



HAL
open science

Hétérogénéité de composition du ribosome au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse

Chloé Morin

► **To cite this version:**

Chloé Morin. Hétérogénéité de composition du ribosome au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse. Santé. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10211 . tel-04577447

HAL Id: tel-04577447

<https://theses.hal.science/tel-04577447>

Submitted on 16 May 2024

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

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



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**Ecole Doctorale N° ED 340
(Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire)**

Discipline : Santé humaine

Soutenue publiquement le 10/11/2023, par :

Chloé MORIN

Hétérogénéité de composition du ribosome au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse

Devant le jury composé de :

CHAPAT Clément	Chargé de Recherche/Université de Toulouse/CBIT	Rapporteur
PLISSON-CHASTANG Célia	Directrice de Recherche/Université de Toulouse/CBIT	Rapporteuse
CARAMEL Julie	Chargée de Recherche/Université Lyon 1/CRCL	Examinatrice
DAVID Alexandre	Directeur de Recherche/Université de Montpellier/IGF	Examineur
VALCOURT Ulrich	Professeur des Universités/Université Lyon 1/ LBTI	Président du jury
MARCEL Virginie	Directrice de Recherche/Université Lyon 1/ CRCL	Directrice de thèse

RESUMES

Hétérogénéité de composition du ribosome au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse

par Chloé MORIN

Le ribosome est la machinerie cellulaire réalisant l'une des dernières étapes de l'expression génique : la traduction. Composé de 4 ARNs ribosomiques (ARNr) et 80 protéines ribosomiques chez l'Homme répartis en 2 sous-unités, le ribosome a pendant longtemps été vu comme un complexe ribonucléoprotéique homogène et invariable du fait de l'importance de sa composition dans sa structuration et donc sa fonction. Or, dès sa découverte dans les années 1950, plusieurs études suggéraient déjà une hétérogénéité de composition du ribosome. Il faudra néanmoins attendre les années 2000 pour que le dogme du ribosome invariant soit remis en cause par une vision plus hétérogène de sa composition. A l'heure actuelle, une hétérogénéité de composition du ribosome a été observée au niveau des ARNr et des protéines ribosomiques dans différents contextes physio-pathologiques, grâce à des techniques expérimentales ou omiques. Cependant, l'impact fonctionnel de ces modifications de composition du ribosome n'a pas toujours été caractérisé. Quelques rares études ont néanmoins permis de lier hétérogénéité de composition du ribosome et traduction préférentielle de certains ARN messagers. D'un point de vue phénotypique, il est clair que des anomalies des protéines ribosomiques, en particulier mutation et expression substœchiométrie, impactent le comportement cellulaire, aboutissant à des défauts développementaux par exemple. Le lien entre hétérogénéité de composition du ribosome et phénotype est moins démontré dans le cas des modifications chimiques des ARNr malgré une forte association entre 2'-O-ribose méthylation et cancer. Cependant, ces études ont été purement comparatives de deux états cellulaires distincts (*e.g.*, cancer *vs* sains) et n'ont pas permis d'évaluer l'importance de la composition du ribosome dans la dynamique cellulaire et/ou phénotypique.

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est à ce jour l'un des processus cellulaires dynamiques et réversibles les mieux caractérisés. L'EMT permet aux cellules épithéliales de se transdifférencier en cellules mésenchymateuses, afin, entre autres, de se mouvoir dans l'organisme. Ce processus physiologique est essentiel au cours de l'embryogenèse, la cicatrisation, mais également la progression métastatique. Décrite depuis

les années 1970, l'EMT est très bien caractérisée des points de vue épigénétique et transcriptomique. Cependant, bien que certaines études soulèvent le rôle de la machinerie traductionnelle au cours de l'EMT, aucune étude n'a permis de caractériser l'apport relatif de la régulation traductionnelle par rapport à la régulation transcriptionnelle, ni même les modulations de la composition du ribosome. Or, dans la mesure où plusieurs consortiums déplorent actuellement le manque de nouvelles approches permettant de mieux caractériser et comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et phénotypiques de l'EMT, l'étude de la traduction et du ribosome pourrait permettre d'apporter ce nouveau regard.

Les travaux réalisés au cours de mon doctorat démontrent tout d'abord l'existence d'une hétérogénéité de composition du ribosome au cours de l'EMT au niveau des ARNr et protéines ribosomiques, à la fois entre les états stables mais également au cours de la dynamique de l'EMT. L'hétérogénéité de composition du ribosome observée dans des échantillons de cancers du sein et des lignées cellulaires permet de différencier des cellules aux caractéristiques mésenchymateuses *versus* épithéliales. D'un point de vue moléculaire, nos données permettent également de définir que la régulation traductionnelle est au moins aussi importante que la régulation transcriptionnelle, quantitativement, au cours de l'EMT. Enfin, nos résultats montrent que la modification de composition du ribosome au niveau d'une seule protéine ribosomique permet l'initiation de l'EMT *in vitro*. L'ensemble de ces travaux soutiennent le fait que la plasticité de composition du ribosome contribue au changement d'identité cellulaire.

Summary

Heterogeneity of ribosome composition during epithelial-mesenchymal transition

by Chloé MORIN

The ribosome is the cellular machinery responsible for the last step of gene expression: translation. The human ribosome contains 4 ribosomal RNAs (rRNAs) and 80 ribosomal proteins which are separated in 2 subunits. This structure has been shown for a long time as a homogeneous and invariable ribonucleoproteic complex as its activity relies on its composition. However, since its discovery in the 1950's, several studies already suggested a heterogeneity in ribosome composition. Despite these observations, the dogma of a homogenous ribosome has been questioned only in the 2000's. Today, ribosome heterogeneity is observed at rRNA and ribosomal protein levels in various physio-pathological contexts, either through wet lab or omics experiments. Nonetheless, the functional impact of these ribosome composition modifications is not always characterized. Some rare studies demonstrated link between heterogeneous ribosome and preferential translation of some messenger RNAs. In a phenotypic point of view, it is clear that alterations in ribosomal protein composition, in particular gene mutations or substoechiometric expression, impact cellular behavior, leading to developmental defects for example. The link between heterogeneity in ribosome composition and phenotype is less described for rRNA modifications. However, a strong association between 2'-O-ribose methylation and cancer is documented. As these studies has been performed in a comparative point of view, they did not evaluate the importance of ribosome composition in cellular dynamic and/or phenotype.

To date, epithelial-mesenchymal transition (EMT) is one of the best characterized reversible and dynamic cellular process. EMT allows epithelial cells to transdifferentiate into mesenchymal cell to acquire new capacities such as motility. This physiological process is essential during embryogenesis and wound-healing, as well as metastatic progression. Described since the 1970's, EMT is well characterized at both epigenetic and transcriptomic levels. However, while several studies suggest a role for translational machinery during EMT, no study neither characterized the relative contribution of translational regulation compared to transcriptional one, nor the ribosome composition modulations. Therefore, while several

consortiums ask for new scientific approaches to decipher molecular, cellular and phenotypic events of EMT, the characterization of translation and ribosome may offer a new point of view for EMT characterization.

The studies performed during my PhD first demonstrate a heterogeneity in ribosome composition during EMT, at both rRNA and ribosomal protein levels, in both EMT stable states and dynamic EMT contexts. Ribosome heterogeneity is also observed in breast cancer samples and cell lines, and allow to distinguish cells showing mesenchymal traits from cells showing epithelial ones. In a molecular point of view, our results show that translational regulation is as quantitatively important as transcriptional regulation during EMT. Last but not least, our data demonstrate that the modification of the substoechiometry of only one ribosomal protein induces EMT *in vitro*. Altogether, our results sustain that ribosome composition plasticity contribute in cellular identity changes.

REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon jury de thèse : Mme Julie CAMEL, M. Clément CHAPAT, M. Alexandre DAVID, Mme Célia PLESSON-CHASTANG, et M. Ulrich VALCOURT. Je suis touchée que vous ayez accepté d'évaluer mon travail, aussi bien à l'écrit qu'à l'oral, et j'espère participer à votre culture scientifique en vous présentant mes travaux.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse (CST) : M. Anthony HENRAS et M. Ulrich VALCOURT. Merci à vous d'avoir su me guider avec tant d'entrain dans mon projet de thèse. Merci pour vos conseils avisés et vos commentaires constructifs au cours de ces trois années. Je profite également de ces quelques lignes pour remercier particulièrement M. Ulrich VALCOURT, sans qui mon aventure dans l'enseignement n'aurait certainement pas commencé si tôt (même si ce n'était pas l'envie qui manquait !). Merci à vous de m'avoir fait confiance et permis de me lancer dans le grand bain !

Je souhaite naturellement remercier la Ligue Nationale contre le Cancer pour avoir financé mes recherches au cours de ces trois années. Je remercie vos donateurs d'être aussi généreux et de donner une chance aux jeunes chercheurs de révolutionner la santé.

Ma profonde gratitude va également à mes collaborateurs car, sans eux, beaucoup d'avancées dans mes travaux n'auraient pas été possibles. Merci pour votre travail et votre engagement dans cette voie du ribosome et de l'EMT. Je suis sûre qu'elle réserve encore beaucoup de surprises !

Je souhaite ensuite exprimer mon immense reconnaissance envers ma directrice de thèse Mme Virginie MARCEL. Virginie... Je sais d'avance que je n'aurais pas assez d'un manuscrit pour te remercier comme il se doit. Merci pour absolument TOUT ! Ta patience (et je sais qu'il t'en a fallu pour m'apprendre à écrire comme une vraie scientifique, et pour me supporter depuis la L3 !), ton management (tu as toujours des années d'avance !), ta confiance (je pense que tu en as plus en tes collaborateurs qu'ils n'en auront jamais en eux-mêmes), ton éternel optimisme (même quand tout semble s'effondrer), ta gentillesse, ta bonne humeur et tellement d'autres choses ! Merci d'avoir pris le temps, et de continuer de le prendre. Merci d'être aussi attentionnée et aux petits soins avec tes collaborateurs de tous les jours. Je voudrais également te remercier pour m'avoir permis d'expérimenter tout ce que je souhaitais en dehors de la

science de laboratoire (enseignement, médiation, vulgarisation, etc.) : merci de m'avoir laissée faire ce qui me tenait à cœur et ce qui me plaisait, sans jamais me brider, et même en m'y incitant lorsque je doutais de mes capacités. J'ai conscience d'avoir eu énormément de chance de t'avoir comme directrice de thèse : on ne peut rêver mieux, c'est certain ! Ne change pas d'un pouce, tu es parfaite ! Je te souhaite de continuer encore très loin et de profiter à fond de toutes les vies que tu mènes de front (mais n'oublie pas de dormir de temps en temps !). Je ne manquerai pas de conter aux quatre coins du monde ô combien je suis honorée d'avoir pu réaliser une thèse magnifique, sous tous ses aspects, grâce à toi. N'oublie jamais que tu es un modèle pour beaucoup qui travaillent, ou ont travaillé, avec toi !

Je souhaiterais ensuite remercier Mme Caroline MOYRET-LALLE. Grâce à ton arrivée dans l'équipe, la biologie de l'EMT est beaucoup moins abstraite ! Merci de nous avoir appris à tous les rudiments de cette expertise plus que complexe. Je voudrais également te remercier en tant que responsable du Master Cancer : merci de m'avoir fait confiance pendant mes années d'étudiante et de m'avoir laissée partir à l'autre bout du monde. Merci pour nos échanges autour de réunions et cafés concernant la vie de la recherche (mais surtout la vie universitaire... !). Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes projets en cours et à venir !

Chère équipe « Ribosome, Traduction et Cancer », comment auraient été ces trois années de thèse sans toi ? Certainement bien moroses !

Tout d'abord, je tiens à remercier le chef d'orchestre de cette organisation : M. Jean-Jacques Diaz. Merci à toi de tenir les rênes de cette merveilleuse équipe, de continuer, même après toutes ces années, à faire le tour de chaque personne, tous les matins, pour nous saluer et de veiller à notre bien-être à tous. Merci de faire de cette équipe ce qu'elle est : une équipe soudée, organisée, rigoureuse mais surtout... heureuse. Merci également de nous laisser vivre nos vies parallèles : nos investissements au Green Lab, Médiation, etc. Merci de nous laisser expérimenter pour trouver ce que l'on aime et de nous faire une confiance aveugle. Tes blagues du vendredi me manqueront certainement lorsque je partirai, mais nul doute que je repasserai vous faire des coucous, de préférence le vendredi !

Ensuite, je souhaiterais remercier le trio de choc : Anne, Hélène et Nicole. Sans vous, la boutique tournerait moins bien (si ce n'est plus du tout) ! Merci pour votre investissement sans faille dans cette équipe. Nous ne sommes pas toujours faciles à vivre, mais vous avez toujours

su cadrer les uns et les autres. Un grand merci pour toute l'énergie que vous dépensez pour que rien n'explode (ou n'implose) !

Je voudrais remercier particulièrement Frédéric et Sébastien pour leur savoir infini ! Merci de nous partager vos expériences et connaissances sans compter au cours de nos *lab meeting*. Je suis sûre que vos débats scientifiques continueront encore longtemps, et permettront aux jeunes de découvrir le vrai visage d'un bon scientifique : débattre et se remettre en question. Je vous souhaite pleins de bonnes choses pour la suite de votre carrière qui, je l'espère, sera aussi riche en apprentissage pour vous que pour les personnes avec qui vous travaillez. Mais je ne doute pas que Fred soit maintenant prêt pour la suite grâce à son HDP (diplôme essentiel lorsque l'on gère le planning des *lab meeting*) !

Enfin, je voudrais remercier Fleur pour son soutien tout au long de ma thèse. Merci d'avoir partagé mon bureau pendant tout ce temps et de m'avoir supportée sans broncher ! Merci pour ton aide technique et psychologique. Merci pour nos parties de rigolade et pour ton entrain concernant tout ce qui avait attiré à du *team building* (mais aussi à la science, bien entendu !) !

Une personne en particulier de l'équipe RTC que j'aimerais remercier est Caroline, de son p'tit nom Caro (promis, Hermes ne dira rien sur sa signification !). Merci pour ta bonne humeur éternelle ! Toujours souriante, toujours dynamique : j'ai vraiment eu beaucoup de chance de t'avoir en voisine de bureau et collaboratrice ! Merci également de veiller à ce que nous ayons tous notre dose de sortie/visite/bar/soirée ! Heureusement que tu es là en tant que cheffe d'orchestre du *team building* ! Tu as été (et tu continueras j'en suis sûre !) là pour organiser les visites de Lyon pour nos visiteurs de toutes origines, les soirées apéros pour resserrer les liens de l'équipe (avec ou sans alcool bien sûr !) et les supers gâteaux que tu nous amènes (sans gluten, évidemment !) ! Continue de diffuser ton énergie à toute l'équipe, et n'oublie pas de recharger tes batteries de temps à autres !

Ensuite, je voudrais remercier Hermes. Un petit bout d'Albanie pour nous forcer quelques fois à expliquer nos blagues ou expressions françaises (ce qui devient tout de suite beaucoup moins drôle, n'est-ce pas ?). Merci d'avoir été là pour me sauver des analyses bio-informatiques ! Grâce à toi, je n'ai eu qu'à envoyer des échantillons au RiboMethSeq, et pouf ! les résultats arrivaient déjà tous beaux et analysés dans ma boîte mail ! C'est quand même magique ! Merci également pour tes chansons fredonnées toute la journée, et pour nos réunions autour du Saint Mots-fléchés ! Je te souhaite de trouver une entreprise digne de tes compétences

et de tes qualités humaines. Je suis sûre que l'équipe regrettera longtemps le départ de son bio-info préféré.

Je voudrais également remercier Camille. Merci d'animer nos longues heures d'ordinateurs grâce à tes problèmes de souris et d'enseignement ! Les journées sont beaucoup plus drôles ainsi ! Je te remercie également d'avoir su me relayer pour compter les pas de danse le jeudi soir et de m'avoir aidée à mener cette expérimentation dansante au mieux grâce à ton expérience. Je te souhaite une fin de thèse plus sereine qu'elle n'a commencée, et j'espère que tu pourras retourner du côté du sirop d'érable rapidement !

Enfin, j'aimerais remercier Laury. Bien que tu sois arrivée plus tard, et que nous ne partagions pas le même bureau, j'ai beaucoup apprécié nos échanges (plus ou moins) scientifiques. Je pense sincèrement qu'en rapport temps passé ensemble/entente, tu seras ma plus belle rencontre au cours de ma thèse ! Tes compétences artistiques de couture et crochet/tricot m'épatent... Je te souhaite plein de courage pour tes projets à venir, et j'espère pouvoir un jour te mettre la pâtée au CrossFit ! D'ici-là, continue bien de t'entraîner au *ori tahiti* !

Un petit mot également pour mes danseuses du labo (et de l'extérieur ! Je n'oublie pas notre exception Ju' !) : merci d'avoir résisté à mon apprentissage, et de continuer à venir avec autant d'entrain à nos sessions danse. Je suis sûre que l'équipe Diaz se souviendra longtemps de son team building aux couleurs de la Polynésie Française ! Cela me touche énormément que vous ayez autant accroché à ma culture. J'espère que vous trouverez l'envie de continuer de danser (le *ori tahiti* ou autre) car vous êtes toutes belles et gracieuses (quoi que vous en pensiez) !

Je souhaiterais également écrire un petit mot particulier pour les doctorants encore en cours dans l'équipe : Nur (même si tu étais déjà là avant moi !), Elie, Jordan et Lucie. Courage à vous ! Profitez de ces années (ou mois pour certains !) au sein de cette équipe merveilleuse. Vous allez en apprendre encore tellement ! Je vous souhaite d'avoir beaucoup de science à partager à la communauté. Et n'oubliez jamais que toute l'équipe sera derrière vous jusqu'au bout pour que tout se passe au mieux ! Pensez également à couper et souffler de temps à autres (n'est-ce pas ?!).

Je souhaiterais ensuite exprimer ma gratitude envers les stagiaires que j'ai pu encadrer au cours de ma thèse (Pierre, Camélia, Adeline, Julie, Charlotte), ainsi que les étudiants à qui j'ai pu enseigner ou que j'ai pu rencontrer. Merci à vous de m'avoir formée, de m'avoir fait confiance pour vous transmettre mes connaissances, chacun à votre manière. Sans vous, je

n'aurais évidemment pas appris autant en si peu de temps. Merci pour votre patience, et j'espère sincèrement vous avoir apporté autant que vous m'avez apporté. Je vous souhaite à tous bonne chance dans la suite de votre parcours, et de trouver votre voie.

Je tiens ensuite à remercier Déborah. Tu as été mon mentor pendant plus d'un an, que ce soit lors de mon stage, ou de ma thèse. Ton poussin voudrait te remercier pour tout ce que tu lui as appris ! Sans toi, je n'aurais certainement pas été aussi compétente et efficace dans le labo ! Et pourtant, je n'ai toujours pas réussi à battre ton record de 1 plaque qPCR en 7 minutes chrono ! Même si nous n'avons passé qu'un an ensemble, cela a suffi pour que nous nous trouvions. J'ai été extrêmement touchée de continuer à faire partie de ta vie personnelle après que tu sois partie vers d'autres horizons. Cette année, je pense qu'il me sera plus compliqué qu'avant de venir à l'anniversaire de Théa, mais nul doute que je serai avec vous par la pensée (et j'espère la visio !). Je te souhaite de trouver définitivement ta voie et de rester une amie comme on en rêve tous.

Ensuite, je voudrais remercier ma famille : mes parents, mon frère et ma sœur. Merci à vous tous d'avoir été là tout ce temps. Mes études ont été longues, mais elles touchent à leur fin ! Merci de m'avoir supportée (aussi bien financièrement que moralement) et d'avoir cru en moi toutes ces années. Merci de m'avoir soutenue à coup de chasse à l'œuf (même en visio !), de week-ends aux quatre coins de la France, de rigolade mais surtout de complicité. J'espère que vous êtes fiers de mon parcours, qui n'avait pas commencé simplement. Il faut croire qu'après tout, j'étais prédestinée à travailler en santé humaine ! J'espère que ce manuscrit vous permettra de comprendre un peu mieux ce que j'ai « cherché » pendant ces trois ans, mais je vous l'annonce déjà : non, je n'ai pas encore tout « trouvé ». Je vous aime du plus profond de mon cœur, que je sois ici ou ailleurs.

