I Transcription In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 937–948.

- Van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* 10, 301–309.
- Robert, N.J., Diéras, V., Glaspy, J., Brufsky, A.M., Bondarenko, I., Lipatov, O.N., Perez, E.A., Yardley, D.A., Chan, S.Y.T., Zhou, X., et al. (2011). RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1252–1260.
- Robichaud, N., del Rincon, S. V, Huor, B., Alain, T., Petrucci, L.A., Hearnden, J., Goncalves, C., Grotegut, S., Spruck, C.H., Furic, L., et al. (2015). Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene* 34, 2032–2042.
- Rogers, G.W., Richter, N.J., and Merrick, W.C. (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J. Biol. Chem.* 274, 12236–12244.
- Rogers, G.W., Richter, N.J., Lima, W.F., and Merrick, W.C. (2001). Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J. Biol. Chem.* 276, 30914–30922.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., et al. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1673–1684.
- Rosenberg, J.E., Bambury, R.M., Van Allen, E.M., Drabkin, H.A., Lara, P.N., Harzstark, A.L., Wagle, N., Figlin, R.A., Smith, G.W., Garraway, L.A., et al. (2014). A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs* 32, 178–187.
- Roux, P.P., and Topisirovic, I. (2012). Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Roux, P.P., and Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* 38, 1–26.
- Ruggero, D. (2012a). Revisiting the nucleolus: from marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Sci. Signal.* 5, pe38.
- Ruggero, D. (2012b). Revisiting the nucleolus: From marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Sci. Signal.* 5, 5–7.
- Ruggero, D. (2013). Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–28.
- Ruggero, D., and Pandolfi, P.P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* 3, 179–192.
- Ruggero, D., Grisendi, S., Piazza, F., Rego, E., Mari, F., Rao, P.H., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2003). Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* (80-.). 299, 259–262.
- Russell, J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci.* 30, 87–96.

- Russell, J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem. Soc. Symp.* 203–216.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* *19*, 2199–2211.
- Sabatier, R., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Chaffanet, M., Viens, P., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2014). Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol. Cancer* *13*, 1–14.
- Salazar, R., Garcia-Carbonero, R., Libutti, S.K., Hendifar, A.E., Custodio, A., Guimbaud, R., Lombard-Bohas, C., Ricci, S., Klümper, H.-J., Capdevila, J., et al. (2018). Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Oncologist* *23*, 766-e90.
- Sankaranarayanan, R., Swaminathan, R., Brenner, H., Chen, K., Chia, K.S., Chen, J.G., Law, S.C., Ahn, Y.-O., Xiang, Y.B., Yeole, B.B., et al. (2010). Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study. *Lancet Oncol.* *11*, 165–173.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* *14*, 1296–1302.
- Sarkaria, J.N., Schwingler, P., Schild, S.E., Grogan, P.T., Mladek, A.C., Mandrekar, S.J., Tan, A.D., Kobayashi, T., Marks, R.S., Kita, H., et al. (2007). Phase I trial of sirolimus combined with radiation and cisplatin in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* *2*, 751–757.
- Sasich, L.D., and Sukkari, S.R. (2012). The US FDAs withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). *Saudi Pharm. J.* *20*, 381–385.
- Saxena, M., Stephens, M.A., Pathak, H., and Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.* *2*.
- Senba, M., Tsumuraya, T., Ishikawa, C., Machijima, Y., Tanaka, J., Nakachi, S., and Mori, N. (2011). Effects of hippuristanol, an inhibitor of eIF4A, on adult T-cell leukemia. *Biochem. Pharmacol.* *81*, 713–722.
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-LLorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., Cardoso, F., and ESMO Guidelines Committee (2015). clinical practice guidelines Primary breast cancer : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up † clinical practice guidelines. *Ann. Oncol.* *26*.
- Seront, E., Rottey, S., Filleul, B., Glorieux, P., Goeminne, J.-C., Verschaeve, V., Vandenbulcke, J.-M., Sautois, B., Boegner, P., Gillain, A., et al. (2016). Phase II study of dual phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor BEZ235 in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *BJU Int.* *118*, 408–415.
- Shah, M., Su, D., Scheliga, J.S., Pluskal, T., Boronat, S., Motamedchaboki, K., Campos, A.R., Qi, F., Hidalgo, E.,