Mes derniers remerciements iront pour toi, Kirby. Je pense que ces dix dernières années auraient été bien ternes, et sûrement pas aussi fructueuses, sans toi. Merci de m'avoir toujours poussée à croire en moi : je ne pense pas que j'en serais arrivée là sans toi. Je ne vais m'étaler plus que ça, car je sais que tu n'as pas besoin de le lire pour savoir tout ce que j'ai à te remercier. Après ces dix années, une nouvelle décennie commence, avec un docteur (sans stéthoscope !) à tes côtés ! Je suis sûre que les prochaines années nous réservent pleins de surprises et de défis, personnels et professionnels, que nous surmonterons sans peine. *Ua here au ia oe.*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX _____	XVI
LISTE DES ABREVIATIONS _____	XIX
PREAMBULE _____	XXI
INTRODUCTION _____	1
CHAPITRE 1 : LE RIBOSOME, ELEMENT CENTRAL DE LA MACHINERIE TRADUCTIONNELLE _____	1
I. LA BIOGENESE DES RIBOSOMES _____	2
1. Composition et activité du ribosome _____	3
2. Synthèse, <i>processing</i> et maturation des ARNs ribosomiques _____	4
a. Synthèse des ARNs ribosomiques _____	4
b. <i>Processing</i> des ARNs ribosomiques _____	6
c. Maturation des ARNs ribosomiques : addition de modifications chimiques _____	7
3. Production des protéines ribosomiques _____	9
a. Synthèse des pré-ARNm codant pour les protéines ribosomiques _____	9
b. Maturation et <i>processing</i> des pré-ARNm codant pour les protéines ribosomiques _____	10
c. Maturation des protéines ribosomiques : ajout de modifications post-traductionnelles _____	11
4. Assemblage des ribosomes _____	12
II. ACTIVITE TRADUCTIONNELLE DU RIBOSOME : RELATION STRUCTURE- FONCTION _____	13
1. Initiation de la traduction _____	13
2. Elongation de la traduction _____	14
3. Terminaison de la traduction _____	15
III. LA REGULATION DE LA TRADUCTION _____	16
1. Régulation globale de la traduction _____	16
2. Régulation spécifique de la traduction _____	17
a. Régulation en 5'UTR _____	17
b. Régulation en 3'UTR _____	19

CHAPITRE 2 : DE L'HETEROGENEITE DE COMPOSITION DU RIBOSOME A LA NOTION DE RIBOSOME SPECIALISE ? _____ 21

I. HETEROGENEITE DES ARNS RIBOSOMIQUES _____	21
1. Variation des séquences nucléotidiques des ARNs ribosomiques _____	22
2. Variation des modifications chimiques des ARNs ribosomiques _____	24
a. Modifications des bases azotées des ARNs ribosomiques _____	25
b. Pseudo-uridylation des ARNs ribosomiques _____	27
c. Focus sur la 2'-O-ribose méthylation des ARNs ribosomiques _____	29
II. HETEROGENEITE DES PROTEINES RIBOSOMIQUES _____	32
1. Mutations des protéines ribosomiques et ribosomopathies : actualisation d'un dogme ?	33
2. Expression de paralogues et d'isoformes des protéines ribosomiques _____	35
3. Modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques _____	38
4. Variation de la stœchiométrie des protéines ribosomiques au sein du ribosome : un ribosome à moins de 80 protéines ? _____	40
5. Hétérogénéité de composition du ribosome et protéines ribosomiques : et RPL36A dans tout cela ? _____	43

CHAPITRE 3 : LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE _____ 47

I. ASPECT CELLULAIRE DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE _____	47
1. Organisation, morphologie et comportement des cellules épithéliales et mésenchymateuses _____	47
a. Les cellules épithéliales _____	49
b. Les cellules mésenchymateuses _____	51
2. Aspect dynamique de l'EMT _____	54
II. ASPECT MOLECULAIRE DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE _____	56
1. Voies de signalisation d'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse _____	56
2. Rôle majeur de la régulation de l'expression génique au cours de l'EMT _____	59
a. Transcription et épigénétique _____	59
b. Régulation post-transcriptionnelle des ARNm _____	62

III. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE _____	64
1. EMT type I _____	64
a. Les trois phases de l'EMT type I _____	65
b. EMT type I et pathologies développementales _____	67
2. EMT type II _____	68
3. EMT type III _____	71
IV. REGULATION TRADUCTIONNELLE : NOUVEAU CRITERE DE CARACTERISATION DE L'EMT ? _____	73
Revue scientifique : "Heterogeneity and dynamic of EMT through the plasticity of ribosome and mRNA translation" _____	73
a. Contexte _____	73
b. Résultats principaux _____	74
c. Ma contribution _____	75
d. Manuscrit _____	75
HYPOTHESES ET OBJECTIFS _____	95
RESULTATS _____	97
I. ARTICLE 1 : "DYNAMIC MODULATION OF RIBOSOMAL RNA 2'-O-RIBOSE METHYLATION DURING EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION" _____	97
1. Contexte _____	97
2. Résultats principaux _____	98
3. Ma contribution _____	99
4. Manuscrit (en préparation) _____	99
II. ARTICLE 2 : "TRANSLATIONAL REPROGRAMMING DURING EPITHELIAL- MESENCHYMAL TRANSITION IS ASSOCIATED WITH FINE-TUNING OF RIBOSOME COMPOSITION" _____	139
1. Contexte _____	139
2. Résultats principaux _____	139
3. Ma contribution _____	140
4. Manuscrit (en préparation) _____	141

DISCUSSION _____ **195**

I. HETEROGENEITE DE COMPOSITION EN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE ET DYNAMIQUE DE L'EMT _____ **195**

1. Hétérogénéité de composition du ribosome entre les états finaux de l'EMT : épithélial *versus* mésenchymateux _____ 195
 - a. Hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr _____ 196
 - b. Hétérogénéité des protéines ribosomiques _____ 199
2. Hétérogénéité de composition du ribosome en contexte dynamique _____ 200
 - a. Hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr _____ 200
 - b. Hétérogénéité des protéines ribosomiques _____ 201
3. Modifications chimiques des ARNr et protéines ribosomiques : 2 faces d'une même pièce ? _____ 202

II. HETEROGENEITE DE COMPOSITION DU RIBOSOME : UN NOUVEL INDUCTEUR DE L'EMT ? _____ **204**

1. Hétérogénéité des protéines ribosomiques _____ 205
2. Hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr _____ 208

CONCLUSION _____ **209**

ANNEXES _____ **211**

I. LISTE DES PUBLICATIONS _____ **211**

1. Revue de la littérature : "snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management" _____ 211
 - a. Contexte _____ 211
 - b. Résultats principaux _____ 212
 - c. Ma contribution _____ 213
 - d. Manuscrit _____ 213
2. Article : "Box C/D small nucleolar RNA-induced ribosomal RNA 2'Ome contributes to tyrosine kinase resistance in lung cancer" _____ 239
 - a. Contexte _____ 239
 - b. Résultats principaux _____ 239
 - c. Ma contribution _____ 240

d. Manuscrit (en préparation) _____	240
3. Rapport d'activité : 5 ^{ème} Symposium International du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) _____	289
a. Contexte _____	289
b. Résultats principaux _____	289
c. Ma contribution _____	290
d. Manuscrit _____	290
II. LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS _____	309
1. Poster : "A single ribosomal protein is sufficient to trigger EMT" _____	309
a. Contexte _____	309
b. Résultats principaux _____	309
c. Ma contribution _____	310
d. Poster _____	310
2. Présentation : 3 ^{ème} Symposium snoRibo _____	313
a. Contexte _____	313
b. Résultats principaux _____	313
c. Ma contribution _____	314
d. Présentation _____	314
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	317

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la biogenèse du ribosome. _____	2
Figure 2 : Schéma de la structure interne du ribosome en cours de traduction. _____	4
Figure 3 : Représentation des différentes modifications des ARN ribosomiques. _____	8
Figure 4 : Schéma des principales étapes de la traduction. _____	14
Figure 5 : Représentation schématique des modifications chimiques des ARNr et leur impact, avéré ou potentiel, sur l'activité traductionnelle du ribosome et le phénotype. _____	22
Figure 6 : Représentation schématique de l'hétérogénéité de composition protéique du ribosome et son impact, avéré ou potentiel, sur l'activité traductionnelle du ribosome et le phénotype. _____	33
Figure 7 : Histogramme du nombre de transcrits par millions (TPM) médian pour les gènes RPL36A et RPL36AL dans différents tissus sains humains. _____	36
Figure 8 : Schémas de l'organisation cytosquelettique des cellules épithéliales et mésenchymateuses. _____	48
Figure 9 : Schémas de la transition épithélio-mésenchymateuse au niveau cellulaire. _____	55
Figure 10 : Schéma des principales voies de signalisation impliquées dans l'EMT. _____	57
Figure 11 : Schéma représentatif des principaux EMT-TFs, leurs cibles et leur régulation. _____	61
Figure 12 : Schéma de l'EMT type I. _____	64
Figure 13 : Représentation schématique de l'EMT type II. _____	69
Figure 14 : Représentation schématique de l'EMT type III. _____	71
Figure 15 : Western blot sur profils de polysomes issus des lignées cellulaires hMEC et hMEC-ZEB1. _____	203
Figure 16 : Expression des EMT-TFs de la famille Snail dans le modèle cellulaire MCF10A surexprimant RPL36A (MCF10A-RPL36A). _____	206
Figure 17 : Ratio de l'expression de l'ARNm codant pour la luciférase Firefly par rapport à celui de la luciférase Renilla dans la lignée HEK293T-RPL36A-Flag. _____	207
Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'hétérogénéité de composition du ribosome et son rôle au cours de l'EMT. _____	210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de démonstrations d'hétérogénéité de composition du ribosome et de ribosome spécialisé. _____ 45

Tableau 2 : Description moléculaire des craniosynostoses les plus communes chez l'Homme. _____ 68

LISTE DES ABREVIATIONS

#

2'Ome : 2'-O-ribose méthylation

4E-BP : *4E-binding protein*

5'TOP : *5' terminal oligopyrimidine tract*

A

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

B

BAT : *TGFβ Activated Translation*

C

COPD : broncho-pneumopathie chronique obstructive

D

DBA : anémie de Diamond-Blackfan

E

E-cadhérine : cadhérine épithéliale

eEF : *eukaryotic Elongation Factor*

EGF : *Epidermal Growth Factor*

EGFR : *EGF Receptor*

eIF : *eukaryotic Initiation Factor*

EMT : *Epithelial-Mesenchymal Transition*

EMT-TF : *EMT Transcription Factor*

EndMT : *Endothelial-to-Mesenchymal Transition*

F

FBL : fibrillarine

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FGFR : *FGF Receptor*

H

hMEC : *human Mammary Epithelial Cells*

hnRNP : *heterogenous nuclear RNP*

I

IGF1R : *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

ITAF : *IRES Trans-Acting Factor*

M

m⁶A : N6-méthyladénosine

MEC : matrice extra-cellulaire

miARN : microARN

MMP : *Matrix MetalloProteinase*

mTOR : *mammalian Target Of*

Rapamycin

N

N-cadhérine : cadhérine neurale

P

PABP : *Poly(A) Binding Protein*

R

RBP : *RNA Binding Protein*

RP : *Ribosomal Protein*

RPL : *RP of the Large subunit*

RPS : *RP of the Small subunit*

RNP : *RiboNucleo Protein*

S

Site A : *Amino-acyl tRNA binding site*

Site E : *tRNA Exit site*

Site P : *Peptidyl tRNA binding site*

snoARN : *small nucleolar ARN*

snRNP : *small nuclear RNP*

SNV : *single nucleotide variant*

T

TAF : *TBP Associated Factors*

TBP : *TATA Binding Protein*

TGF β : *Transforming Growth Factor β*

TGF β R : *TGF β Receptor*

U

uORF : *upstream Open Reading Frame*

UTR : *UnTranslated Region*

Z

ZEB : *Zinc-finger E-box Binding
homeobox*

ZO : *zonula occludens*

PREAMBULE

« Ribosome » et « transition épithélio-mésenchymateuse » sont deux concepts *a priori* éloignés l'un de l'autre.

D'un côté, le ribosome est la machinerie cellulaire réalisant la dernière étape de l'expression génique : la traduction d'un ARN messenger en protéine. Cette machinerie aux multiples composants a été vue pendant de nombreuses décennies comme invariable, à la fois en termes de composition et d'activités. Cependant, de récentes études font émerger une hétérogénéité de composition et un rôle plus fin du ribosome, à la fois acteur de la synthèse protéique et régulateur de la spécificité de traduction. La compréhension de ces mécanismes n'en est qu'au balbutiement, et le rôle du ribosome dans la spécification de phénotypes particuliers n'a été que peu étudié.

De l'autre, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus physiopathologique nécessaire à la genèse d'un nouvel individu et au maintien de l'intégrité des organes, mais également la progression tumorale. Permettant aux cellules épithéliales d'acquérir, entre autres, des capacités migratoires, l'EMT constitue un enjeu de santé publique majeur, y compris dans la compréhension de la formation des métastases et de la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. A l'heure actuelle, les recherches sur l'EMT se heurtent à un manque de nouveaux marqueurs moléculaires pour affiner les connaissances et la caractérisation de l'hétérogénéité de ce processus.

Au travers de mes travaux de thèse, je propose de réunir ces deux domaines scientifiques afin de proposer de nouvelles approches permettant une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, cellulaires et phénotypiques, à la fois dans le domaine du ribosome et dans celui de l'EMT. Mes recherches s'attèlent à démontrer (i) l'existence d'une hétérogénéité de composition du ribosome au cours de l'EMT ; (ii) l'impact sur l'EMT de la modification de composition du ribosome ; et (iii) l'existence d'une régulation traductionnelle au moins aussi importante que la régulation transcriptionnelle au cours de l'EMT.

Ce manuscrit se découpe en trois sections. La première constitue l'introduction, découpées en trois chapitres présentant le ribosome et la traduction (Chapitre 1), l'hétérogénéité de composition du ribosome (Chapitre 2), et enfin l'EMT (Chapitre 3). La deuxième section de

ce manuscrit constitue les résultats obtenus au cours de mes trois années de doctorat. Cette section présente les deux articles en préparation regroupant les données obtenues concernant le lien entre (i) 2'-O-ribose méthylation et EMT, et (ii) composition protéique du ribosome et EMT. Enfin, la dernière section de ce manuscrit permettra la discussion des résultats obtenus au regard des données de la littérature et des limites expérimentales rencontrées.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le ribosome, élément central de la machinerie traductionnelle

Le ribosome est la machinerie cellulaire réalisant la dernière étape de l'expression génique : la traduction. Ce processus correspond à la synthèse d'un néo-peptide sur la base du décodage d'un ARN messager (ARNm) et assure ainsi la synthèse protéique. Élément clé de cette néo-synthèse, le ribosome réalise à la fois le décodage de l'ARNm *via* des ARN de transfert (ARNt) et la ligation des acides aminés entre eux. La première mise en évidence des ribosomes remonte à 1941 lorsque Albert Claude isola des « microsomes », définis comme des granules cytoplasmiques enrichis en ARN (Claude, 1941, 1943). Dans le même temps, d'autres études permettent de définir une corrélation entre concentration localisée d'ARN et synthèse protéique (Brachet, 1941; Caspersson, 1941; Caspersson & Schultz, 1939). Il faudra par la suite attendre une dizaine d'années pour déterminer que ces « microsomes » sont eux-mêmes constitués d'ARN et de protéines, et obtenir les premières photographies de ces structures (*i.e.*, microscopie électronique) (Palade, 1955; Schachman *et al.*, 1952). Depuis lors, de nombreuses études ont contribué à caractériser la composition exacte ainsi que les processus moléculaires permettant la biogenèse de ces « microsomes », rebaptisés « ribosomes » en 1958 (Biophysical Society, 1958). Il est dorénavant admis que les ribosomes sont présents de façon libre dans le cytoplasme, mais également attachés au réticulum endoplasmique granuleux, un compartiment cellulaire assurant l'exportation des protéines vers les organites, la membrane cellulaire et le milieu extracellulaire.

Dans ce chapitre, je détaillerai la composition et la biogenèse du ribosome, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans la traduction des ARNm en protéines. Ce chapitre relevant principalement de dogmes et démonstrations datant de plusieurs dizaines d'années, mes propos pourront être redondants avec des publications déjà existantes, mais permettront d'avoir un aperçu général de la structure et l'activité du ribosome qui sont des aspects essentiels abordés dans mes travaux de thèse.

I. La biogenèse des ribosomes

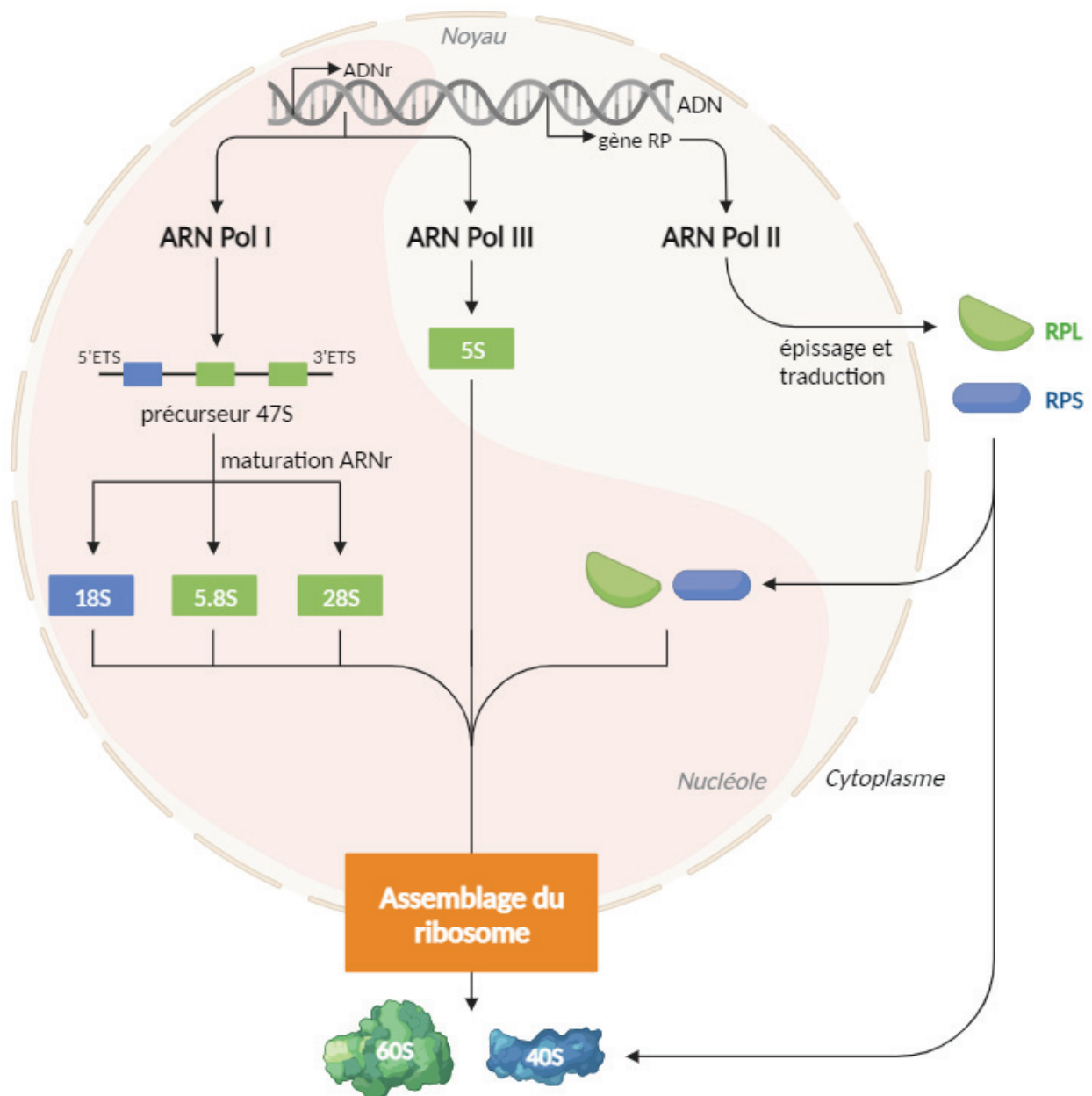


Figure 1 : Schéma de la biogenèse du ribosome. Les constituants du ribosome sont transcrits par les trois ARN polymérases (I, II ou III). L'ARN polymérase I assure la transcription nucléolaire du précurseur 47S qui, après maturation, donnent les ARNr 5.8S, 18S et 28S. L'ARNr 5S est quant à lui transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase III. Les gènes codant pour les protéines ribosomiques sont transcrits par l'ARN polymérase II puis maturés et traduits dans le cytoplasme. Une partie des protéines ribosomiques est ensuite transloquée dans le noyau pour s'assembler au ribosome de façon précoce, tandis que d'autres sont incorporées de façon tardive dans le cytoplasme cellulaire. 3'ETS : 3' External Transcript Spacer ; 5'ETS : 5' External Transcript Spacer ; ADNr : ADN ribosomique ; ARN Pol : ARN polymérase ; ARNr : ARN ribosomique ; RP : protéine ribosomique ; RPL : RP de la grande sous-unité ribosomique ; RPS : RP de la petite sous-unité ribosomique. Adapté de (Morin et al., 2022).

La biogenèse est le processus moléculaire permettant la genèse d'un nouveau ribosome, un complexe comprenant de nombreux et divers composants. La biogenèse des ribosomes a lieu principalement dans les nucléoles (*i.e.*, domaines nucléaires spécialisés dans les étapes de biogenèse du ribosome) et font intervenir plus de 300 facteurs protéiques et 200 ARNs non codants (Fromont-Racine *et al.*, 2003; Kressler *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 2013). Ces différentes étapes sont résumées dans la Figure 1. La biogenèse du ribosome est un processus multi-étapes incluant la synthèse des différents composants du ribosome, leur maturation et leur assemblage.

1. Composition et activité du ribosome

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques constitués, chez l'Homme, de 4 ARN non codants (*i.e.*, ARN ribosomiques, ARNr) et de 80 protéines ribosomiques. Au sein du règne vivant, les ribosomes présentent des compositions différentes en fonction de l'espèce, et en particulier entre les procaryotes et eucaryotes. Ainsi, la taille du ribosome est définie selon son coefficient de sédimentation, exprimé en unité de Svedberg (S). Les ribosomes procaryotes sont nommés 70S, tandis que ceux des eucaryotes sont de 80S. Le ribosome 80S est lui-même composé de deux sous-unités : une petite (40S) et une grande (60S). Chez l'Homme, la petite sous-unité 40S est composée de l'ARNr 18S et de 33 protéines ribosomiques, tandis que la grande sous-unité 60S contient 3 ARNr (*i.e.*, 5S, 5.8S et 28S) et 47 protéines ribosomiques.

Ces composants assurent la structuration très particulière du ribosome sur laquelle repose ses différentes activités de traduction. Le ribosome contient ainsi plusieurs domaines fonctionnels qui ont été décrits notamment grâce aux études structurales du ribosome, permises par le développement de diverses technologies, comme la cryo-électro-microscopie, la plus récente (Anger *et al.*, 2013; Ben-Shem *et al.*, 2011; Khatter *et al.*, 2015). Le *core* du ribosome, où s'effectue le décodage des ARN messagers (ARNm) et la formation de la liaison peptidique, est fortement conservé au cours de l'évolution. On distingue dans le ribosome, le site d'entrée de l'ARN de transfert (ARNt) aminoacylé, c'est-à-dire associé à son acide aminé (site A ; *i.e.*, aminoacyl) ; le site d'assemblage du nouvel acide aminé sur l'ARNt peptidylé, c'est-à-dire portant le peptide néo-synthétisé (site P ; *i.e.*, peptidyl) ; et le site permettant le relargage de l'ARNt dépourvu du néo-peptide (site E ; *i.e.*, *exit*) (Figure 2). Ces trois sites catalytiques sont localisés à l'interface des deux sous-unités. En particulier, le centre de décodage, assurant la

vérification de l'homologie de séquence entre l'ARNt aminoacylé et l'ARNm en cours de traduction, est porté par la petite sous-unité, tandis que la grande sous-unité porte l'activité peptidyl-transférase permettant l'ajout des acides aminés entrants au peptide néo-synthétisé (Barta *et al.*, 1984). La genèse d'un ribosome est donc primordiale pour assurer l'ensemble de ces fonctions et repose sur la coordination de la synthèse et de l'assemblage des différents constituants du ribosome.

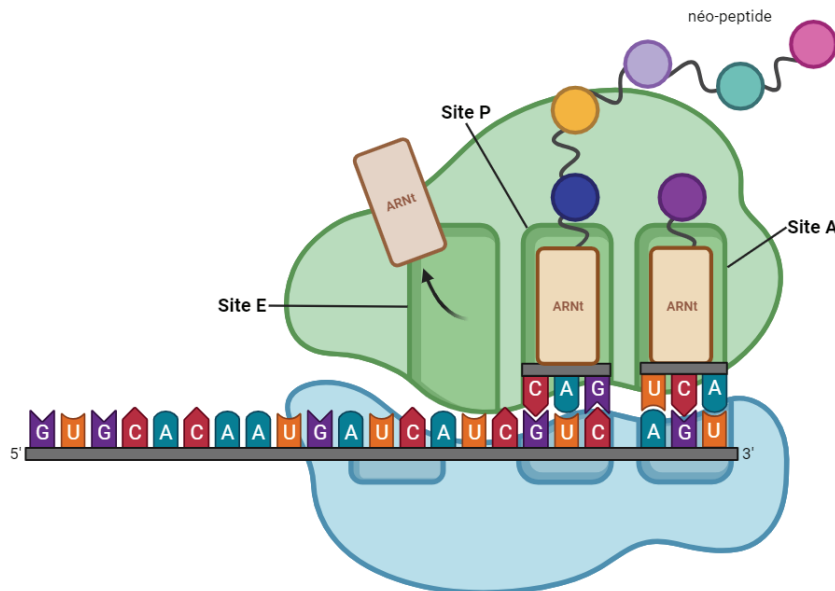


Figure 2 : Schéma de la structure interne du ribosome en cours de traduction. ARNt : ARN de transfert. Adapté de BioRender.

2. Synthèse, *processing* et maturation des ARNs ribosomiques

Les ARNs ribosomiques (ARNr) sont les composants principaux des ribosomes. En effet, non seulement ils représentent le composant le plus abondant dans le ribosome mais assure aussi la conformation structurale du ribosome et contribuent à son activité enzymatique (Barta *et al.*, 1984; Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Kruger *et al.*, 1982). La biogenèse des 4 ARNr inclue leur transcription, *processing* et maturation pour assurer la formation d'un ribosome complet et fonctionnel.

a. Synthèse des ARNs ribosomiques

Les ARNr sont synthétisés par l'ARN polymérase I dans le nucléole (*i.e.*, ARNr 5.8S, 18S et 28S, issus d'un même précurseur 47S) et l'ARN polymérase III dans le noyau (*i.e.*, ARNr 5S) (Figure 1).

Les séquences codantes pour le précurseur 47S contenant les séquences des ARNr 5.8S, 18S et 28S constituent l'« ADN ribosomique » (ADNr), et sont répétées en tandem sur les 5 chromosomes acrocentriques (*i.e.*, chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) (Stults *et al.*, 2008). Au total, il existe chez l'Homme entre 200 et 400 copies d'ADNr codant pour le précurseur 47S. L'initiation de la transcription du précurseur 47S repose sur la fixation de deux facteurs de transcription sur la région promotrice des ADNr (*Upstream Control element*, UPC) : UBF (*Upstream Binding Factor*) et SL1 (*Selectivity factor 1*) (Raška *et al.*, 2004). Le complexe SL1, composé de la protéine TBP (*TATA Binding Protein*) et de cinq facteurs associés nommés TAF (*TBP Associated Factors*), recrute spécifiquement l'ARN polymérase I par interaction avec le promoteur de l'ADNr et la protéine UBF (Friedrich *et al.*, 2005). L'interaction de SL1 avec l'ARN polymérase I est médiée par la protéine hRRN3 qui se dissociera du complexe une fois l'élongation initiée (Miller *et al.*, 2001). L'élongation de la transcription prend fin lorsque l'ARN polymérase I rencontre le site de terminaison en 3' du gène. L'ARN polymérase I se dissocie alors de l'ADNr *via* l'interaction avec les facteurs TTF1 et PRTF (Russell & Zomerdijk, 2006).

L'ARN 5S est synthétisé de façon indépendante par l'ARN polymérase III à la périphérie des nucléoles (Figure 1). Contrairement à l'ARN polymérase I, l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase III requiert quatre facteurs (*i.e.*, TFIIIA/B/C1/C2). En particulier, le facteur TFIIIB permet le recrutement de l'ARN polymérase III sur l'ADN (Oettel *et al.*, 1997).

La régulation de la transcription des gènes codant pour les ARNr est primordiale pour la cellule. En effet, cette régulation permet à la cellule d'adapter sa quantité de ribosomes produits à ses besoins, notamment lors de la prolifération cellulaire qui nécessite une synthèse protéique accrue et donc une quantité importante de ribosomes (Ruggero, 2012; Thomas, 2000).

La régulation de l'activité de l'ARN polymérase I est une voie majeure de la régulation de la biogenèse des ribosomes. Tout d'abord, du fait du nombre important de copies d'ADNr présentes dans le génome, il est communément admis que l'épigénétique et l'organisation de la chromatine jouent un rôle central dans la régulation du nombre de locus d'ADNr accessibles, et donc du taux de transcription de l'ADNr. En particulier, l'acétylation des histones H4 (*i.e.*, H4K16) associée à une di-méthylation des histones H3 (*i.e.*, H3K4) permettent l'ouverture de la chromatine, et donc l'accessibilité des ADNr (Grummt & Längst, 2013). À l'inverse, l'acétylation et la tri-méthylation de l'histone H3 sont généralement associées à une

densification de la chromatine, et une réduction de l'accessibilité aux ADNr. Ainsi, les processus épigénétiques régulant l'accessibilité des locus d'ADNr font intervenir un nombre considérable de facteurs épigénétiques. D'autres mécanismes de régulation épigénétique ont été décrits. En particulier, la protéine nucléoline (NCL) maintient les ADNr à l'état d'euchromatine (*i.e.*, état décondensé de la chromatine) (Cong *et al.*, 2012), *via* son interaction avec l'histone H1 (Erard *et al.*, 1988) et sa capacité à stabiliser les structures G-quadruplexes présentes dans les ADNr (Drygin *et al.*, 2009; Ebastien Storck *et al.*, 2009; Rickards *et al.*, 2007).

En plus d'une régulation épigénétique, la régulation de la transcription correspond à un autre moyen de réguler la synthèse du précurseur 47S. Le recrutement de l'ARN polymérase I repose sur les facteurs UBF et SL1, dont la régulation permet la modulation de la transcription. En effet, de nombreuses modifications post-traductionnelles de ces facteurs ont été décrites, et régulent l'activation ou l'inactivation de ces facteurs au niveau protéique (Russell & Zomerdijk, 2006). Par exemple, au cours de la mitose, SL1 est phosphorylée en position Thr852 par le complexe CDK1/cycline B, inhibant son interaction avec UBF, et donc le recrutement de l'ARN polymérase I au promoteur de l'ADNr (Heix *et al.*, 1998). Ce mécanisme permet ainsi d'inhiber la biogenèse du ribosome lors de la mitose. A l'inverse, la phosphorylation de UBF par les complexes CDK4/cycline D1 et CDK2/cycline E&A réactive la transcription lors du passage de la phase G1 à la phase G2/M du cycle cellulaire (R. Voit & Grummt, 2001; Renate Voit *et al.*, 1999). Tout comme l'activité de l'ARN polymérase I, l'activité de l'ARN polymérase III est régulée, notamment par des facteurs de transcription comme p53 ou c-Myc (Arabi *et al.*, 2005; Cairns & White, 1998; Van Riggelen *et al.*, 2010; R. J. White, 2005; Zhai & Comai, 2000). Par exemple, p53 interagit directement avec le co-facteur TFIIB, inhibant son incorporation dans le complexe d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase III (Cairns & White, 1998). A l'inverse, c-Myc est connu comme un promoteur de la transcription, capable de recruter le facteur TFIIB aux promoteurs et ainsi favoriser le recrutement de l'ARN polymérase III (Gomez-Roman *et al.*, 2003).

b. *Processing* des ARNs ribosomiques

Le *processing* des ARNr repose sur le clivage du précurseur 47S par différentes endo- et exonucléases. Au total, 12 sites de clivage ont été recensés sur ce précurseur. La reconnaissance de ces sites de clivages repose sur l'interaction séquence-spécifique d'ARNs non codants (*i.e.*,

small nucleolar RNA, snoARN) avec le précurseur 47S (Mullineux & Lafontaine, 2012). Cette interaction permet le recrutement spécifique des différentes nucléases au site d'intérêt.

Tout d'abord, le précurseur 47S est clivé aux extrémités 3' et 5' par des exonucléases, permettant l'élimination des régions 3'ETS et 5'ETS (*i.e.*, *External Transcript Spacer*) : on parle alors de précurseur 45S. A ce jour, deux voies de *processing* ont été documentées pour le précurseur 45S (Bowman *et al.*, 1981; Hadjiolova *et al.*, 1993). Ces deux voies diffèrent par l'ordre des clivages réalisés, variations observées notamment entre différentes espèces (Henras *et al.*, 2015; Mullineux & Lafontaine, 2012). Dans les deux cas, ces voies aboutissent à la genèse des trois ARNr matures 5.8S, 18S et 28S.

c. Maturation des ARNs ribosomiques : addition de modifications chimiques

En plus des étapes de clivage détaillées ci-dessus, des modifications chimiques sont ajoutées sur les ARNr. Ces modifications ont pour vocation de stabiliser les structures secondaires et tertiaires des ARNr, et ainsi préserver les activités catalytiques du ribosome (Sloan *et al.*, 2017). De par leur rôle essentiel dans le maintien de la structure et donc l'activité du ribosome, ces modifications chimiques sont localisées spécifiquement dans les domaines fonctionnels du ribosome. Chez l'Homme, les modifications chimiques des ARNr sont au nombre de 212, pour un total de 7184 nucléotides (soit environ 2%) (Sharma & Lafontaine, 2015). La modification chimique la plus abondante est la 2'-O-ribose méthylation (106 sites), suivie de la pseudo-uridylation (104 sites) et des modifications de bases azotées (12 sites) (Krogh *et al.*, 2016; Taoka *et al.*, 2018).

Les modifications de bases azotées correspondent à des méthylations, des acétylations ou des amino-carboxyl-propylations d'un des atomes de carbone de la base purique ou pyrimidique (Taoka *et al.*, 2018). Elles sont catalysées par une enzyme spécialisée pour chacun des 12 sites (*i.e.*, enzyme « *stand alone* »). Du fait du faible nombre de sites recensés, peu de données existent sur ces modifications de l'ARNr, en particulier chez l'Homme.

La pseudo-uridylation correspond à l'isomérisation d'une base uridine en une base pseudo-uridine (Figure 3A). Cette réaction d'isomérisation est catalysée par des complexes ribonucléoprotéiques (RNP), qui contiennent tous une enzyme, la pseudo-uridine synthase DKC1, et trois protéines de structure (GAR1, NHP2, NOP10), ainsi qu'un snoARN guide à

boîte H/ACA (SNORA) qui assure la spécificité de chaque complexe (Figure 3B) (Taoka *et al.*, 2018). En effet, le snoARN assure la reconnaissance spécifique du site à modifier par homologie de séquence avec un ou plusieurs sites de l'ARNr. Les snoARNs interagissent avec l'ARNr *via* leurs séquences H/ACA. De plus, la structuration très particulière des SNORA leur permet d'interagir avec l'enzyme DKC1 et d'assurer son positionnement exact pour permettre la pseudo-uridylation de l'ARNr en un nucléotide donné.

La 2'-O-ribose méthylation (2'Ome) consiste en l'addition d'un groupement méthyl en position 2'-O d'un ribose (Figure 3C). De même que pour la pseudo-uridylation, cette réaction est catalysée par des complexes RNP contenant la méthyltransférase fibrillarine (FBL) et trois protéines de structure (NOP56, NOP58 et NHP2L1), ainsi qu'un snoARN guide à boîte C/D (SNORD), qui assure la reconnaissance du site de méthylation par complémentarité de séquence (Figure 3D). A ce jour, 106 sites (voire 112 selon les études) ont été recensés sur trois des ARNr (5.8S, 18S et 28S) humains (Sharma & Lafontaine, 2015; Taoka *et al.*, 2018).

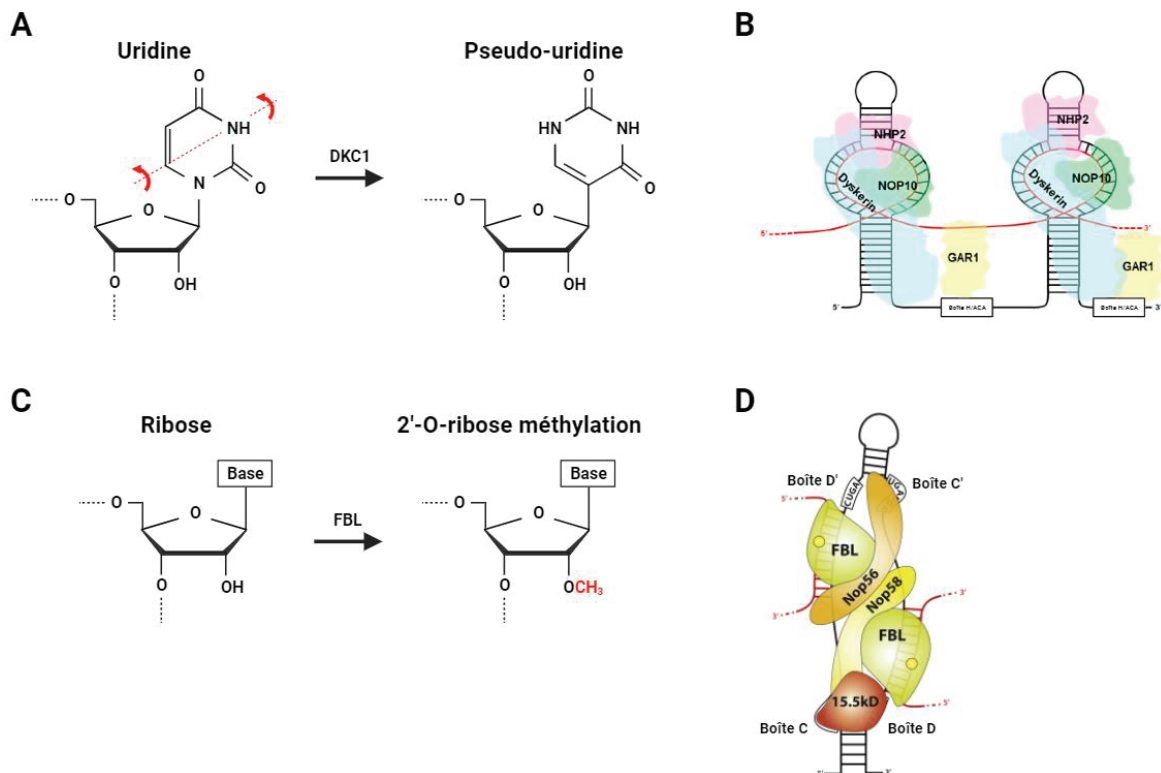


Figure 3 : Représentation des différentes modifications des ARN ribosomiques. **(A)** Représentation de la réaction de pseudo-uridylation. DKC1 : dyskérine. **(B)** Schéma du complexe catalysant la réaction de pseudo-uridylation. **(C)** Représentation de la réaction de 2'-O-ribose méthylation. FBL : fibrillarine. **(D)** Schéma du complexe catalysant la réaction de 2'-O-ribose méthylation. FBL : fibrillarine. Adapté de (Coley *et al.*, 2022) et (Lo Monaco *et al.*, 2018).

3. Production des protéines ribosomiques

Le ribosome eucaryote est composé de 80 protéines ribosomiques : 33 d'entre elles sont localisées dans la petite sous-unité 40S (*i.e.*, RPS) et 47 dans la grande sous-unité 60S (*i.e.*, RPL). Les protéines ribosomiques sont des constituants essentiels du ribosome, participant au maintien de la structure du ribosome *via* leur interaction avec les ARNr. Ces interactions entre protéines et ARNr assurent non seulement la stabilisation de la structure du ribosome, mais également le maintien de sa fonction.

a. Synthèse des pré-ARNm codant pour les protéines ribosomiques

Comme pour la grande majorité des autres protéines cellulaires, les protéines ribosomiques sont codées par des pré-ARNm synthétisés par l'ARN polymérase II. La transcription par l'ARN polymérase II repose sur le recrutement de cinq facteurs de transcription (*i.e.*, TFIIB/D/E/F/H) (Orphanides & Reinberg, 2002; Reese, 2003). Ces facteurs permettent des cycles de phosphorylation et déphosphorylation de l'ARN polymérase II au cours des trois étapes de transcription (*i.e.*, initiation, élongation, terminaison) qui constituent le moteur de la transcription dépendante de l'ARN polymérase II.

De la même façon que développé précédemment pour l'activité des ARN polymérases I et III, la transcription par l'ARN polymérase II est régulée par l'accessibilité des gènes mais également par son activité propre. Cette accessibilité est dépendante de l'état chromatinien et varie au cours du temps en fonction des besoins cellulaires (Grummt & Längst, 2013). Différents complexes protéiques, tels que FACT, SPT5 et SPT6, sont impliqués dans la régulation des modifications de la chromatine, tandis que d'autres régulent le ralentissement de l'élongation, comme DSIF, afin de permettre la bonne interaction entre les différents facteurs de la transcription (Sims *et al.*, 2004). L'activité de l'ARN polymérase II est également régulée de manière directe. Par exemple, une étude chez la levure a déterminé que les ARN polymérases II se fixent préférentiellement aux gènes codant pour les protéines ribosomiques, sous forme inactive. L'activation des ARN polymérases II dépend de la méthylation conjointe des sérines 2 et 5 du domaine C-terminal (Pelechano *et al.*, 2009). Cette spécificité de régulation pourrait jouer un rôle dans la synthèse rapide des protéines ribosomiques en réponse à un besoin cellulaire.

b. Maturation et *processing* des pré-ARNm codant pour les protéines ribosomiques

La maturation et le *processing* des pré-ARNm en ARNm codant pour les protéines ribosomiques sont réalisés de façon co-transcriptionnelle. Le complexe CDK9/cycline T permet, *via* son interaction avec l'ARN polymérase II, le recrutement des facteurs nécessaires à ces étapes (Orphanides & Reinberg, 2002).

Les étapes de maturation réalisées co-transcriptionnellement assurent la stabilisation des ARNm. Tout d'abord, il y a le coiffage de l'ARNm en 5' par l'interaction du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II avec différents facteurs (*i.e.*, phosphatases, guanylyltransférase, etc.) (Proudfoot *et al.*, 2002). Ensuite, la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II par le complexe CDK9/cycline T, favorise le recrutement des facteurs de polyadénylation en 3' de l'ARNm à l'origine de la formation de la queue poly-A (Ahn *et al.*, 2004).

En plus de l'ajout d'une coiffe et d'une queue polyadénylée, les pré-ARNm sont également épissés (*i.e.*, *processing*). En effet, chez la cellule eucaryote, l'épissage post-transcriptionnel des pré-ARNm est indispensable à la génération d'un ARNm codant pour une protéine fonctionnelle ; cette étape consistant à ne conserver que les séquences codantes (*i.e.*, exons) et retirer les séquences non-codantes (*i.e.*, introns) du pré-ARNm. Les événements d'épissage alternatif reposent sur l'activité de cinq *small nuclear RiboNucleicProteins* (snRNP ; *i.e.*, U1, U2, U4, U5 et U6) (Jurica & Moore, 2003). De façon simplifiée, le recrutement des snRNPs aux sites de clivage du pré-ARNm induit l'épissage en 5' et 3' de l'intron puis la re-ligation des extrémités 3' et 5' des exons. Le complexe snRNP est alors dissocié, puis réassemblé à un nouveau site de clivage (Jurica & Moore, 2003).

Ces différentes étapes de maturation et *processing* à l'origine de l'ARNm ont pour objectif de permettre l'obtention d'un ARNm reconnaissable par la machinerie traductionnelle et dont la traduction aboutira à la synthèse d'une protéine fonctionnelle. De plus, la régulation de l'élimination des introns au cours de l'épissage est impliquée dans la régulation de la biogenèse du ribosome *via* l'expression d'ARN non codants codés introniquement (Parenteau *et al.*, 2011; Petibon *et al.*, 2016). En effet, en plus de permettre la régulation des autres copies du même gène (*i.e.*, paralogues), les introns régulent également le *processing* des ARNr. En effet, chez la levure, la délétion des introns des ARNm codant pour les protéines ribosomiques

induit l'accumulation des formes non matures des ARNr (Petibon *et al.*, 2016). Cependant, l'impact de la délétion des introns semble être dépendant du gène ciblé. En effet, même si les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore totalement élucidés, il semble que la régulation du *processing* des ARNr soit dépendante de certains introns uniquement. Par exemple, la délétion des introns du gène RPL13A affecte le *processing* du précurseur 35S des ARNr, tandis que la délétion des introns du paralogue RPL13B affecte le précurseur 25.5/27S des ARNr (Petibon *et al.*, 2016).

A la suite de leur maturation et *processing*, les ARNm codant pour les protéines ribosomiques sont traduits. Cette étape est commune aux autres ARNm codants et est détaillée en Activité traductionnelle du ribosome : relation structure-fonction.

c. Maturation des protéines ribosomiques : ajout de modifications post-traductionnelles

A l'issue de la traduction des ARNm matures par la machinerie traductionnelle, les protéines ribosomiques néo-synthétisées seront, dans certains cas, post-traductionnellement modifiées. On ne compte actuellement pas moins de 2500 modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques (Hornbeck *et al.*, 2015; Simsek & Barna, 2017). Ces modifications chimiques incluent des phosphorylations, ubiquitinations, méthylations, acétylations, etc.