- Yanagida, M., et al. (2016). A Transcript-Specific eIF3 Complex Mediates Global Translational Control of Energy Metabolism. *Cell Rep.* *16*, 1891–1902.
- Shapiro, L., and Weis, W.I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a003053.
- Sharma, S., and Lafontaine, D.L.J. (2015). “View From A Bridge”: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 560–575.
- Sharma, S., Marchand, V., Motorin, Y., and Lafontaine, D.L.J. (2017). Identification of sites of 2'-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. *Sci. Rep.* *7*, 11490.
- Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K.M., Genuth, N.R., Röst, H.L., Teruel, M.N., and Barna, M. (2017). Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* *67*, 71-83.e7.
- Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 611–629.
- Si-Ying Lee, A., Burdeinick-Kerr, R., and J Whelan, S.P. (2013). A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *110*.
- Siddiqui, N., and Sonenberg, N. (2015). Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 763–772.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* *67*, 7–30.
- Signer, R.A.J., Magee, J.A., Salic, A., and Morrison, S.J. (2014). Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* *508*, 49–54.
- Silvera, D., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2010). Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 254–266.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* *344*, 783–792.
- Sloan, K.E., Warda, A.S., Sharma, S., Entian, K.-D., Lafontaine, D.L.J., and Bohnsack, M.T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol.* *14*, 1138–1152.
- Söderberg, O., Leuchowius, K.-J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.-G., and Landegren, U. (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* *45*, 227–232.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* *136*, 731–745.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 8418–8423.

Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10869–10874.

Sotiriou, C., Neo, S.-Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L., and Liu, E.T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10393–10398.

De Sousa Abreu, R., Penalva, L.O., Marcotte, E.M., and Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* *5*, 1512–1526.

Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., et al. (2008). The Transcriptional Repressor ZEB1 Promotes Metastasis and Loss of Cell Polarity in Cancer. *Cancer Res* *68*, 537–581.

Spears, M., Taylor, K.J., Munro, A.F., Cunningham, C.A., Mallon, E.A., Twelves, C.J., Cameron, D.A., Thomas, J., and Bartlett, J.M.S. (2012). In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein–protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *132*, 463–470.

Spriggs, K.A., Stoneley, M., Bushell, M., and Willis, A.E. (2008). Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol. Cell* *100*, 27–38.

Stępiński, D. (2018). The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* *150*, 607–629.

Storck, S., Thiry, M., and Bouvet, P. (2009). Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biol. Cell* *101*, 153–171.

Su, H., Xu, T., Ganapathy, S., Shadfan, M., Long, M., Huang, T.H.M., Thompson, I., and Yuan, Z.M. (2014). Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* *33*, 1348–1358.

Sulima, S.O., Hofman, I.J.F., De Keersmaecker, K., and Dinman, J.D. (2017). How ribosomes translate cancer. *Cancer Discov.* *7*, 1069–1087.

Sun, Y., Atas, E., Lindqvist, L.M., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Meller, A. (2014). Single-molecule kinetics of the eukaryotic initiation factor 4A upon RNA unwinding. *Structure* *22*, 941–948.

Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghghat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G.J., and Sonenberg, N. (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* *7*, 382–394.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* *131*, 861–872.

Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2013a). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1438–1449.

- Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2013b). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1438–1449.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., and Kouzarides, T. (2014). Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* *505*.
- Therizols, G., Laforêts, F., Marcel, V., Catez, F., Bouvet, P., and Diaz, J.-J. (2015). Ribosomal RNA Methylation and Cancer. *Epigenetic Cancer Ther.* 115–139.
- Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *447*.
- Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* *2*, E71–E72.
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., and Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* *126*, 4815–4821.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., and Hurt, E.C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* *10*, 573–583.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* *72*, 443–457.
- Tran, H.D., Luitel, K., Kim, M., Zhang, K., Longmore, G.D., and Tran, D.D. (2014). Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Res.* *74*, 6330–6340.
- Trichopoulos, D., MacMahon, B., and Cole, P. (1972). Menopause and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* *48*, 605–613.
- Truitt, M.L., and Ruggero, D. (2016). New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 288–304.
- Truitt, M.L., Conn, C.S., Shi, Z., Pang, X., Tokuyasu, T., Coady, A.M., Seo, Y., Barna, M., and Ruggero, D. (2015). Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. *Cell* *162*, 59–71.
- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell* *22*, 725–736.
- Ueda, T., Sasaki, M., Elia, A.J., Chio, I.I.C., Hamada, K., Fukunaga, R., and Mak, T.W. (2010). Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 13984–13990.
- Ugrinova, I., Petrova, M., Chalabi-Dehar, M., and Bouvet, P. (2018). Multifaceted Nucleolin Protein and Its Molecular Partners in Oncogenesis (Elsevier Inc.).
- Vallejos, C.S., Gómez, H.L., Cruz, W.R., Pinto, J.A., Dyer, R.R., Velarde, R., Suazo, J.F., Neciosup, S.P., León,

- M., de la Cruz, M.A., et al. (2010). Breast Cancer Classification According to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association With Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database. *Clin. Breast Cancer* 10, 294–300.
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Bastien Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.-C., Rie Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells.
- Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 33, 6566–6578.
- Venkitaraman, A.R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171–182.
- Voit, R., and Grummt, I. (2001). Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13631–13636.
- Voit, R., Hoffmann, M., and Grummt, I. (1999). Phosphorylation by G 1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF.
- Vu, T., and Claret, F.X. (2012). Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 2, 62.
- Vu, T., and Datta, P.K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers (Basel)* 9.
- Walker, R.A., Lees, E., Webb, M., and Dearing, S.J. (1996). Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br. J. Cancer* 74, 1796–1800.
- Wen, P.Y., Omuro, A., Ahluwalia, M.S., Fathallah-Shaykh, H.M., Mohile, N., Lager, J.J., Laird, A.D., Tang, J., Jiang, J., Egile, C., et al. (2015). Phase I dose-escalation study of the PI3K/mTOR inhibitor voxalisib (SAR245409, XL765) plus temozolomide with or without radiotherapy in patients with high-grade glioma. *Neuro. Oncol.* 17, 1275–1283.
- Westman, B., Beeren, L., Grudzien, E., Stepinski, J., Worch, R., Zuberek, J., Jemielity, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R.E., et al. (2005). The antiviral drug ribavirin does not mimic the 7-methylguanosine moiety of the mRNA cap structure in vitro. *Rna* 11, 1505–1513.
- Wheater, M.J., Johnson, P.W.M., and Blaydes, J.P. (2010). The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biol. Ther.* 10, 728–735.
- White, R.J. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 69–78.
- Wise-Draper, T.M., Moorthy, G., Salkeni, M.A., Karim, N.A., Thomas, H.E., Mercer, C.A., Beg, M.S., O’Gara, S., Olowokure, O., Fathallah, H., et al. (2017). A Phase Ib Study of the Dual PI3K/mTOR Inhibitor Dactolisib (BEZ235) Combined with Everolimus in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Target. Oncol.* 12, 323–332.
- Wu, Y., Ginther, C., Kim, J., Mosher, N., Chung, S., Slamon, D., and Vadgama, J. V (2012). Expression of Wnt3

activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 10, 1597–1606.

Wu, Y., Sarkissyan, M., and Vadgama, J. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J. Clin. Med.* 5, 13.

Xiao, D., and He, J. (2010). Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 2, 154–159.