La mise en évidence des premières protéines ribosomiques modifiées chimiquement remonte au milieu des années 1970 via des techniques d'électrophorèse bi-dimensionnelle (Gressner & Wool, 1974). Cependant, l'essor des techniques de protéomique et de spectrométrie de masse ont permis récemment d'affiner la caractérisation de ces modifications post-traductionnelles (Odintsova *et al.*, 2003; Y. Yu *et al.*, 2005). Par exemple, la protéine de la petite sous-unité RPS28 présente une acétylation N-terminale, tandis que la protéine RPS25 est mono- ou di-méthylée entre les acides aminés 1514 et 1518 (Y. Yu *et al.*, 2005). Parmi les protéines modifiées de la grande sous-unité, on peut notamment citer RPL7, RPL10A et RPL13A qui présentent une acétylation et RPL29 une méthylation (Odintsova *et al.*, 2003).

Comme dans le cas des autres protéines cellulaires, il est communément admis que les modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques permettent la stabilisation de la

structure protéique. Une fois les protéines ribosomiques maturées, elles seront aptes à interagir et donc s'assembler avec les ARNr pour former les ribosomes.

4. Assemblage des ribosomes

Le processus d'assemblage des ribosomes débute dans le nucléole de la cellule (*i.e.*, phase précoce) et se termine dans le cytoplasme (*i.e.*, phase tardive). L'assemblage d'un ribosome complet nécessite la participation de plus de 200 facteurs dont des *RNA binding proteins* (RBP), des ATPases et GTPases, mais également des hélicases à ARN afin d'assembler correctement les 4 ARNr et les 80 protéines ribosomiques (Klinge & Woolford, 2019; Peña *et al.*, 2017). En raison de la complexité des mécanismes d'assemblage du ribosome, une description succincte est présentée ci-après.

L'assemblage de la petite sous-unité 40S et la grande sous-unité 60S du ribosome débute dès la transcription de leurs ARNr. En effet, différents complexes protéiques (*i.e.*, protéines chaperonnes) s'associent à différents domaines des ARNr au cours de leur transcription (*i.e.*, domaine 5', domaine central, domaines 3' majeur et 3' mineur pour l'ARNr 18S et domaines I à VI pour l'ARNr 28S) et permettent ainsi la conformation progressive de l'ARNr (Klinge & Woolford, 2019). On note ainsi la genèse d'une particule pré-40S contenant l'ARNr 18S et des protéines chaperonnes, et d'une particule pré-60S contenant les ARNr 5S, 5.8S et 28S. En plus d'être composées d'ARNr et de protéines chaperonnes, les particules pré-40S et pré-60S contiennent également des protéines ribosomiques qui sont incorporées au fur et à mesure des différentes étapes de conformation (*e.g.*, RPS3, RPS26, RPL4, RPL14, etc.) et dont l'importation nucléaire dépend de différents facteurs protéiques (Peña *et al.*, 2017). Les particules pré-40S et pré-60S sont ensuite exportées dans le cytoplasme afin que les dernières protéines ribosomiques puissent être incorporées dans le complexe. Les particules pré-40S et pré-60S seront alors maturées. Cette maturation consiste en leur association avec des sous-unités 40S ou 60S matures pour vérifier leur bonne conformation et de leur fonctionnalité. A l'issue de ces différentes étapes de contrôle qualité, les particules pré-40S et pré-60S sont dépourvues de leurs facteurs de conformation et ne sont plus constituées que des ARNr et des protéines ribosomiques : on parle alors de sous-unités matures (Klinge & Woolford, 2019; Peña *et al.*, 2017). Les sous-unités matures 40S et 60S sont alors utilisables pour la formation d'un ribosome complet et fonctionnel : le ribosome 80S, qui assure la traduction des ARNm en protéines.

II. Activité traductionnelle du ribosome : relation structure-fonction

La traduction est la dernière étape de l'expression génique et constitue une des dernières étapes de la régulation des gènes. Cette étape permet la synthèse d'une protéine *via* le décodage d'un ARN messager (ARNm), dont l'acteur principal est le ribosome. La traduction est divisée en trois étapes distinctes et successives : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

1. Initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est constituée des étapes comprises entre le recrutement du complexe de pré-initiation de la traduction (*i.e.*, 43S-PIC) et la reconnaissance du codon initiateur de la traduction (*i.e.*, AUG) par le ribosome 80S (Figure 4). Pour ce faire, la cellule eucaryote utilise la coiffe des ARNm (*i.e.*, traduction coiffe-dépendante).

L'initiation de la traduction peut être dépendante de la coiffe ou du motif m⁷GpppN présent en terminaison 5' de la quasi-totalité des ARNm. Ce motif particulier interagit avec le complexe PABP (*Poly(A) Binding Protein*), qui fixe lui-même la queue poly-A, induisant le repliement de l'ARNm sur lui-même. Cette circularisation de l'ARNm favorise le recyclage des ribosomes en fin de traduction. De plus, la coiffe interagit directement avec le complexe eIF4 (*eukaryotic Initiation Factor 4*), composé des sous-unités eIF4E, eIF4G et eIF4A, nécessaire au recrutement du ribosome (Kahvejian *et al.*, 2005).

En effet, le complexe de pré-initiation 43S-PIC (*Pre-Initiation Complex*), composé de la sous-unité 40S, un ARNt initiateur (ARNti) et des facteurs d'initiation eIF1/2/3/5, est recruté au niveau de la coiffe de l'ARNm *via* son interaction avec les complexes PABP et eIF4 (Rogers *et al.*, 1999, 2001). Le complexe 43S-PIC porte la capacité de reconnaissance du codon initiateur de la traduction AUG. Ainsi, lorsque le complexe 43S-PIC se fixe à l'ARNm au niveau de la coiffe, la sous-unité ribosomique 40S incluse dans ce complexe va scanner l'ARNm de 5' en 3' jusqu'à rencontrer le codon AUG initiateur. La détection du codon initiateur AUG induit l'hydrolyse du GTP associé au complexe eIF2, entraînant le relargage des facteurs eIF1/2/3/5 et l'arrêt du scan de l'ARNm par la sous-unité 40S (Jackson *et al.*, 2010; Passmore *et al.*, 2007). Dépourvue de ses co-facteurs, la sous-unité ribosomique 40S et son ARNti interagit alors avec la grande sous-unité ribosomique 60S associée au complexe eIF5B. Lorsque le ribosome 80S est formé, la phase d'élongation peut débuter.

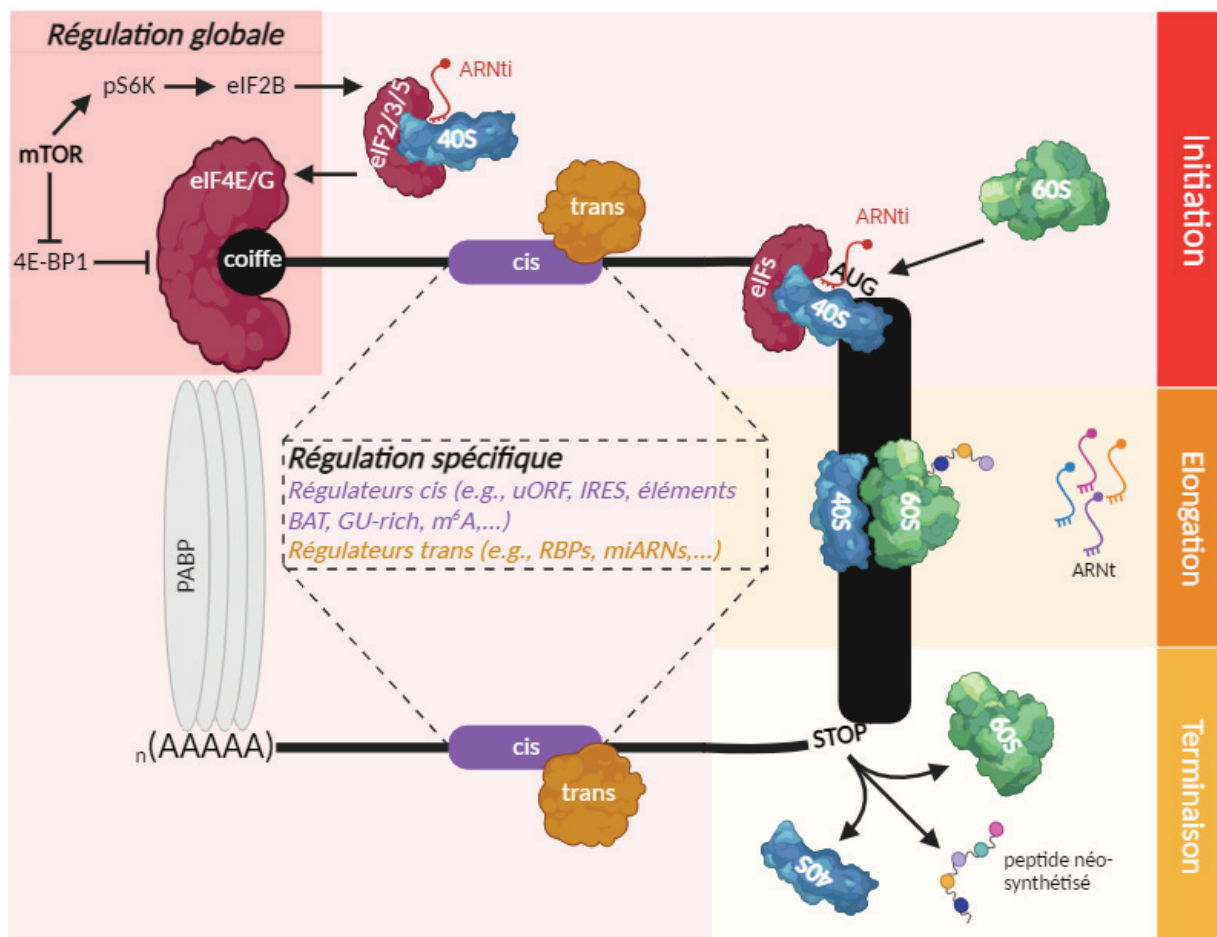


Figure 4 : Schéma des principales étapes de la traduction. La coiffe de l'ARNm est reconnue par le complexe d'initiation de la traduction eIF4E/G et permet le recrutement de la petite sous-unité 40S, associée aux complexes d'initiation eIF2/3/5 et à un ARNt initiateur (ARNti). La sous-unité 40S associée à ses co-facteurs initie la reconnaissance du codon AUG et recrute la grande sous-unité ribosomique 60S. Au cours de l'élongation, les ARNt aminoacétylé entrent dans le ribosome via le site A pour apporter le nouvel acide aminé, puis portent la chaîne polypeptidique en cours de synthèse dans le site P avant d'être relargués lorsqu'ils sont nus via le site E du ribosome. La terminaison de la traduction est initiée par la détection d'un codon STOP. Les deux sous-unités ribosomiques se dissocient et relarguent le néo-peptide. La régulation de la traduction est réalisée de façon globale par la voie de signalisation mTOR ou spécifique de certains ARNm via les éléments régulateurs en cis et trans. ARNm : ARN messenger ; ARNt : ARN de transfert ; ARNti : ARNt initiateur ; BAT : TGFβ-activated translational ; IRES : Internal Ribosome Entry Site ; m⁶A : N6-méthyladénosine ; miARN : microARN ; RBP : RNA binding protein. Adapté de (Morin et al., 2022).

2. Elongation de la traduction

L'élongation de la traduction est l'étape permettant le décodage de l'ARNm et la synthèse de la protéine (Figure 4). Cette étape débute dès la formation du ribosome 80S et se termine au codon STOP.

Au moment de l'association des deux sous-unités du ribosome sur le codon initiateur de l'ARNm, l'ARNt_i, transportant une méthionine, est fixé au site P de la petite sous-unité ribosomique 40S. Par la suite, chaque ARNt intègre le site A puis est successivement transféré vers les sites P puis E au cours de l'avancée du ribosome sur l'ARNm (Figure 2).

Cette succession d'étapes est médiée par les facteurs d'élongation (eEF) eEF1A et eEF2, mais également par le facteur d'initiation eIF5A (Dever *et al.*, 2018; Richter & Collier, 2015).

eEF1A est associé aux ARNt chargés présents dans le cytoplasme cellulaire. Ainsi, à chaque nouvel ajout d'un acide aminé, un complexe eEF1A-ARNt entre dans le site A du ribosome. Si l'ARNt s'hybride avec l'ARNm par complémentarité de séquence, alors la reconnaissance ARNt-ARNm induit le relargage de eEF1A et un changement conformationnel de l'ARNt (Dever *et al.*, 2018). Dans le cas d'un mésappariement, eEF1A n'est pas relargué et le complexe eEF1A-ARNt ressortira du site A pour laisser un autre complexe entrer.

Le changement conformationnel de l'ARNt induit par l'interaction ARNt-ARNm initie la formation d'une liaison amide entre le nouvel acide aminé apporté et le peptide en cours de synthèse, porté par l'ARNt du site P. L'ARNt du site A devient porteur de la chaîne polypeptidique.

Cette liaison induit un changement de localisation de l'ARNt porteur du peptide néo-synthétisé. En effet, une fois la phase de décodage et de formation de la liaison peptidique terminée, le facteur eIF5A s'intègre dans le site E du ribosome et induit la translocation du ribosome de 3 nucléotides sur l'ARNm. L'ARNt du site P se retrouve alors dans le site E avant d'être relargué, et l'ARNt du site A se retrouve dans le site P. Le site A étant alors libéré, le mécanisme d'élongation peut se répéter jusqu'au décodage du codon STOP, marquant la terminaison de la traduction.

3. Terminaison de la traduction

La terminaison de la traduction correspond au décodage d'un codon STOP par le ribosome suivi du relargage du peptide néo-synthétisé et des 2 sous-unités du ribosome (Figure 4).

Lors de l'entrée des trois nucléotides de l'ARNm correspondant au codon STOP dans le site A du ribosome, le complexe eRF1/3 (*eukaryotic Release Factor*) entre dans le site A du

ribosome, à la place d'un ARNt. L'entrée de eRF1/3 dans le site induit le relargage de eRF3 et le recrutement de la protéine ABCE1 par eRF1 (Dever *et al.*, 2018). Le complexe eRF1 est alors activé et induit l'hydrolyse de la liaison reliant le peptide néo-synthétisé à l'ARNt du site P. Cette hydrolyse a pour effet de relarguer la chaîne polypeptidique (*i.e.*, la protéine néosynthétisée) et d'induire la dissociation du ribosome 80S en ses deux sous-unités.

Une fois les sous-unités ribosomiques relarguées, elles sont ensuite recyclées *via* leur interaction avec de nouveaux complexes d'initiation de la traduction (Jackson *et al.*, 2010). Cette étape est favorisée par la circularisation de l'ARNm par les protéines PABP.

III. La régulation de la traduction

La traduction est une étape de l'expression génique consommant environ 80% de l'énergie de la cellule. De ce fait, la traduction est finement régulée de façon globale (*i.e.*, régulation de la traduction de l'ensemble des ARNm). De plus, comme la traduction est l'une des dernières étapes de l'expression génique, la régulation de la traduction spécifique (*i.e.*, régulation de certains ARNm uniquement) reste un moyen rapide de s'adapter aux besoins cellulaires (Figure 4). Bien que la traduction puisse être régulée au cours des trois étapes présentées précédemment, il s'avère que l'initiation de la traduction regroupe le plus d'évènements régulatoires décrits. Ici, je dissocierais les mécanismes de régulation de la traduction globale et spécifique, qui font appel à des mécanismes moléculaires distincts. Seuls quelques exemples seront donnés pour donner les points essentiels de la régulation traductionnelle.

1. Régulation globale de la traduction

La régulation de la synthèse protéique globale passe principalement par la régulation de la traduction dépendante de la coiffe, et donc des facteurs d'initiation eIFs. L'expression et l'activité des facteurs eIFs sont régulées par de nombreuses voies de signalisation, comme PI3K/AKT/mTOR, RAS/ERK/mTOR ou p38/MAPK (Figure 4) (Nandagopal & Roux, 2015; Roux & Topisirovic, 2012, 2018). Ainsi, la régulation globale de la traduction est sensible aux signaux environnementaux tels que les facteurs de croissance (*e.g.*, insuline, hormones, etc.), permettant à la cellule d'adapter son activité interne aux ressources disponibles dans son environnement.

L'un des acteurs centraux de la régulation de la synthèse protéique globale est l'inhibiteur du complexe eIF4, la protéine 4E-BP1 (Figure 4). En effet, la protéine 4E-BP1 partage le même site de fixation à eIF4E que la sous-unité eIF4G. Ainsi, 4E-BP1 et eIF4G entrent en compétition pour eIF4E (Marcotrigiano *et al.*, 1999; Pause *et al.*, 1994). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR empêche son interaction avec eIF4E, promouvant l'interaction de eIF4G avec eIF4E sur la coiffe et favorisant la traduction.

En parallèle, la protéine kinase S6K, dont l'activation par phosphorylation est médiée par mTOR, induit la phosphorylation des facteurs eIF4B et PDCD4, deux facteurs aux activités opposées (Roux & Topisirovic, 2012). En effet, la phosphorylation de eIF4B augmente l'activité de eIF4A présent au niveau de la coiffe de l'ARNm. A l'inverse, la forme phosphorylée de PDCD4 inhibe l'activité de eIF4A en empêchant son interaction avec le co-facteur eIF4G (*i.e.*, compétition pour l'interaction avec eIF4G). Ainsi, alors que l'activation de eIF4B promeut l'initiation de la traduction, celle de PDCD4 l'inhibe (Roux & Topisirovic, 2012; H.-S. Yang *et al.*, 2003). De même, le complexe eIF2 est également sujet à différentes régulations. Par exemple, le facteur eIF2B est régulé à la fois positivement (*i.e.*, phosphorylation par la protéine kinase S6K) et négativement (*i.e.*, interaction avec eIF2 α phosphorylé) (Figure 4) (Roux & Topisirovic, 2012).

2. Régulation spécifique de la traduction

L'initiation de la traduction est également possible indépendamment de la coiffe et permet ainsi la régulation de la traduction de certains ARNm particuliers. La régulation spécifique de la traduction est principalement médiée par la présence d'éléments régulateurs localisés dans les séquences 5'UTR (*Untranslated Region*) et 3'UTR des ARNm (*i.e.*, éléments cis-régulateurs) qui interagissent avec des éléments trans-régulateurs et modulent différentes étapes de la traduction (Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Truitt & Ruggero, 2016).

a. Régulation en 5'UTR

Dans la région 5'UTR, on distingue de nombreux éléments cis-régulateurs comme les IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), 5'TOP (*5' Terminal Oligopyrimidine Tract*), uORFs (*upstream Open Reading Frame*) ou les méthylations de bases (*i.e.*, m⁶A).

Par exemple, chez les eucaryotes, les structures IRES permettent la traduction de certains ARNm nécessaires à la survie cellulaire. Cette initiation est possible pour environ 5 à 10% des ARNm eucaryotes (environ 691 chez l'Homme) qui présentent des structures IRES dans leur région 5'UTR (Zhao *et al.*, 2020). Tout d'abord découvertes dans les ARNm viraux, les structures IRES recrutent directement les ribosomes par interaction ARNm : ribosome ou *via* une protéine intermédiaire (ITAF). Ainsi, la présence de ces structures dans les ARNs viraux permet de détourner efficacement la machinerie traductionnelle cellulaire à leur profit. Chez l'Homme, lors d'un stress, la cellule diminue fortement sa synthèse protéique globale. Or, les séquences IRES lui permettent de continuer la traduction spécifique des ARNm nécessaires à sa survie, indépendamment des régulations globales. Parmi les ARNm possédant des IRES chez l'Homme, on retrouve p53 (Ray *et al.*, 2006), c-Myc (Stoneley *et al.*, 1998), IGF1R (Giraud *et al.*, 2001) et FGF1/2 (Créancier *et al.*, 2000; Martineau *et al.*, 2004). Moléculairement, les mécanismes permettant aux séquences IRES de recruter spécifiquement les ribosomes sont mal connus. Ceci est en particulier dû au fait qu'il n'existe aucune séquence ou structure consensus permettant de définir un IRES.

Les motifs 5'TOP sont retrouvés principalement sur les ARNm codant pour les protéines de la machinerie traductionnelle, y compris les protéines ribosomiques. A l'inverse des séquences IRES, les motifs 5'TOP permettent l'inhibition spécifique de la traduction de certains ARNm. En effet, lors d'un ralentissement de la croissance cellulaire, le motif 5'TOP des ARNm codant pour RPL32 et RPS16 réduit leur traduction, et induit donc l'arrêt de la biogenèse des ribosomes (Levy *et al.*, 1991). Tout comme pour les séquences IRES, le mécanisme moléculaire sous-jacent à ces observations n'est que peu décrit (Damgaard & Lykke-Andersen, 2011). En revanche, il semble que cette inhibition de la traduction soit dépendante de la fixation de RBPs (*e.g.*, TIA-1/TIAR) sur les motifs 5'TOP des ARNm, induisant leur séquestration sous forme de granules de stress (Damgaard & Lykke-Andersen, 2011).

Les séquences uORFs sont majoritairement décrites pour leur rôle dans l'inhibition de la traduction, bien qu'elles puissent aussi la favoriser dans certains cas. En effet, elles induisent par exemple non seulement la dissociation précoce du ribosome (*i.e.*, initiation de la traduction d'un uORF en amont d'un codon initiateur) mais également le ralentissement du processus d'élongation (*i.e.*, encombrement stérique par d'autres protéiques, présence de codons rares, etc.). A l'inverse, les uORFs sont aussi capables de promouvoir la traduction de certains ARNm en favorisant la ré-initiation de la traduction. Il semblerait que leur impact sur l'activité

traductionnelle soit dépendant de leur longueur (Hinnebusch & Lorsch, 2012; Jackson *et al.*, 2010; Young & Wek, 2016).

Les méthylations de bases, spécifiquement les N6-méthyladénosine (m⁶A) ont été décrites récemment comme activateur de la traduction permettant le recrutement spécifique de eIF3 et du complexe 43S-PIC (Meyer *et al.*, 2015). De par leur nature, les m⁶A sont classées comme régulateurs épitranscriptomiques (Frye *et al.*, 2016).

b. Régulation en 3'UTR

La région 3'UTR des ARNm est également impliquée dans la régulation traductionnelle spécifique de certains ARNm, notamment via l'action de trans-régulateurs comme des RBP (*RNA Binding Proteins*) et des microARNs (miARNs).

Les protéines RBP interagissent de façon séquence-spécifique avec l'ARNm ou des éléments structuraux tels que le complexe GAIT (*Gamma Interferon Inhibitor of Translation*) par exemple. Dans le cas de la protéine PABP, sa liaison à l'ARNm induit la circularisation de l'ARNm en liant la coiffe et la queue poly(A) de l'ARNm. Cette structuration circulaire facilite l'initiation de la traduction et le recyclage des ribosomes sur le même ARNm (T. Brabletz *et al.*, 2018; Nieto *et al.*, 2016). A l'inverse, le complexe GAIT réprime la traduction des ARNm codant pour des protéines pro-inflammatoires par inhibition du recrutement du complexe 43S-PIC, en réponse à l'activation de la voie de l'IFN γ (*i.e.*, interféron gamma) (Mukhopadhyay *et al.*, 2009).

Les miARNs sont des ARN non codants dont les activités sont diverses. En effet, ces miARNs s'hybrident à l'ARNm par complémentarité de séquence afin d'induire la dégradation de l'ARNm et/ou d'inhiber sa traduction. Le mécanisme par lequel les miARNs inhibent la traduction dépend principalement de la protéine CCR4-NOT. Bien que le mécanisme des miARNs ne soit pas totalement compris à l'heure actuelle, il semblerait que l'interaction entre un miARN et CCR4-NOT permette l'inhibition de la protéine eIF4A2 (Duchaine & Fabian, 2019; Jonas & Izaurralde, 2015). D'autres études suggèrent également un rôle du complexe miARN/CCR4-NOT dans l'inhibition de l'interaction entre eIF4E et eIF4G lors de l'initiation de la traduction (Duchaine & Fabian, 2019; Jonas & Izaurralde, 2015). En parallèle, il semble que l'interaction des miARNs avec la séquence codante des ARNm induise le décrochage du ribosome au cours de l'élongation (Petersen *et al.*, 2006).

Bien que le ribosome soit la machinerie traductionnelle assurant le décodage et la synthèse des protéines au cours de la traduction, celui-ci n'est pas considéré comme un acteur de la régulation de la traduction. Or, ce dogme a été remis en question ces dernières années.

Chapitre 2 : De l'hétérogénéité de composition du ribosome à la notion de ribosome spécialisé ?

Depuis sa découverte à la fin des années 1950, l'intérêt scientifique pour le ribosome n'a eu de cesse de grandir. Tout d'abord considéré comme une simple machinerie effectrice de la traduction, le ribosome est depuis peu considéré comme un nouvel acteur de la traduction, jouant un rôle de régulateur traductionnel. En effet, depuis le début des années 2010, le concept de « ribosome spécialisé » a émergé (aussi intitulé « ribosome filtrant », « riboverse », ou « code du ribosome »). Contrairement au dogme considérant que le ribosome présente toujours la même composition, et donc la même structure sur laquelle son activité très conservée au cours de l'évolution repose, la notion émergente de « ribosome spécialisé » implique que la composition du ribosome varie en fonction du contexte physio-pathologique dans lequel se trouve la cellule, chaque variant de ribosomes ayant des activités de traduction distinctes spécifiant un phénotype particulier (Dinman, 2016; Genuth & Barna, 2018; Z. Shi & Barna, 2015; Xue & Barna, 2012). Aujourd'hui, de nombreuses études ont démontré que la composition du ribosome varie dans le temps et dans l'espace, que ce soit vis-à-vis des ARNr ou des protéines ribosomiques. En revanche, peu d'études ont démontré l'effet de ces différences de composition sur la régulation traductionnelle et encore moins sur la mise en place de phénotype particulier. Ainsi, le concept de « ribosome spécialisé » est encore très controversé (Karbstein *et al.*, 2022).

Dans ce chapitre, je me focaliserai sur les différences de composition du ribosome qui ont été décrites dans différents contextes. J'aborderai l'hétérogénéité de composition du ribosome *via* ces deux composants principaux : l'ARN ribosomique (ARNr) et les protéines ribosomiques. Le lien entre hétérogénéité de composition du ribosome et régulation traductionnelle ou spécification phénotypique sera explicité, au gré de ces descriptions, par les quelques exemples épars disponibles dans la littérature.

I. Hétérogénéité des ARNs ribosomiques

Les ARNr jouent un rôle primordial dans l'activité traductionnelle du ribosome puisqu'ils contribuent directement à l'activité catalytique du ribosome (ou ribozyme) permettant la synthèse peptidique. Ainsi, la structure des ARNr influence grandement la régulation de

l'activité traductionnelle du ribosome. Cette structure dépend de la nature de la séquence nucléotidique (*i.e.*, variation génétique) mais aussi de leurs modifications chimiques. De nombreuses variations ont été décrites à ces deux niveaux (Figure 5).

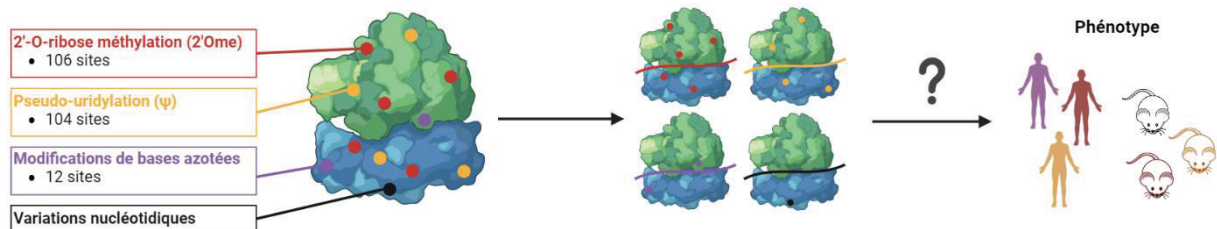


Figure 5 : Représentation schématique des modifications chimiques des ARNr et leur impact, avéré ou potentiel, sur l'activité traductionnelle du ribosome et le phénotype.

1. Variation des séquences nucléotidiques des ARNs ribosomiques

Comme décrit précédemment (cf. partie I), les ARNr sont codés par différents locus d'ADN ribosomique (ADNr), répétés en tandem, qui chez l'Homme et la souris, peuvent atteindre plusieurs centaines de copies, réparties sur 5 chromosomes (Grozdanov *et al.*, 2003; Stults *et al.*, 2008). Cette structure particulière induit la présence d'un nombre important de gènes permettant l'expression des ARNr, chacun pouvant être régulé aux niveaux épigénétique et transcriptomique (Parks *et al.*, 2018). Le dogme actuel est que ce nombre important permettrait de réguler la quantité de ribosomes dans la cellule en fonction de ses besoins. Ainsi, les cellules prolifératives présentent plus de copies d'ADNr actifs, et donc une quantité élevée de ribosomes favorisant la synthèse protéique qui soutient la prolifération cellulaire, que les cellules non prolifératives (Ruggero, 2012). En effet, des études chez la souris ont montré que le taux d'expression d'ADNr est plus important dans les cellules prolifératives que dans les cellules différenciées (*i.e.*, moins prolifératives) (Santoro *et al.*, 2010; Zentner *et al.*, 2014). En plus de cette différence quantitative, il s'avère que les locus d'ADNr présentent aussi une différence qualitative.

Au début des années 2000, les premières études concernant les variations nucléotidiques des ARNr apparaissent. Tout d'abord, il est démontré chez le parasite *Plasmodium berghei* que l'expression des différentes copies d'ADNr varie en fonction de l'environnement dans lequel se trouve le parasite (*i.e.*, hôte ou vecteur), laissant penser à une spécialisation de certaines séquences d'ARNr en fonction du contexte environnemental (Van Spaendonk *et al.*, 2001). De

plus, une étude réalisée chez le procaryote *Haloarcula marismortui* met en évidence une augmentation d'un facteur 4 de l'expression de l'opéron codant pour les ARNr présentant le plus de variations nucléotidiques (*i.e.*, opéron B) en réponse à une augmentation de température de l'environnement (Baliga *et al.*, 2004). Par la suite, en 2019, une étude métagénomique sur l'ARNr 16S de différentes souches de la bactérie *Escherichia coli* (*i.e.*, équivalent de l'ARNr 18S chez l'Homme) démontre que les variations nucléotidiques détectées permettent la classification des différents individus, à la fois au niveau des espèces mais aussi des souches (J. S. Johnson *et al.*, 2019). Ces différentes observations suggèrent que les variations nucléotidiques des ARNr font partie intégrante de la sélection et la spécialisation des espèces en permettant, entre autres, une adaptation aux conditions environnementales. En revanche, aucune étude ne démontre l'impact de ces variations nucléotidiques sur la composition ou l'activité du ribosome dans la mesure où les données sont obtenues sur des lysats cellulaires totaux et non sur des ribosomes purifiés.

Chez l'Homme, des variations nucléotidiques de l'ADNr ont été détectées entre différents individus (inter-individus), mais également au sein d'un même individu (intra-individu). En 2018, sur les 1790 variations alléliques détectées (tous ARNr confondus) dans les données du *1000 Genomes Project* (*i.e.*, variation inter-individuelle), certaines présentent une spécificité ethnique. De plus, 497 variants ont montré une variation intra-individuelle avec une fréquence supérieure à 20% (Parks *et al.*, 2018). Ces variations intra-individuelles semblent quant à elles être liées à une hétérogénéité inter-organe. En effet, sur les 70 variations nucléotidiques détectées dans le modèle murin BALB/cJ au cours de cette étude, 26 variations sont significativement différentiellement exprimées dans au moins un organe par rapport aux autres (*i.e.*, cerveau, poumon, foie ou ovaire) (Parks *et al.*, 2018). Ces données, bien qu'unique, démontrent l'existence d'une hétérogénéité intra- et inter-individuelle des variations nucléotidiques des ARNr chez l'Homme et la souris.

Bien que ces variants aient été détectés dans les ribosomes traductionnellement actifs (ribosomes issus de profils de polysomes) dans le modèle murin, l'impact moléculaire et phénotypique de ces variations nucléotidiques n'est actuellement pas connu (Parks *et al.*, 2018). En revanche, la mise en perspective de ces données avec les modélisations existantes permet d'observer que les nucléotides présentant le moins de variations nucléotidiques sont localisés dans des domaines fonctionnels du ribosome, tandis que ceux présentant une forte variation inter-tissulaire sont majoritairement présents dans les segments d'expansion du ribosome,

impliqués dans le recrutement des complexes de conformation du néo-peptide (Bradatsch *et al.*, 2012; Leidig *et al.*, 2012). Cette approche comparative suggère un avantage sélectif des nucléotides peu variables au cours de l'évolution, certainement pour conserver l'activité intrinsèque du ribosome au cours de l'évolution (Parks *et al.*, 2018). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les variations nucléotidiques des ARNr en dehors des régions fonctionnelles du ribosome pourraient avoir un rôle régulateur. En effet, l'étude de Parks *et al.* a démontré l'existence de deux cluster de variation, dont un cluster à proximité de la protéine ribosomique RPL38 connue pour son rôle dans la traduction des gènes *Hox* au cours du développement (cf. Chapitre 2 – partie II-4) (Parks *et al.*, 2018).

Ainsi, bien que le champ de recherche concernant les variations nucléotidiques des ARNr compte moins d'une dizaine de publications chez les mammifères et qu'aucune étude fonctionnelle n'ait été réalisée, les résultats obtenus chez l'Homme et la souris supportent la notion d'une hétérogénéité de composition des ribosomes sur la base des variations nucléotidiques des ARNr en fonction de contexte physiologique, au moins. Les connaissances actuelles, appuyées par des modélisations, suggèrent néanmoins un lien entre variations nucléotidiques des ARNr et activité traductionnelle (*i.e.*, ribosome spécialisé). Afin de valider cette hypothèse, des études moléculaires (*e.g.*, traduction *in vitro*, *ribosome profiling*, etc.) et phénotypique (*e.g.*, mutations *in vitro* et *in vivo*, etc.) sont indispensables.

2. Variation des modifications chimiques des ARNs ribosomiques

La structure tertiaire des ARNr est stabilisée par la présence de modifications chimiques diverses (*e.g.*, 2'-O-ribose méthylations, pseudo-uridylation et modifications de bases azotées). Cependant, de récentes études démontrent que ces modifications chimiques, bien qu'essentielles, ne sont pas systématiquement présentes et participent ainsi à l'hétérogénéité de composition, et d'activité, du ribosome.

En effet, tous les sites identifiés comme chimiquement modifiés ne portent pas toujours cette modification. De plus, seuls quelques sites semblent accepter cette absence de modifications chimiques. En raison de son importance quantitative, bibliographique et pour mon projet de thèse, la 2'-O-ribose méthylation sera traitée plus en détails que les autres (cf. Chapitre 2 – partie I-2b).

a. Modifications des bases azotées des ARNs ribosomiques

Comme décrit précédemment (cf. Chapitre 1 – partie IIc), les modifications de bases azotées sont réalisées par une enzyme spécifique à chaque site. Ainsi, l'étude moléculaire de ces modifications est exclusivement basée sur l'inhibition de ces enzymes.

Les variations de modifications de bases des ARNr documentées correspondent principalement à une diminution du niveau de ces modifications dans différents contextes pathologiques. Par exemple, dans le cancer colorectal, une perte de la modification 1-méthyl-3- α -amino-carboxyl-propyl pseudo-uridine en position 1248 de l'ARNr 18S (18S_m1acp3 Ψ 1248) est observée chez 45% des patients (Babaian *et al.*, 2020). L'origine de cette altération de modification de base n'est pas documentée par les auteurs de cette étude, ni même sa potentielle association avec des paramètres cliniques (*i.e.*, augmentation du taux de rechute, diminution du taux de survie, etc. en lien avec l'absence de cette modification de base). En revanche, l'absence de cette 18S_m1acp3 Ψ 1248 est également retrouvée dans plus de 20 autres types de cancers analysés dans cette étude *via* la cohorte TCGA (Babaian *et al.*, 2020). Etant donné que les cohortes TCGA ne référencent que les mutations et données d'expression, cette étude a pu être réalisée grâce aux propriétés chimiques de la 1-méthyl-3- α -amino-carboxyl-propyl pseudo-uridylation. En effet, de par son encombrement stérique, cette modification chimique perturbe l'activité de la transcriptase inverse au cours de la synthèse d'ADN complémentaire, résultant en une mis-incorporation ou une délétion à la position modifiée (Helm & Motorin, 2017). Ainsi, ce type de modification est détectable par des méthodes classiques de séquençage et se traduit par une mutation ou délétion ponctuelle de la séquence analysée. Cette étude, originale par sa méthode, démontre donc l'existence d'une hétérogénéité des modifications de bases azotées dans le contexte pathologique du cancer.

Moléculairement, l'absence de la modification 18S_m1acp3 Ψ 1248, localisée dans le centre de décodage du ribosome, est associée à une augmentation de la traduction spécifique des ARNm codant pour les protéines ribosomiques (Babaian *et al.*, 2020). En effet, dans un modèle cellulaire de cancer colorectal (*i.e.*, HCT116) *knockout* pour l'acétyl-coenzyme A carboxyl-propyl-transférase TSR3, responsable de la modification 18S_m1acp3 Ψ 1248, les auteurs ont montré un découplage entre une diminution des ARNm codant pour les protéines ribosomiques RPL4 et RPS8 et une augmentation de la quantité totale de ces deux protéines, sans augmentation de la synthèse protéique globale (Babaian *et al.*, 2020). Cette étude permet donc de démontrer un

lien direct entre hétérogénéité de modifications de bases azotées et activité traductionnelle du ribosome.

L'ARNr 28S est également concerné par les modifications de bases azotées. En effet, la délétion homozygote de la méthyltransférase NSUN5, catalysant la méthylation de la cytosine 3782 de l'ARNr 28S chez l'Homme (28S_m5C3782), est associée au syndrome de Williams-Beuren, caractérisé, entre autres, par un retard de croissance, des dysmorphismes faciaux ainsi que des troubles comportementaux et cognitifs (Poerber, 2010; Tassabehji, 2003). *In vitro*, l'inhibition de NSUN5 dans les cellules HeLa induit une diminution de la prolifération cellulaire (Heissenberger *et al.*, 2019), rejoignant les symptômes observés en clinique. En revanche, dans le cas des gliomes, la déplétion de NSUN5 est associée à l'augmentation de la prolifération cellulaire chez l'Homme et la souris (Janin *et al.*, 2019). Ainsi, l'opposition de ces études ne permet pas de conclure quant à l'impact phénotypique de la méthylation de base 28S_m5C3782.

Cependant, la perte de la modification 28S_m5C3782, *via* la délétion homozygote de NSUN5, induit une diminution de la synthèse protéique globale *in vitro* dans les deux modèles (Heissenberger *et al.*, 2019; Janin *et al.*, 2019). Paradoxalement, l'absence de cette modification est également associée à une augmentation de la traduction d'ARNm impliqués dans la réponse au stress cellulaire dans les lignées cellulaires de gliomes (Janin *et al.*, 2019). Ainsi, ces données permettent de valider le lien entre modification de bases azotées et traduction spécialisée des ARNm.

En conclusion, le champ de recherche dédié aux modifications de bases azotées est peu exploré. En revanche, les exemples détaillés ici permettent de mettre en évidence que la composition du ribosome sur la base de ces modifications chimiques existe dans certaines conditions pathologiques. De plus, ils montrent que l'activité traductionnelle du ribosome est impactée par les variations de modifications de bases azotées. L'étude de ces modifications chimiques de l'ARNr est notamment facilitée, bien que sous-exploitée, par le fait que chaque enzyme est dédiée à la modification d'un site spécifique. En revanche, l'impact phénotypique de ces modifications de bases azotées n'est pas systématiquement évident, et nécessite d'être approfondi (Tableau 1). De même, ces études ne concernent que deux modifications, et des

études supplémentaires sur les 10 autres modifications recensées sont donc indispensables pour généraliser (ou non) les observations présentées.

b. Pseudo-uridylation des ARNs ribosomiques

La grande majorité des études relatives au variation du niveau de pseudo-uridylation des ARNr ont été réalisées dans des conditions de mutation/inactivation de *DKC1* (*i.e.*, dyskérine). En effet, *DKC1* est l'enzyme unique permettant la pseudo-uridylation de tous les sites recensés. Ces données soutiennent donc le fait que la variation de niveau de pseudo-uridylation peut exister sans induire une mortalité du fait d'un ribosome déficient pour certaines pseudo-uridylation.

Les premières études évoquant la possible existence d'une variabilité de la pseudo-uridylation remontent à la fin des années 1990. C'est en 1998 que Heiss *et al.* décrivent pour la première fois des mutations du gène *DKC1* chez des patients atteints de dyskératose congénitale (*i.e.*, maladie héréditaire caractérisée par une insuffisance de prolifération cellulaire) (Heiss *et al.*, 1998; Ruggero *et al.*, 2003). En 2006, une étude sur une cohorte de cancers du sein a démontré qu'une faible expression de l'ARNm *DKC1* est associée à un meilleur pronostic, rejoignant l'idée d'une activité pro-proliférative de *DKC1* (Montanaro *et al.*, 2006). Ces études permettent de suggérer un lien entre expression de l'enzyme *DKC1* et prolifération cellulaire, mais n'ont pas validé la perte d'expression de *DKC1* au niveau protéique.

De plus, aucune donnée ne permet de confirmer que le lien entre *DKC1* et prolifération cellulaire est médié par la diminution de la pseudo-uridylation des ARNr. Plusieurs études démontrent que l'inhibition ou la mutation de *DKC1* induit une diminution globale du taux de pseudo-uridylation des ARNr (Montanaro *et al.*, 2006; Ruggero *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2006). Cependant, la diminution de l'expression de *DKC1* est également liée à une diminution de l'expression transcriptionnelle de la télomérase (Montanaro *et al.*, 2006; Ruggero *et al.*, 2003). Depuis lors, de nombreuses études *in vitro* soutiennent un lien direct entre inhibition de *DKC1*, taux de pseudo-uridylation des ARNr et activité traductionnelle du ribosome. Dans des modèles murins, la mutation de *DKC1* induit une diminution de la traduction d'ARNm contenant des séquences IRES (cf. Chapitre 1 – partie III-2) tels que les inhibiteurs d'apoptose BCL-XL et XIAP ou le suppresseur de tumeur p53, sans altération de la synthèse protéique globale (Bellodi

et al., 2010; Montanaro *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2006). Ces études rejoignent les observations cliniques faites précédemment indiquant un impact de DKC1 sur la prolifération cellulaire. Plus récemment, il a été montré que la réduction globale de pseudo-uridylation par inhibition de *DKC1* favorise *in vitro* la traduction de l'ARNm *VEGF* (Penzo *et al.*, 2015; Rocchi *et al.*, 2013). Cette absence globale de pseudo-uridylation induite par la déplétion de *DKC1* a également été liée à une augmentation du taux d'erreur de traduction (*i.e.*, mis-incorporation des acides aminés) (Penzo *et al.*, 2015). En résumé, toutes ces données démontrent un impact de DKC1, qui régule le taux global de pseudo-uridylation des ARNr, sur l'activité traductionnelle du ribosome, et suggèrent un impact phénotypique sur la prolifération cellulaire.

Enfin, un champ de recherche émerge quant à l'étude de l'altération spécifique de certains sites de pseudo-uridylation, indépendamment de DKC1. Dans les cancers du sein, une récente étude omique a mis en évidence une variation site-spécifique de la pseudo-uridylation des ARNr. En effet, seulement certains sites montrent une diminution significative de leur taux de pseudo-uridylation (*e.g.*, 18S_ΨU1625 chez 41% des patients) (Barozzi *et al.*, 2023). Ces profils de pseudo-uridylation permettent également de définir des clusters tumoraux, qui sont associés à des caractéristiques cliniques (*i.e.*, infiltration vasculaire, métastase ganglionnaire) (Barozzi *et al.*, 2023). Une autre étude a montré que les tumeurs ovariennes de haut grade présente un niveau de pseudo-uridylation au site 28S_U4606 plus élevé que les tumeurs ovariennes de bas grade. Ce sont à ce jour les seules démonstrations que le niveau de pseudo-uridylation varie de manière site-spécifique chez les patients et qu'il est associé à des caractéristiques cliniques (Faucher-Giguère *et al.*, 2022; McMahon *et al.*, 2019).