Xu, H., Di Antonio, M., McKinney, S., Mathew, V., Ho, B., O'Neil, N.J., Santos, N. Dos, Silvester, J., Wei, V., Garcia, J., et al. (2017). CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat. Commun.* 8.

Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: A new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 355–369.

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

Yan, Y., Svitkin, Y., Lee, J.M., Bisailon, M., and Pelletier, J. (2005). Ribavirin is not a functional mimic of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Rna* 11, 1238–1244.

Yang, D., Halaby, M., and Zhang, Y. (2006). The identification of an internal ribosomal entry site in the 5' untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* 25, 4613–4619.

Yang, H.-S., Jansen, A.P., Komar, A.A., Zheng, X., Merrick, W.C., Costes, S., Lockett, S.J., Sonenberg, N., and Colburn, N.H. (2003). The Transformation Suppressor Pcd4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 26–37.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.

Yang, M.-H., Hsu, D.S.-S., Wang, H.-W., Wang, H.-J., Lan, H.-Y., Yang, W.-H., Huang, C.-H., Kao, S.-Y., Tzeng, C.-H., Tai, S.-K., et al. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 12, 982–992.

Yang, Q., Huang, J., Wu, Q., Cai, Y., Zhu, L., Lu, X., Chen, S., Chen, C., and Wang, Z. (2014). Acquisition of epithelial–mesenchymal transition is associated with Skp2 expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 110.

Yao, J., Fazio, N., Singh, S., Buzzoni, R., Carnaghi, C., Wolin, E., Tomasek, J., Raderer, M., Lahner, H., Voi, M., et al. (2015). Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 387, 968–977.

Yao, J.C., Shah, M.H., Ito, T., Lombard-Bohas, C., Wolin, E.M., Van Cutsem, E., Hobday, T.J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E.G.E., et al. (2011). Everolimus for Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *N.*

Engl. J. Med. 364, 514–523.

Yardley, D.A., Noguchi, S., Pritchard, K.I., Burris 3rd, H.A., Baselga, J., Gnant, M., Hortobagyi, G.N., Campone, M., Pistilli, B., Piccart, M., et al. (2013). Everolimus Plus Exemestane in Postmenopausal Patients with HR+ Breast Cancer: BOLERO-2 Final Progression-Free Survival Analysis. *Adv. Ther.* 30, 870–884.

Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, K.S. (2010). Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. *Mol. Cell* 38, 768–774.

Yonath, A. (2009). Large facilities and the evolving ribosome, the cellular machine for genetic-code translation. *J. R. Soc. Interface* 6, S575-85.

Yoon, A., Peng, G., Brandenburg, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., and Ruggero, D. (2006). Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* (80-.). 312, 902–906.

Youliden, D.R., Cramb, S.M., Yip, C.H., and Baade, P.D. (2014). Incidence and mortality of female breast cancer in the AsiaPacific region. *J. Cancer Bio Meical* 11, 101–115.

Young, S.K., and Wek, R.C. (2016). Upstream open reading frames differentially regulate genespecific translation in the integrated stress response. *J. Biol. Chem.* 291, 16927–16935.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* (80-.). 339, 580–584.

Zabicki, K., Colbert, J.A., Dominguez, F.J., Gadd, M.A., Hughes, K.S., Jones, J.L., Specht, M.C., Michaelson, J.S., and Smith, B.L. (2006). Breast cancer diagnosis in women ≤ 40 versus 50 to 60 years: Increasing size and stage disparity compared with older women over time. *Ann. Surg. Oncol.* 13, 1072–1077.

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

Zhang, W., Feng, M., Zheng, G., Chen, Y., Wang, X., Pen, B., Yin, J., Yu, Y., and He, Z. (2012). Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial–mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 679–685.

Zheng, H., and Kang, Y. (2014). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* 33, 1755–1763.

Zucca-Matthes, G., Urban, C., and Vallejo, A. (2016). Anatomy of the nipple and breast ducts Gustavo. *Gland Surg.* 5, 32–36.