En complément de ces observations cliniques, quelques études permettent d'apporter des indications quant au(x) rôle(s) de la variation du niveau de pseudo-uridylation dans l'activité traductionnelle du ribosome. Par exemple, l'inhibition du snoARN SNORA24, guidant la pseudo-uridylation des sites 18S_ΨU609 et 18S_ΨU863, induit une altération de la reconnaissance du codon STOP par le ribosome en cours de traduction, sans altération de la synthèse protéique globale. Ces données sont supportées par le fait que le site de pseudo-uridylation 18S_ΨU609 est localisé dans le site A du ribosome, domaine de reconnaissance de l'anticodon ARNt (McMahon *et al.*, 2019). Cette étude suggère donc un lien direct entre pseudo-uridylation à deux sites d'intérêt et activité spécialisée du ribosome, mais ne permet pas d'évaluer l'impact phénotypique de cette activité ribosomique. De plus, ces études sont basées

sur la modulation de l'expression du snoARN qui guide la pseudo-uridylation au nucléotide d'intérêt, et sachant l'émergence de rôle non-canonique des snoARNs (*e.g.*, épissage, maturation des ARNm, etc.), ces interprétations restent à être clairement démontrées par des approches de traduction *in vitro* utilisant des ribosomes purifiés présentant des altérations spécifiques de la pseudo-uridylation.

En conclusion, il semble exister chez l'Homme des variations de modifications de pseudo-uridylation des ARNr en fonction du contexte physio-pathologique étudié. Bien que les données existantes soient principalement basées sur des associations entre expression et contexte cellulaire/pathologique, elles permettent néanmoins de soulever l'existence de variations globales (*e.g.*, mutations de DKC1) et spécifiques (*i.e.*, variation de certains sites uniquement) de la pseudo-uridylation des ARNr. Des études complémentaires sont nécessaires pour valider ces observations (Tableau 1), mais les études *in vitro* laissent supposer un lien fort entre pseudo-uridylation des ARNr, activité ribosomique et phénotype physio-pathologique.

c. Focus sur la 2'-O-ribose méthylation des ARNs ribosomiques

Dans les années 1980, le dogme selon lequel toutes les positions méthylées des ARNr sont toujours méthylées, permettant ainsi le maintien de la structure et l'activité ribosomiques, apparaît. Ce dogme est soutenu expérimentalement par la mise en évidence non quantitative de la méthylation systématique des sites de 2'Ome chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Xenopus laevis* (Decatur & Fournier, 2002; Schimmang *et al.*, 1989), ainsi que la léthalité du phénotype *FBL^{-/-}* (fibrillarine) chez plusieurs espèces (Newton *et al.*, 2003; Schimmang *et al.*, 1989). Il faut donc attendre l'émergence de méthodes de quantification de la 2'Ome (*e.g.*, séquençage RiboMethSeq, etc.) à la fin des années 2000 pour que l'idée d'une potentielle variation du niveau de méthylation aux 106 (voire 112) sites de 2'Ome émerge. Cette notion implique l'existence d'un mélange de particules d'ARNr méthylées et non-méthylées, en différentes proportions et positions. Actuellement, il est estimé que seulement un tiers des sites de 2'Ome (*i.e.*, entre 30 et 35 sites) tolèrent une variation de leur méthylation (Jaafar *et al.*, 2021). Les sites restants sont, jusqu'à preuve du contraire, considérés comme stables et essentiels à la structure et l'activité ribosomiques.

La première mise en évidence de l'altération de la 2'Ome chez l'Homme a été réalisée en 2009 par mon laboratoire d'accueil dans un contexte expérimental utilisant des lignées de cancers du sein (MCF7 et MDA-MB-231) modifiées pour l'expression d'un oncogène (*i.e.*, ARL2), à l'aide d'une méthode basée sur la RTqPCR et limitant ainsi la généralisation des observations faites (Belin *et al.*, 2009). Cette étude a montré une diminution du taux de 2'Ome à certains sites dans les lignées cellulaires présentant une forte agressivité tumorale (Belin *et al.*, 2009). Cette démonstration a posé les bases de la compréhension des variations de 2'Ome des ARNr : les variations de 2'Ome peuvent être spécifiques à certains sites et/ou être associées à des contextes physio-pathologiques particuliers. Par la suite, des études omiques *in vitro* (*i.e.*, lignées cellulaires) et cliniques ont permis d'étoffer ces observations.

Tout d'abord, l'expression de la FBL, méthyltransférase catalysant la réaction de 2'Ome, est altérée dans différents contextes physio-pathologiques comme le développement embryonnaire (Recher *et al.*, 2013), la différenciation cellulaire (Watanabe-Susaki *et al.*, 2014), les infections virales (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015) ou encore le cancer (Marcel *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2013). Cependant, ces études sur l'expression de FBL ne permettent pas de conclure quant à une variation de la 2'Ome des ARNr dans ces différents contextes car elles n'ont pas analysé le niveau de 2'Ome. En revanche, des études ont montré l'existence d'une variation du taux de 2'Ome dans le syndrome du X fragile (D'Souza *et al.*, 2018) et une variation spécifique de certains sites de 2'Ome dans différents types de cancers (Marcel *et al.*, 2020; Paraqindes *et al.*, 2023), la dyskératose congénitale (Nachmani *et al.*, 2019), la leucémie myéloïde aigue (Kunchala *et al.*, 2018; Pauli *et al.*, 2020; F. Zhou *et al.*, 2017) et la β -thalassémie (Sornjai *et al.*, 2017) par exemple (pour revue complète, voir (Jaafar *et al.*, 2021)). En plus de permettre la distinction entre tissus pathologiques et tissus sains, certaines études montrent que la signature spécifique de 2'Ome est caractéristique de certains sous-types tumoraux et pourrait permettre la classification de certaines tumeurs comme les carcinomes mammaires ou les gliomes de haut grade (Marcel *et al.*, 2020; Paraqindes *et al.*, 2023). Globalement, comme dans le cas de la pseudo-uridylation, les données cliniques soutiennent l'existence d'une hétérogénéité de composition du ribosome sur la base de la 2'Ome ; bien que peu d'études aient analysé la 2'Ome des ARNr issus de ribosomes purifiés, en particulier dans les échantillons humains.

Il a été montré que l'inhibition de la FBL affecte préférentiellement certains sites de 2'Ome par rapport à d'autres (Erales *et al.*, 2017; Marcel *et al.*, 2013). Afin d'évaluer l'impact

d'une altération de la 2'Ome au niveau moléculaire, certaines études ont démontré l'impact de l'inhibition de l'expression de la protéine FBL (Erales *et al.*, 2017). Marcel *et al.* ont montré que la réduction d'expression de FBL induit une diminution de la fidélité de traduction du ribosome, et une augmentation de la traduction des ARNm contenant des IRES à l'aide de système rapporteur transfectés dans les cellules (Marcel *et al.*, 2013). Ces mêmes observations ont été réalisées dans d'autres contextes où une altération site-spécifique de la 2'Ome est également observée en réponse à l'inhibition de la méthyltransférase EZH2 (Yi *et al.*, 2021), et à la suppression de p53 (Marcel *et al.*, 2013) par exemple. En revanche, ces études n'ont pas démontré (i) que les ribosomes traductionnellement actifs contiennent des ARNr possédant une altération de la signature 2'Ome et (ii) que ce sont ces ribosomes de composition différente qui affectent la traduction des systèmes rapporteurs. De plus, il est important de noter que certaines études soutiennent également que la FBL joue d'autres rôles, notamment dans le clivage des ARNr et la régulation de la transcription des ADNr (Koh *et al.*, 2011; D. Tollervey *et al.*, 1991; David Tollervey *et al.*, 1993). Il faudra attendre 2017 pour voir la démonstration moléculaire directe de l'impact de la variation de 2'Ome sur l'activité traductionnelle du ribosome *via* l'analyse de ribosomes purifiés (Erales *et al.*, 2017). Dans cette étude, des ribosomes de cellules traitées par siARN (*small interference RNA*) ciblant l'ARNm codant pour FBL ont été purifiés et utilisés pour des essais de traduction *in vitro*. Ainsi, il a été démontré que les ribosomes possédant une diminution de 2'Ome traduisent préférentiellement les ARNm contenant une séquence IRES (*e.g.*, *IGF1R*, *FGF1*) comparés aux ribosomes ayant un niveau de 2'Ome normal. Depuis lors, à ma connaissance, aucune autre étude n'a permis de démontrer le lien direct entre altération de la signature de 2'Ome et activité traductionnelle du ribosome.

En effet, en 2009, la variation de 2'Ome observée à certains sites, dans les lignées de cancers du sein (MCF7 et MDA-MB-231) sous-exprimant la protéine ARL2, est associée à une traduction préférentielle de certains ARNm contenant des séquences IRES tels que *p53*, *VEGF* et *IGF1R*, sans altération de la synthèse protéique globale (Belin *et al.*, 2009). Néanmoins, aucun mécanisme direct n'est décrit dans cette étude, et ne permet donc de valider l'hypothèse selon laquelle une variation de 2'Ome altère l'activité ribosomique et donc le phénotype. Depuis, d'autres études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires liant variation de la 2'Ome à un site particulier, activité traductionnelle du ribosome et phénotype, en altérant spécifiquement l'expression de certains snoARN guidant la 2'Ome. Par exemple, dans les cellules HeLa, Jansson *et al.* ont démontré que l'inhibition de SNORD45C abolit la présence de 2'Ome au site 18S_Cm174 (Jansson *et al.*, 2021). Par *ribosome profiling* (*i.e.*, comparaison

du taux d'ARNm protégés par les ribosomes), ils ont démontré que l'absence de la 2'Ome 18S_Cm174 induit un ralentissement de l'élongation lors de la traduction et une diminution de la régulation traductionnelle des ARNm impliqués dans les processus de cycle cellulaire et de mitose (Jansson *et al.*, 2021). Cette étude a succinctement adressé l'hypothèse d'un impact de l'absence de la modification 18S_Cm174 sur le phénotype cellulaire et mis en évidence une augmentation globale des mécanismes métaboliques (*e.g.*, synthèse ATP, respiration cellulaire, etc.). En parallèle, dans un contexte plus physiologique (*i.e.*, lignée cellulaire Kasumi-1 représentative des leucémies myéloïdes aigües), l'étude de Pauli *et al.* montre que l'inhibition de SNORD42A induit une absence de la méthylation au site 18S_Um116 et promeut la traduction d'ARNm codant pour des protéines du réticulum endoplasmique et des lysosomes, et inhibe la traduction des ARNm contenant un IRES (Pauli *et al.*, 2020). D'un point de vue phénotypique, les cellules déficientes pour SNORD42A présentent une inhibition de leur capacité proliférative et de formation de colonies (Pauli *et al.*, 2020). Bien que cette étude n'ait pas utilisé de technique de traduction *in vitro* ou de profil de polysome, elle permet d'amorcer la démonstration d'un lien entre signature spécifique de 2'Ome, régulation traductionnelle et phénotype cellulaire.

En conclusion, les études concernant la 2'Ome sont très récentes, et beaucoup d'hypothèses restent encore à prouver. En revanche, l'essor des technologies de quantification de la 2'Ome a permis de démontrer l'existence d'une hétérogénéité de la signature 2'Ome intra-individuelle (*i.e.*, certains sites plus ou moins méthylés par rapport à d'autres) mais également entre différents contextes physio-pathologiques (Tableau 1). Le rôle exact de ces altérations sur l'activité traductionnelle du ribosome, et donc sur le phénotype cellulaire, reste à affiner, mais les preuves actuelles semblent appuyer un impact certain. De plus, afin de mieux appréhender ces questions, l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo* diversifiés (*i.e.*, hors cancer) et dynamiques pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de la 2'Ome dans l'acquisition de phénotypes particuliers.

II. Hétérogénéité des protéines ribosomiques

En plus des 4 ARNr, le ribosome humain est constitué de 80 protéines ribosomiques impliquées dans le maintien de la structure tertiaire des ARNr et l'activité du ribosome. On

retrouve ainsi des protéines ribosomiques pouvant présenter des mutations ou des modifications post-traductionnelles distinctes, de même que des expressions différentielles d'isoformes/paralogues ou des protéines ribosomiques elles-mêmes (*i.e.*, absence ou présence dans le ribosome : substœchiométrie) (Figure 6). Bien que ces observations suggèrent une hétérogénéité de composition de ribosome aux niveaux des protéines ribosomiques, peu d'études ont démontré une variation dans des ribosomes purifiés. De plus, étant donné que certaines protéines ribosomiques présentent des activités extra-ribosomiques, il reste difficile de savoir si ces observations affectent la traduction *via* le ribosome ou non. Cette partie s'attèle à la description non-exhaustive de ces variations en fonction du contexte physio-pathologique et à leur impact sur l'activité ribosomique voire sur l'acquisition de phénotype particulier. En particulier, je détaillerai les différentes altérations connues de RPL36A, protéine ribosomique de la grande sous-unité ayant un intérêt notable dans mes travaux.

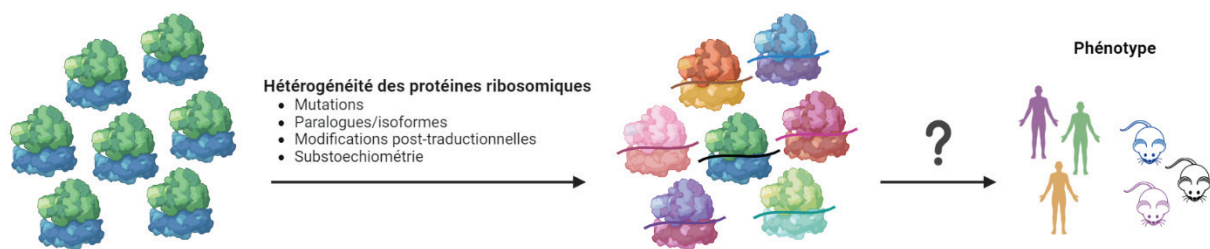


Figure 6 : Représentation schématique de l'hétérogénéité de composition protéique du ribosome et son impact, avéré ou potentiel, sur l'activité traductionnelle du ribosome et le phénotype.

1. Mutations des protéines ribosomiques et ribosomopathies : actualisation d'un dogme ?

Dès la fin des années 1990, des mutations ont été mises en évidence dans des gènes codant pour des protéines ribosomiques, et ce, uniquement dans un contexte pathologique, les ribosomopathies. En effet, l'essor des études génétiques dans le processus de diagnostic a permis de caractériser moléculairement des maladies décrites jusque-là d'un point de vue strictement médical. Le terme « ribosomopathie » regroupe des maladies génétiques congénitales, caractérisées par la délétion ou la mutation ponctuelle d'un gène codant pour un facteur de la biogenèse du ribosome, y compris les protéines ribosomiques. Il est alors admis que la mutation d'une protéine ribosomique aboutit à un défaut de biogenèse de ribosome, et se

traduit cliniquement par des malformations crânio-faciales et des défauts de prolifération cellulaire (*i.e.*, insuffisance médullaire, petite taille, etc.) (Sulima *et al.*, 2019).

L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) a été décrite pour la première fois en 1936 par Hughs W. Josephs (Josephs, 1936) puis en 1938 par Kenneth Blackfan et Louis Diamond qui lui donneront leur nom (Diamond, 1938). Ce n'est qu'en 1999 que la DBA est associée à une mutation du gène codant pour la protéine ribosomique RPS19 (Draptchinskaia *et al.*, 1999). Depuis lors, de nombreuses autres mutations touchant des gènes codant pour des protéines ribosomiques ont été découvertes chez les patients atteints de DBA. On compte désormais une vingtaine de gènes mutés, de fréquence variable, dont : RPS19 (25%), RPL5 (7%), RPS10 (6%), RPL11 (5%), RPS26 (3%), RPL35A (3%), RPS24 (2%), RPS7 (1%), RPS17 (1%), ainsi que, dans une moindre fréquence, RPL15, RPL26, RPL27, RPL31, RPS27, RPS28 et RPS29 (Farrar *et al.*, 2008; Gazda *et al.*, 2008; Quarello *et al.*, 2010; M. J. Song *et al.*, 2010). Les mutations rencontrées dans ce syndrome peuvent être une délétion, une insertion, une mutation non-sens, etc., et sont toutes considérées comme aboutissant à l'expression d'une protéine non fonctionnelle, n'ayant aucune fonction.

Comme le suggère le dogme actuel, certaines mutations de protéines ribosomiques, ainsi que des facteurs de la biogenèse des ribosomes, inhibent la biogenèse du ribosome et diminuent la quantité globale de ribosomes. Par exemple, chez le poisson-zèbre, la drosophile et la souris, l'expression de protéines ribosomiques mutantes diminue la biogenèse des ribosomes ainsi que la synthèse protéique globale pour aboutir à l'apparition d'individus de taille réduite, possédant moins de cellules que les individus sains (Polymenis, 2020). Ces observations appuient en effet les observations faites chez l'Homme dans le cas de la DBA, mais ne s'intéressent pas à l'existence de ribosomes potentiellement déficients pour les protéines ribosomiques étudiées.

Dans un autre contexte, une étude montre que la mutation de protéines ribosomiques peut également avoir un impact qualitatif sur l'activité traductionnelle du ribosome. En effet, la mutation R98S de la protéine RPL10, retrouvée dans 8% des leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques, favorise la traduction IRES-dépendante de l'ARNm *BCL2*, facteur anti-apoptotique promouvant la résistance au stress oxydatif, et donc aux traitements (Kampen *et al.*, 2019). Bien que cette étude ne valide pas l'incorporation de la protéine mutante dans les ribosomes traductionnellement actifs, elle permet d'établir que la mutation d'une protéine ribosomique peut altérer l'activité traductionnelle, que ce soit par un mécanisme intra-

ou extra-ribosomique. En effet, la mise en évidence de l'activité extra-ribosomique de certaines protéines ribosomiques remet en cause l'idée qu'une protéine ribosomique non-intégrée dans le ribosome est inactive (Warner & McIntosh, 2009).

En conclusion, le dogme selon lequel la mutation d'une protéine ribosomique induit systématiquement une protéine non fonctionnelle, ne s'intégrant pas dans le ribosome, semble être en cours d'évolution. Il serait prématuré d'établir que toutes les protéines ribosomiques mutées sont fonctionnelles, intégrées dans le ribosome et peuvent ainsi altérer l'activité traductionnelle du ribosome. Néanmoins, de plus amples études en ce sens sont nécessaires pour évaluer l'impact des mutations des protéines ribosomiques sur le ribosome et son activité.

2. Expression de paralogues et d'isoformes des protéines ribosomiques

Chez les mammifères, bien que la majorité des protéines ribosomiques soient codées par une seule copie génique, certaines sont présentes en plusieurs copies (ou paralogues) (Xue & Barna, 2012). L'expression de ces paralogues peut varier, notamment entre les tissus, et être ainsi une source d'hétérogénéité de composition du ribosome.

Chez la souris, on retrouve par exemple les protéines RPL10, RPL22 et RPL39 possédant des paralogues (*i.e.*, RPL10-like, RPL22-like et RPL39-like) dont le profil d'expression diffère en fonction du tissu étudié (*i.e.*, testicules, foie, etc.) (Sugihara *et al.*, 2010). Chez l'Homme, l'exemple le plus décrit est celui de la protéine RPS4. En effet, la protéine RPS4 est codée par trois gènes distincts localisés sur le chromosome X (*RPS4X*) et sur le chromosome Y (*RPS4Y1* et *RPS4Y2*) (Lopes *et al.*, 2010). Chez le mâle, les protéines RPS4X et RPS4Y1 sont exprimées de façon ubiquitaire, tandis que RPS4Y2, dont la structure varie au niveau de l'extrémité carboxyle-terminale, est exprimée spécifiquement dans les testicules (Lopes *et al.*, 2010). L'expression différentielle des paralogues de RPS4 est suspectée de jouer un rôle dans la traduction spécialisée d'ARNm de façon tissu-spécifique. En effet, certaines modifications de séquences peuvent amener des modifications de la structure protéique, et donc interagir différemment avec les autres protéines ribosomiques ou autres co-facteurs (Lopes *et al.*, 2010; Xue & Barna, 2012). Dans le cas de la protéine RPL22, il a été montré que son paraglogue RPL22L1 est aussi capable d'intégrer les ribosomes traductionnellement actifs (O'Leary *et al.*,

2013). Ces données laissent donc supposer une redondance, au moins partielle, des paralogues entre eux au cours du processus de traduction.

Grâce aux données de séquençage en libre accès, on sait désormais que d'autres protéines ribosomiques et leur(s) paralogue(s) sont concernés par une expression différentielle inter-tissus. Par exemple, la protéine ribosomique RPL36A, codée sur le chromosome X, possède un paralogue, RPL36AL (RPL36A-like ; 99,6% d'homologie avec RPL36A), codé sur le chromosome 14 et dont le profil d'expression varie en fonction du tissu étudié. Bien que ces deux protéines ne diffèrent que d'un acide aminé (K38R), la protéine paralogue RPL36AL est plus exprimée que la forme native RPL36A dans le foie et le sang, tandis que RPL36A est plus exprimée dans les tissus mammaires et les fibroblastes en culture par exemple (Figure 7). En revanche, aucune étude sur l'activité différentielle de RPL36A et RPL36AL n'a été réalisée ou sur une intégration différentielle dans le ribosome.

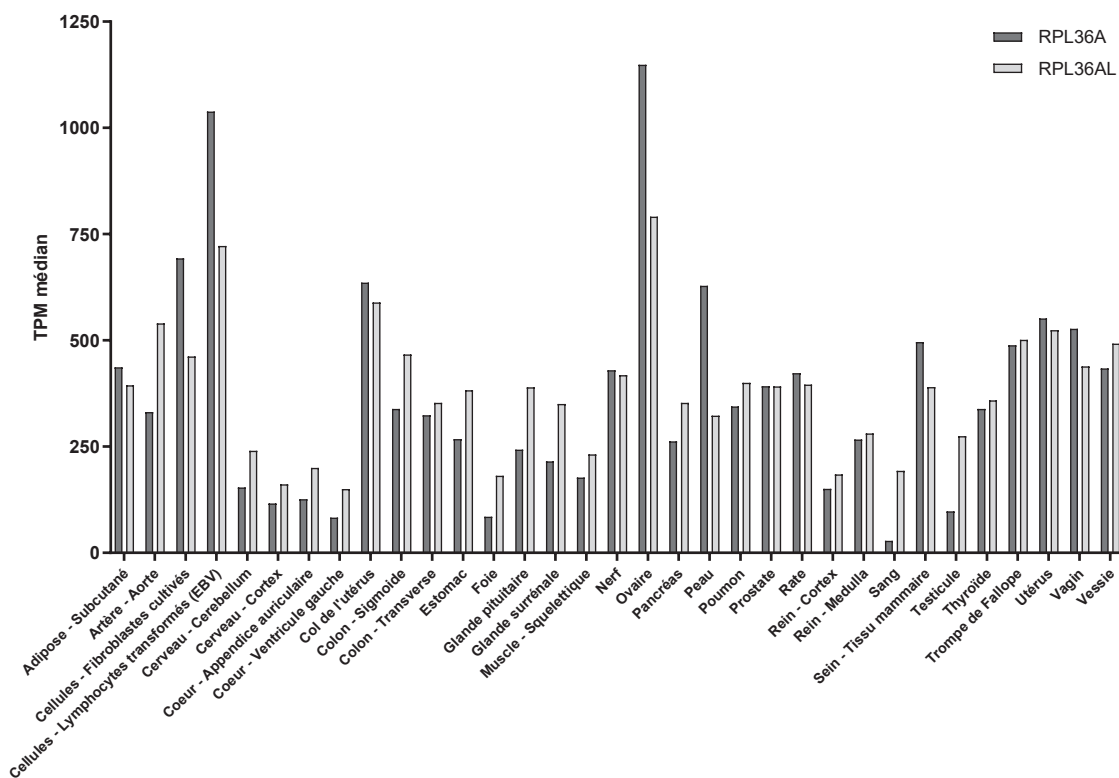


Figure 7 : Histogramme du nombre de transcrits par millions (TPM) médian pour les gènes RPL36A et RPL36AL dans différents tissus sains humains (source : GTEx Portal le 07/08/2023).

Par ailleurs, des évènements d'épissage alternatif ont été décrits pour certains gènes codant des protéines ribosomiques présents en une seule copie, augmentant ainsi le nombre de protéines ribosomiques utilisables par la cellule. En effet, Brumwell *et al.* ont mis en évidence dans des cellules HEK293 une variation de la proportion des isoformes classiques et alternatives des ARNm codant pour les protéines ribosomiques RPL10, RPL17, RPL22L1, RPS24 et RPS9 en condition hypoxique (Brumwell *et al.*, 2020). En particulier, la proportion de la forme protéique courte (codée par la forme alternative de l'ARNm *RPS24*) augmente entre 48% et 90% en condition hypoxique dans les trois lignées cellulaires cancéreuses étudiées (*i.e.*, glioblastome, carcinome colorectal et carcinome prostatique) et est intégrée dans les ribosomes en cours de traduction (Brumwell *et al.*, 2020). La forme courte de la protéine RPS24 contient trois résidus carboxyles de moins que la forme native. Or, RPS24 est décrit pour avoir un rôle dans l'interaction du ribosome avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4A1 (Padrón *et al.*, 2019). Ces données suggèrent donc un impact de RPS24, en fonction de son épissage alternatif, sur l'interaction avec eIF4A1 et donc sur l'activité traductionnelle du ribosome. En parallèle, dans une étude sur les cancers colorectaux, l'isoforme RPS24c est surexprimée dans les tissus tumoraux comparé aux tissus sains et promeut l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et la migration cellulaire (Y. Wang *et al.*, 2019). Néanmoins, cette étude n'a pas validé l'incorporation de l'isoforme RPS24c dans le ribosome, et il n'est donc pas possible de conclure sur un rôle direct ou indirect, intra- ou extra-ribosomiques de cette isoforme. Au vu de ces différentes études, il semblerait que les isoformes de RPS24 soient capables de s'intégrer dans les ribosomes et altérer la régulation traductionnelle en favorisant la traduction d'ARNm pro-prolifératif par exemple. Cependant, des preuves directes sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Bien que peu d'exemples aient été décrits, ces données suggèrent un rôle important des paralogues et isoformes des protéines ribosomiques dans l'activité traductionnelle du ribosome. En effet, de par leurs différences structurales avec la protéine de référence, ces paralogues et isoformes peuvent présenter des séquences et/ou conformations différentes, pouvant altérer la conformation et l'activité du ribosome en cas d'intégration au cours de la biogenèse (Tableau 1). De plus, ces paralogues et isoformes semblent dépendants de contextes physiopathologiques spécifiques et requièrent donc une attention particulière pour leur mise en

évidence et leur caractérisation. Ils constituent donc un nouvel enjeu dans la compréhension de l'hétérogénéité de composition du ribosome.

3. Modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques

Comme n'importe quelle protéine, les protéines ribosomiques sont sujettes aux modifications post-traductionnelles (*i.e.*, méthylation, acétylation, phosphorylation, etc.), faisant passer le catalogue protéique du ribosome de 80 protéines codées à plusieurs centaines de formes protéiques possibles (Emmott *et al.*, 2019). A l'heure actuelle, plus de 2500 modifications chimiques des protéines ribosomiques ont été répertoriées, chacune pouvant avoir un impact distinct sur l'activité ribosomique (Emmott *et al.*, 2019; Simsek & Barna, 2017). Or, comme dans le cas des altérations présentées jusqu'à présent, l'incorporation de ces différentes formes au sein du ribosome n'est pas systématiquement investiguée, et ne permet donc pas de statuer sur le lien entre modifications post-traductionnelles, activité traductionnelle et phénotype.

Les premières investigations sur le rôle des modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques commencent en 1974 et s'intéressent aux phosphorylations de la protéine RPS6. En effet, par purification de ribosomes suivie d'une électrophorèse bi-dimensionnelle, Gressner *et al.* ont démontré que RPS6 est phosphorylée dans les foies de rats en cours de régénération, et que cette forme phosphorylée de RPS6 est incorporée dans les ribosomes (Gressner & Wool, 1974). Plus tard, chez la souris, des expériences de mutagenèse (*i.e.*, de RPS6 ou des kinases S6K1/2) *in vivo* ont permis de démontrer que la phosphorylation de RPS6 permet la spécification et le fonctionnement de certains tissus (*e.g.*, pancréas, etc.) (Ruvinsky *et al.*, 2005), le développement de la masse musculaire (Ruvinsky *et al.*, 2009) mais également dans l'initiation tumoral dans le cas du carcinome pancréatique (Alliouachene *et al.*, 2008; Khalaileh *et al.*, 2013). Cependant, puisqu'aucune de ces études n'a évalué l'incorporation de la forme phosphorylée de RPS6 dans le ribosome, il n'est pas possible de savoir si la phosphorylation de RPS6 a un rôle intra- et/ou extra-ribosomique. La seule étude physio-pathologique ayant validé l'incorporation d'une forme phosphorylée de RPS6 est celle de Decourt *et al.* dans laquelle il est démontré que la forme phosphorylée de RPS6 favorise la régénération axonale du système nerveux central chez la souris (Decourt *et al.*, 2023). Au regard

de cette dernière étude, il peut donc être suggéré que l'impact phénotypique observé en réponse à la phosphorylation de RPS6 est médié par une activité intra-ribosomique de RPS6.

Le mécanisme moléculaire liant la phosphorylation de RPS6 et l'impact phénotypique observé semble reposer sur une augmentation de la synthèse protéique globale (Ruvinsky *et al.*, 2005), induisant une augmentation de la prolifération cellulaire (Ruvinsky *et al.*, 2005) associée à une taille réduite des cellules (Granot *et al.*, 2009; Ruvinsky *et al.*, 2009). Cependant, il a fallu attendre l'essor de nouvelles technologies d'analyses de la traduction afin d'affiner la compréhension du mécanisme moléculaire de la phosphorylation de RPS6. En 2021, par immunoprécipitation de ribosomes contenant ou non une phosphorylation de RPS6, Bohlen *et al.* ont démontré que les ribosomes contenant la forme phosphorylée de RPS6 traduisent préférentiellement des ARNm possédant une séquence codante courte, sans que l'origine de cette régulation ne soit connue (Bohlen *et al.*, 2021). En particulier, la phosphorylation de RPS6 est modulable au cours de la traduction : les ribosomes contenant une protéine RPS6 phosphorylée perdent la phosphorylation de RPS6 lors de la traduction d'ARNm possédant une séquence codante longue (Bohlen *et al.*, 2021). Cette découverte valide tout d'abord l'existence de ribosomes contenant des protéines modifiées post-traductionnellement mais également que ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle dans l'activité intrinsèque du ribosome. En revanche, cette étude ne relie pas le mécanisme moléculaire observé au phénotype physiopathologique connu et ne permet pas de déchiffrer complètement l'impact de la phosphorylation de RPS6 sur l'activité traductionnelle du ribosome.

En conclusion, il existe une variété non négligeable de modifications post-traductionnelles pouvant impacter, ou non, le phénotype. La caractérisation de ces protéines ribosomiques modifiées, ainsi que l'étude de leurs mécanismes d'action, est complexe et nécessite l'utilisation de technologies de pointe (*i.e.*, profil de polysomes, *ribosome profiling*, spectrométrie de masse, etc.). En dehors des exemples présentés ci-dessus, plusieurs autres mécanismes moléculaires impliquant des modifications post-traductionnelles de protéines ribosomiques ont été décrits dans la littérature (Emmott *et al.*, 2019; Simsek & Barna, 2017). Cependant, il existe de nombreuses modifications répertoriées mais dont l'impact moléculaire et/ou phénotypique n'a pas été décrit. Par exemple, huit modifications post-traductionnelles de la séquence codante de la protéine RPL36A ont été décrites (*e.g.*, phosphorylations, acétylations, ubiquitinations et méthylations) (Eustache *et al.*, 2017; Hornbeck *et al.*, 2015;

Mahesh *et al.*, 2020). En revanche, le rôle de ces modifications post-traductionnelles est peu connu. Les données semblent montrer que la mono-méthylation des résidus K53, K55, K80 et K100 favorise la traduction, sans démonstration claire du mécanisme ou de l'impact phénotypique de ces modifications (Eustache *et al.*, 2017; Mahesh *et al.*, 2020; Shirai *et al.*, 2010).

4. Variation de la stœchiométrie des protéines ribosomiques au sein du ribosome : un ribosome à moins de 80 protéines ?

Dès le début des années 1970, l'idée selon laquelle le ribosome est systématiquement constitué d'un nombre constant de protéines est remise en cause chez la bactérie : la notion de ribosome substœchiométrique est née. En effet, des bactéries cultivées dans différents milieux n'expriment pas la même quantité de protéines ribosomiques RPS6, RPS21 ou RPL12, laissant sous-entendre l'existence de ribosomes dépourvus de certaines protéines ribosomiques (non démontré) (Deusser & Wittmann, 1972; Weber, 1972). Cependant, ces observations seront laissées de côté pendant près de 30 ans. Ce n'est donc qu'au début des années 2000 que l'idée d'un ribosome présentant une proportion substœchiométrique de protéine(s) ribosomique(s) chez les mammifères commence à émerger, appuyée par les avancées technologiques de séquençage.

En 2001, Bortoluzzi *et al.* ont mis en évidence 13 protéines ribosomiques dont l'expression génique varie, chez l'Homme, en fonction du tissu étudié. Par exemple, RPS9, RPS10, RPS19, RPL14 et RPL38 sont plus exprimées dans les ovaires, au niveau transcriptomique, tandis que RPS17, RPS25, RPL37 et RPL41 sont plus exprimées dans les tissus musculaires squelettiques (Bortoluzzi *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confortés en 2011 par les études de Kondrashov *et al.* sur des embryons murins, démontrant l'expression différentielle de 72 gènes codant pour des protéines ribosomiques en fonction de la localisation cellulaire dans l'embryon (Kondrashov *et al.*, 2011). Bien que ces études soient uniquement réalisées au niveau transcriptomique et ne permettent pas de démontrer une différence d'incorporation protéique dans le ribosome, elles ont initié l'idée d'un ribosome présentant une proportion substœchiométrique de protéine(s) ribosomique(s). Cette hypothèse est d'autant

plus soutenue au niveau phénotypique par la délétion de certaines protéines ribosomiques dans les cas de DBA développés précédemment (cf. Chapitre 2 – partie II-1).

De nombreuses études chez la levure soutiennent la notion de ribosome substœchiométrique par des analyses de spectrométrie de masse sur ribosomes purifiés. Par exemple, Slavov *et al.* ont démontré que la présence de certaines protéines ribosomiques au sein du ribosome est préférentielle au sein des ribosomes traductionnellement actifs (Slavov *et al.*, 2015). Par exemple, RPL26A est présente en plus grande proportion dans les polysomes que dans les monosomes, contrairement à RPL35B qui est retrouvée en plus grande quantité dans les monosomes que dans les polysomes chez la levure (Slavov *et al.*, 2015). Des études similaires ont été menées chez les mammifères. Ainsi, dans des cellules souches embryonnaires murines, 4 protéines ribosomiques (RPS26, RPL10, RPL38 et RPL40) ont été montrées comme plus enrichies dans les polysomes par rapport aux ribosomes libres et 3 protéines ribosomiques (RPS7, RPS25 et RPL10A) ont été montrées comme moins enrichies dans les polysomes par rapport aux ribosomes libres (Z. Shi *et al.*, 2017). En revanche, l'impact de la substœchiométrie de ces protéines ribosomiques n'a pas été adressé.

D'un point de vue moléculaire, la démonstration d'un lien entre ribosome substœchiométrique, régulation traductionnelle et phénotype est complexe. De nombreuses études se concentrent sur la première partie de ce lien : ribosome substœchiométrique et régulation traductionnelle. Par exemple, en 2012, Lee *et al.* ont démontré dans les cellules HeLa que l'inhibition de RPL40 induit une diminution de la traduction dépendante des IRES des ARNm viraux (*i.e.*, virus de la stomatite vésiculaire) (Lee *et al.*, 2013). De la même façon, l'étude de Kondrashov *et al.* démontre que la déplétion de la protéine RPL38 augmente la traduction préférentielle de certains ARNm de la famille *Hox* (Kondrashov *et al.*, 2011). Ces deux études permettent de soutenir l'hypothèse que la substœchiométrie des protéines ribosomiques peut impacter la régulation traductionnelle. En revanche, aucune n'a validé la présence substœchiométrique des protéines RPL40 et RPL38 dans les ribosomes. L'une des premières études démontrant l'absence d'une protéine ribosomique au sein du ribosome est l'étude menée par Wei *et al.* en 2019 (Wei *et al.*, 2019). Cette étude démontre que la déplétion de RPL28 induit la formation de ribosomes substœchiométrique pour RPL28 et que les cellules présentant moins de ribosomes contenant RPL28 traduisent, de façon plus importante, les peptides antigéniques du virus de la grippe (Wei *et al.*, 2019). Ainsi, cette étude (i) démontre

l'existence de ribosomes substœchiométriques en réponse à la déplétion d'une protéine ribosomique et (ii) suggère fortement un impact de cette substœchiométrie sur la régulation traductionnelle.

Chez les mammifères, à l'heure actuelle, une seule étude a permis de démontrer clairement le lien entre ribosome substœchiométrique et activité traductionnelle du ribosome. En 2017, Shi *et al.* publient une étude investiguant la composition du ribosome et sa régulation traductionnelle des cellules souches embryonnaires murines (Z. Shi *et al.*, 2017). Les cellules souches embryonnaires murines présentent deux populations de ribosomes : certains incluant la protéine RPL10A, et d'autres la protéines RPS25 (Z. Shi *et al.*, 2017). A l'aide de profils de polysomes, Shi *et al.* ont montré que les ribosomes contenant la protéine RPL10A traduisent préférentiellement les ARNm codant pour des protéines de la matrice extracellulaire, tandis que ceux contenant la protéine RPS25 traduisent préférentiellement les ARNm codant pour des protéines de la voie de signalisation de la vitamine B12 (Z. Shi *et al.*, 2017). En particulier, les ribosomes contenant RPL10A régulent la traduction dépendante des IRES (Z. Shi *et al.*, 2017). Cette étude a été confortée par l'implication des ribosomes contenant RPL10A dans la traduction préférentielle d'ARNm pro-fibrotique (*e.g.*, TIMP1, CD90, etc.) (Grgic *et al.*, 2014) et la diminution de ce type de ribosomes au cours de la différenciation du mésoderme chez la souris (Genuth *et al.*, 2022). Néanmoins, l'étude de Shi *et al.* n'ayant pas été réalisée au niveau de la cellule unique, il n'est pas possible de savoir si les deux populations de ribosomes sont présentes au sein de la même cellule, et donc si la substœchiométrie observée est intra- ou inter-cellulaire, ni même si les ribosomes possédant RPL10A possèdent également RPS25 (et/ou réciproquement).

En conclusion, la substœchiométrie du ribosome est suspectée depuis les années 1970 mais s'est heurtée à la complexité des analyses nécessaires. L'essor de nouvelles technologies de quantification permet à présent de répondre à ces questions. Actuellement, il est démontré dans plusieurs contextes physio-pathologiques que les ribosomes peuvent présenter une stœchiométrie différente. Il est donc question à présent (i) de caractériser la composition du ribosome dans de nouveaux contextes physio-pathologiques et (ii) de mieux comprendre l'impact de cette hétérogénéité sur l'activité du ribosome et la régulation traductionnelle. Par exemple, la protéine RPL36A a été démontrée comme présente de façon substœchiométrique en fonction de la localisation subcellulaire (*i.e.*, enrichissement de ribosomes contenant

RPL36A dans les neurites) dans les cellules neuronales humaines (Fusco *et al.*, 2021). En revanche, l'impact de cette substœchiométrie sur l'activité traductionnelle du ribosome n'a pas été évaluée.

5. Hétérogénéité de composition du ribosome et protéines ribosomiques : et RPL36A dans tout cela ?

Toutes ces données suggèrent l'existence de ribosomes dont une des 80 protéines ribosomiques peut être absente, mutée ou modifiée sans induire la mort cellulaire. Ces modifications semblent plutôt affecter l'activité du ribosome, ou tout du moins la régulation traductionnelle, et ainsi induire un phénotype particulier. En revanche, de nombreuses études se basent uniquement sur des données d'expression des protéines ribosomiques, sans analyser des ribosomes purifiés, et ne permettent donc qu'une corrélation entre altération d'expression d'une protéine ribosomique et altération de composition du ribosome et de son activité. La problématique reste de savoir si l'altération d'expression d'une protéine ribosomique affecte la traduction *via* un effet intra- ou extra-ribosomique. C'est en cela que le concept de « ribosome spécialisé » reste source de débat, le lien entre hétérogénéité de composition du ribosome, modulation de l'activité intrinsèque du ribosome, spécification d'une reprogrammation traductionnelle et phénotypique restant à être pleinement démontré. Les mêmes manques existent pour les modifications chimiques des ARNr.

C'est notamment le cas de la protéine ribosomique RPL36A. D'un point de vue moléculaire, les études structurales du ribosome humain ont soulevé l'importance de l'acide aminé P54 de RPL36A dans l'interaction du ribosome avec les inhibiteurs traductionnels tels que le cycloheximide (Zgadzay *et al.*, 2022). De plus, RPL36A semble essentielle pour l'interaction du ribosome avec l'ARNt, comme démontré pour son paralogue RPL36AL (99,6% d'homologie avec RPL36A) (Baouz *et al.*, 2009). De plus, les études moléculaires chez la levure ont montré que la déplétion de *RPL36A* induit une diminution de la traduction dépendante des IRES pour les ARNm *HSP82* et *URE2* sans savoir si cette fonction est intra- ou extra-ribosomique (Samanfar *et al.*, 2017). D'un point de vue phénotypique, les études chez le poisson-zèbre montrent que la déplétion de *RPL36A* induit un défaut développemental de la boîte crânienne (Uechi *et al.*, 2006) et celles chez la levure une augmentation une diminution de la résistance aux stress chimique (*i.e.*, acide acétique) et thermique (Samanfar *et al.*, 2017).

Chez l'Homme, une forte expression de *RPL36A* est associée à un mauvais pronostic dans les carcinomes hépatiques, les leucémies myéloïdes aiguës et les carcinomes oraux (T. W. Chen *et al.*, 2021; J. H. Kim *et al.*, 2004; L.-M. Wu *et al.*, 2010). L'association de ces deux visions permet de supposer un rôle central de la protéine RPL36A dans la traduction spécifique d'ARNm en fonction du contexte cellulaire pour contribuer à l'établissement d'un phénotype particulier, mais cette hypothèse n'a pour le moment pas été démontrée. Il en est de même pour de nombreuses protéines ribosomiques dont les études ne relèvent pour le moment que d'associations. L'exemple le plus avancé reste RPL10A et RPS25 dans les cellules souches embryonnaires murines et leur rôle dans la spécification d'un programme traductionnel, sans démonstration du rôle phénotypique.

Tableau 1 : Exemples de démonstrations d'hétérogénéité de composition du ribosome et de ribosome spécialisé. RP : protéines ribosomiques ; X : nombreuses références.

		Hétérogénéité		Ribosome spécialisé Traduction		Ribosome spécialisé Phénotype	
		Global	Intra-ribosomique	Global	Intra-ribosomique	Global	Intra-ribosomique
ARNr	Variations nucléotidiques	(Parks <i>et al.</i> , 2018)				(J. S. Johnson <i>et al.</i> , 2019)	
	Modifications de bases	18S_m1acp3Ψ1248 (Babaian <i>et al.</i> , 2020) 28S_m5C3782 (Heissenberger <i>et al.</i> , 2019; Janin <i>et al.</i> , 2019)		18S_m1acp3Ψ1248 (Babaian <i>et al.</i> , 2020)	28S_m5C3782 (Janin <i>et al.</i> , 2019)	28S_m5C3782 (Heissenberger <i>et al.</i> , 2019; Janin <i>et al.</i> , 2019)	
	Pseudo-uridylation	DKC1	DKC1	DKC1	DKC1	DKC1	
	2'Ome	X	(Erales <i>et al.</i> , 2017)	(Jansson <i>et al.</i> , 2021; Pauli <i>et al.</i> , 2020)	(Erales <i>et al.</i> , 2017)	(Pauli <i>et al.</i> , 2020)	
RP	Mutation			(Kampen <i>et al.</i> , 2019)		(Draptchinskai <i>a et al.</i> , 1999; Farrar <i>et al.</i> , 2008; Gazda <i>et al.</i> , 2008; Quarello <i>et al.</i> , 2010; M. J. Song <i>et al.</i> , 2010)	
	Paralogue/ isoforme	RPS4 (Lopes <i>et al.</i> , 2010) RPS24 (Brumwell <i>et al.</i> , 2020)				RPS24 (Y. Wang <i>et al.</i> , 2019)	
	Modification post-traductionnelle	RPS6 (Gressner & Wool, 1974)	RPS6 (Decourt <i>et al.</i> , 2023)			RPS6 (Granot <i>et al.</i> , 2009; Ruvinsky <i>et al.</i> , 2005, 2009)	RPS6 (Decourt <i>et al.</i> , 2023)
	Substœchiométrie		RPL10A, RPS25 (Z. Shi <i>et al.</i> , 2017)		RPL10A, RPS25 (Z. Shi <i>et al.</i> , 2017)		RPL10A (Genuth <i>et al.</i> , 2022; Grgic <i>et al.</i> , 2014)

Chapitre 3 : La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique dynamique et réversible permettant la transdifférenciation d'une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse. Ce processus physiologique est indispensable à différentes étapes de la vie, et permet par exemple la formation des organes au cours de l'embryogenèse (EMT type I) ou de leur homéostasie chez l'adulte (EMT type II). L'EMT fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires comme plusieurs familles des facteurs de transcription (EMT-TFs) pour induire des modifications moléculaires (*i.e.*, perte d'expression de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine en faveur de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine) à l'origine de changements structuraux et comportementaux de la cellule ; les cellules épithéliales réalisant une fonction physiologique précise à une localisation donnée et leur transdifférenciation en cellules mésenchymateuses permettant leur déplacement dans l'organisme. Du fait de l'importance de l'EMT dans la physiologie de nos organes, sa dérégulation a été associée à de nombreuses pathologies, telles le cancer (EMT type III). Pourtant décrite dès les années 1970, l'EMT continue d'être activement investiguée et les recherches mettent en avant des rôles et mécanismes de plus en plus précis dévoilant ainsi la complexité de ce processus physiopathologique.

Dans ce chapitre, je traiterai des connaissances actuelles et incertitudes persistantes concernant les aspects moléculaires et cellulaires mais aussi, physiologiques et pathologiques, de l'EMT. Etant donné que l'EMT est avant tout un changement de morphologie cellulaire associé à des fonctions biologiques particulières, je commencerai par cet aspect (partie I) avant de décrire comment ces changements sont induits au niveau moléculaire (partie II) puis les différents types d'EMT décrits jusqu'à présent (partie III). Enfin, je terminerai par une revue de la littérature résumant les connaissances actuelles autour de la régulation traductionnelle et du ribosome dans l'EMT (partie IV).

I. Aspect cellulaire de la transition épithélio-mésenchymateuse

1. Organisation, morphologie et comportement des cellules épithéliales et mésenchymateuses

La transition épithélio-mésenchymateuse implique une transdifférenciation cellulaire, c'est-à-dire des changements organisationnels, morphologiques et comportementaux de la cellule. Il est à noter que pour cette partie, les citations bibliographiques peuvent paraître éparpillées et donc manquantes. En effet, ces notions reposent sur des démonstrations remontant au début du champ de recherche autour de la biologie cellulaire et de l'EMT, pour lesquelles les références d'origine sont peu accessibles voire difficile à trouver du fait de référencement trop « récent ». Ici est donc retranscrit le savoir commun retrouvé dans l'ensemble des articles de référence dans le domaine pour décrire les différences entre cellules épithéliales et mésenchymateuses.

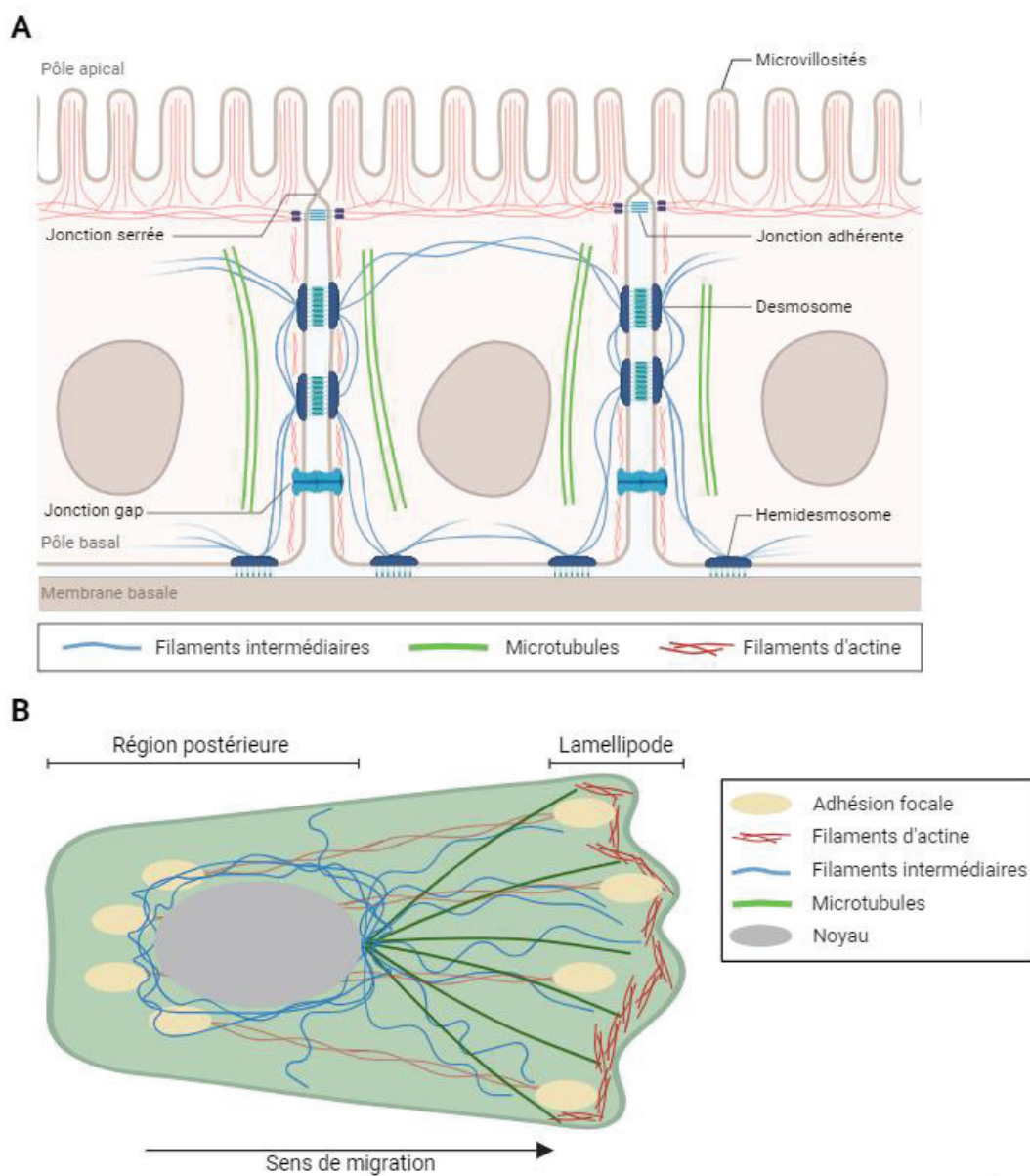


Figure 8 : Schémas de l'organisation cytosquelettique des cellules épithéliales (A) et mésenchymateuses (B). Adapté de (Bartle et al., 2018) et (Seetharaman & Etienne-Manneville, 2020).

a. Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales constituent les tissus communément appelés « épithéliums ». Ces épithéliums peuvent être de formes (squameux, cubique ou colonne) et de structures (simple, stratifié ou pseudostratifié) variées. Ils constituent toutes les surfaces du corps, depuis la peau jusqu'aux organes et réalisent des fonctions biologiques très différentes mais indispensables à la vie, comme, par exemple, la respiration ou la digestion. Du fait de la multitude de fonctions des épithéliums, je me concentrerai dans cette partie sur leurs points communs. La délimitation de chaque épithélium est définie par une zone sans contact (pôle cellulaire apical) et une zone en contact avec la membrane basale (pôle cellulaire basal) (Figure 8A) (Lamouille *et al.*, 2014). Le maintien de cette structure et de sa polarité repose sur le cytosquelette.

i. Polarité apico-basale et jonctions cellulaires

La région cellulaire apicale, positionnée vers l'extérieur de l'organe, porte les structures essentielles à l'activité biologique de l'épithélium, comme les microvillosités ou les cils. Ainsi, les fonctions de chaque épithélium (*e.g.*, protection, absorption, sécrétion, audition, etc.) sont définies par la structure même du pôle apical des cellules épithéliales. Les cellules possédant des microvillosités sont spécialisées dans les échanges avec l'extérieur (*e.g.*, épithélium pulmonaire, gastrique, etc.), les cellules ciliées permettent le transport de substances (*e.g.*, muqueuses naso-bucale, vaginale, etc.) et les cellules sans structure apicale particulière ont un rôle de délimitation et de protection (*e.g.*, peau, vaisseaux sanguins, organes, etc.) (Karseladze, 2015; Kong *et al.*, 2018; Lange, 2011). D'un point de vue moléculaire, les microvillosités sont structurées par des filaments d'actine, tandis que les cils sont constitués de microtubules (*i.e.*, cytosquelette) (Lange, 2011; Pelaseyed & Bretscher, 2018).

La région cellulaire basale permet quant à elle l'ancrage de la cellule dans l'organe et constitue ainsi le point d'attache de la cellule (Figure 8A). Les cellules épithéliales sont liées à la membrane basale par les jonctions de type hémidesmosomes associées à des filaments intermédiaires (Bartle *et al.*, 2018). La membrane basale marque l'interface entre l'épithélium (*i.e.*, endothélium, épithélium ou muqueuse glandulaire selon le contexte) et les tissus conjonctifs de soutien sous-jacents. Sur le plan moléculaire, elle est essentiellement constituée de collagène de type IV, de glycosaminoglycanes et de glycoprotéines de structure.

La région latérale, comprise entre les régions apicale et basale, permet aux cellules épithéliales d'interagir entre elles et de former une barrière uniforme et étanche. Les jonctions cellule-cellule de la région latérale sont formées par des jonctions serrées (zone en apex),

caractérisées par la présence de protéines des familles des claudines, occludines et *zona occludens* (ZO) ; des jonctions adhérentes, caractérisées par la présence de la glycoprotéine transmembranaire E-cadhérine (CDH1) et β -caténine ; des desmosomes et des jonctions gap permettant le passage d'ions et de petites molécules entre cellules (Figure 8A) (Bartle *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2012).

ii. *Cytosquelette*

La structure des cellules épithéliales est maintenue par le cytosquelette (filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires). Les filaments d'actine sont principalement localisés au niveau du pôle basal sous forme de fibres de stress. L'une des extrémités des filaments d'actine est directement liée à la membrane plasmique, par le biais de protéines associées à l'actine (*actin-associated proteins*, AAP), au niveau des zones de contact focal tandis que la seconde extrémité est reliée à un autre contact focal ou aux filaments intermédiaires localisés au niveau du noyau (Alberts *et al.*, 1994; Luna & Hitt, 1992; Mills, 1996). Des filaments d'actine sont également présents au niveau des différentes jonctions d'adhésion des zones latérale et apicale (Figure 8A). Cette organisation d'actine le long de la membrane plasmique permet le maintien de l'intégrité cellulaire (Fath *et al.*, 1993; Mills, 1996; Mills *et al.*, 1994).

Les microtubules sont localisés dans la zone apicale, sous les filaments d'actine, et dans les régions proches du noyau (Mills, 1996). Contrairement aux filaments d'actine, les microtubules ne sont pas ancrés à la membrane plasmique mais au niveau du centrosome. Leur orientation, du pôle basal vers le pôle apical, permet le transport des vésicules intracellulaires depuis l'appareil de Golgi vers les différentes zones cellulaires, que ce soit pour le renouvellement des jonctions cellulaires en constant renouvellement ou pour l'activité du pôle apical (*i.e.*, sécrétion, etc.) (Gilbert *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2012; Hunziker *et al.*, 1990; Mills, 1996).

Les filaments intermédiaires sont constitués de protéines diverses, dont majoritairement les kératines dans les cellules épithéliales. Les protéines de kératines s'associent entre elles par leurs domaines *coiled-coiled* et forment des filaments reliant les jonctions cellule-cellule (desmosomes) et cellule-substrat (hémidesmosomes) (Figure 8A) (Fuchs & Weber, 2003). Certaines études démontrent également une interaction entre filaments intermédiaires et membrane plasmique *via* les protéines associées à l'actine (Asch *et al.*, 1990; Horkovics-Kovats

& Traub, 1990) ainsi qu'avec le noyau (Georgatos & Blobel, 1987). Ce réseau de filament intermédiaires vient ainsi en soutien du réseau d'actine afin de renforcer la structure cellulaire.

b. Les cellules mésenchymateuses

Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses sont dépourvues de polarité apico-basale et sont douées de motilité et d'invasion des tissus environnants. Ces cellules mésenchymateuses sont indispensables à de nombreux processus physiologiques mais aussi pathologiques, comme la fibrose ou la progression métastatique (cf. Chapitre 3 – partie III) (Lamouille *et al.*, 2014). Les cellules mésenchymateuses possèdent une morphologie fibroblastique (*i.e.*, allongée) dont le maintien et les fonctions reposent sur un cytosquelette en constante évolution (*e.g.*, actine, vimentine, tubuline, etc. ; Figure 8B). Ainsi, dans cette partie, je me concentrerai sur les différentes fonctions portées par les cellules mésenchymateuses, les composants du cytosquelette mésenchymateux étant principalement utilisés comme marqueurs de caractérisation cellulaire.

i. Adhésion et migration

L'adhésion des cellules mésenchymateuses avec leur substrat (*i.e.*, matrice extracellulaire) est médiée par les protéines de la famille des intégrines localisées à la membrane plasmique. Ces intégrines sont reliées au reste de la cellule par le cytosquelette d'actine et permettent la formation de projections membranaires permettant la migration cellulaire (Abercrombie *et al.*, 1971; Kirfel *et al.*, 2004).

Les protéines de la famille des intégrines sont des protéines transmembranaires divisées en deux classes (α et β) dont l'activité est permise par des dimères α - β . L'extrémité extracellulaire du complexe α - β permet l'interaction avec leur ligand (*e.g.*, collagène, fibronectine, laminines, etc.) et l'extrémité intracellulaire est liée au cytosquelette d'actine (Wehrle-Haller, 2012). Généralement, la sous-unité α du complexe se lie tout d'abord au cytosquelette d'actine avant de recruter la sous-unité β . Une fois le complexe formé, des modifications post-traductionnelles de ces sous-unités d'intégrines sont nécessaires pour le bon fonctionnement de l'adhésion, comme par exemple la phosphorylation de Ser785 de la sous-unité β 1A (Destaing *et al.*, 2010). L'interaction du complexe mature avec son ligand induit un changement conformationnel du complexe produisant une force de traction suffisante pour déformer la membrane plasmique (Humphries *et al.*, 2006; Wehrle-Haller, 2012). Le maintien

de l'interaction entre le domaine intracellulaire et le cytosquelette d'actine nécessite alors le recrutement de la protéine Talin (Miyamoto *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2007).

La contraction et la déformation du cytosquelette d'actine permet la création de projections cytoplasmiques permettant à la cellule de sonder son environnement et se déplacer. Parmi les projections cytoplasmiques, on distingue les lamellipodes, formant des structures planes et larges, et les filopodes, formant des structures fines et allongées (Figure 8B) (Lamouille *et al.*, 2014; Ridley, 2011). Lorsque ces podés se forment en grande quantité à une extrémité cellulaire, en réponse à la détection de ligands d'intérêt par les intégrines, la cellule entre alors en migration. En effet, les forces de traction exercées par le cytosquelette d'actine permettent alors sa contraction. Dans le même temps, les protéines Talin, accumulées dans la zone de migration, ne sont plus disponibles pour les autres sites d'adhésion, renforçant ainsi l'activation en un point donné. Dépourvus de Talin, les sites d'adhésion les plus éloignés du front de migration ne pourront pas initier de force de traction suffisante. Les intégrines se détachent alors de leur ligand et induisent la rétractation du cytoplasme (Wehrle-Haller, 2012). On observe ainsi une migration monodirectionnelle de la cellule en conséquence de la force de traction induite par l'interaction des intégrines avec leur ligand.

ii. Dégradation de la matrice extracellulaire

Dans un milieu en trois dimensions, comme c'est le cas *in vivo*, les tissus sont composés, en plus des cellules, de matrice extracellulaire dense formant le tissu interstitiel. Il est donc nécessaire pour les cellules motiles de pouvoir dégrader cette matrice extracellulaire afin de pouvoir circuler dans l'organisme.

La matrice extracellulaire est constituée d'un enchevêtrement de plus de 300 types de fibres protéiques différentes (*i.e.*, matrisome) telles que les collagènes, les laminines, ou la fibronectine (Bonnans *et al.*, 2014; Hynes & Naba, 2012). Ces protéines sont regroupées en trois grandes familles : les collagènes, les protéoglycanes et les glycoprotéines (Bonnans *et al.*, 2014; Hynes & Naba, 2012). Les collagènes sont divisés en deux sous-types, fibrillaires (*e.g.*, collagènes I-III, V et XI) et non-fibrillaires, et permettent de maintenir la rigidité et l'intégrité du tissu. Les protéoglycanes et les glycoprotéines (*e.g.*, laminines, fibronectines, etc.) sont enchevêtrés entre les fibres de collagène et permettent (i) de combler les zones interstitielles et (ii) de séquestrer des protéines et facteurs de croissance qui sont relargués en cas de lyse de la matrice extracellulaire. Les protéoglycanes sont également capables de séquestrer des

molécules d'eau afin de maintenir l'hydratation tissulaire (Bonnans *et al.*, 2014; Hynes & Naba, 2012).

Afin de pouvoir se déplacer sans entrave dans l'organisme, les cellules mésenchymateuses ont donc développé la capacité de digérer cette matrice extracellulaire. En effet, parmi les projections cytoplasmiques générées par les cellules mésenchymateuses, on distingue les invadosomes, spécialisés dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Ridley, 2011). Ces invadosomes sont la zone de relargage privilégiée des protéases par exocytose et particulièrement de la protéine MT1-MMP (aussi appelée MMP-14) (Poincioux *et al.*, 2009). Il existe différentes familles de protéases sécrétées par les cellules mésenchymateuses, dont la plus importante est la famille des *matrix metalloproteinases* (MMP) (Bonnans *et al.*, 2014). Les MMPs sont relarguées dans le milieu extracellulaire sous forme de précurseur enzymatique et activées par clivage protéolytique (*e.g.*, par des sérine-protéases ou d'autres MMPs) ou oxydation (*e.g.*, par les espèces réactives de l'oxygène) (Bonnans *et al.*, 2014). L'activité des MMPs est régulée par des protéines inhibitrices, appelées inhibiteurs de métalloprotéinases tissulaires (TIMP). Les quatre représentants de la famille des protéines TIMP sont capables de réguler toutes les MMPs, de façon plus ou moins efficace. Ainsi, la protéine TIMP-1 est un inhibiteur peu efficace de MT1-MMP par exemple mais est plus efficace sur ADAM-10. De la même façon, on observe une meilleure efficacité de TIMP-3 sur les MMPs de la famille ADAM (Nagase *et al.*, 2006). En particulier, TIMP-3 est un régulateur majeur des MMPs puisque sa mutation homozygote chez la souris entraîne des dommages alvéolaires dans les poumons, une apoptose accélérée dans les cellules épithéliales mammaires et une inflammation anormale après hépatectomie (Fata *et al.*, 2001; Leco *et al.*, 2001; Mohammed *et al.*, 2004).

La sécrétion des MMPs par les invadosomes cellulaires permet la création d'une boucle de régulation promotrice de la motilité cellulaire. En effet, l'adhésion des invadosomes à la matrice extracellulaire s'effectue simultanément avec l'exocytose des MMPs. La dégradation de la matrice sur laquelle repose l'invadosome va le forcer à pénétrer plus profondément dans la matrice afin de trouver un nouveau point d'attache (Albiges-Rizo *et al.*, 2009; Kryczka & Boncela, 2017; Linder *et al.*, 2011). De plus, la dégradation de la matrice extracellulaire induit le relargage des protéines séquestrées (Bonnans *et al.*, 2014; Hynes, 2009). Parmi ces protéines séquestrées et relarguées, on retrouve notamment le TGF β , promoteur majeur de l'EMT (cf. Chapitre 3 – partie II-2).

2. Aspect dynamique de l'EMT

La transition de l'état épithélial à l'état mésenchymateux est un processus cellulaire complexe, permettant des changements morphologiques et comportementaux majeurs. Ainsi, au cours de l'EMT, les cellules épithéliales perdent leurs jonctions cellulaires et leur polarité apico-basale, mais gagnent en motilité. Le cytosquelette lui-même est profondément impacté puisque les filaments intermédiaires composés de cytokératine sont remplacés par les filaments composés de vimentine (Huang *et al.*, 2012; Thiery, 2002). L'enchaînement de ces événements au cours de l'EMT, et donc la dynamique de l'EMT, n'est pas encore totalement comprise et reste un enjeu majeur dans les recherches actuelles.

L'EMT est historiquement représentée par une succession linéaire d'évènements moléculaires permettant la perte progressive des caractéristiques épithéliales associée au gain progressif des caractéristiques mésenchymateuses (Figure 9A). La succession de ces étapes permet ainsi l'obtention d'une cellule exprimant des caractéristiques uniquement mésenchymateuses (Figure 9A). Cependant, l'amélioration des technologies d'analyses omiques et d'imagerie ont remis en question ce dogme.

Actuellement, un consensus tend tout d'abord à établir que les observations d'EMT complète (*i.e.*, l'obtention d'une cellule exprimant uniquement des caractéristiques mésenchymateuses) relèvent d'artéfacts expérimentaux réalisés *in vitro* (Dongre & Weinberg, 2019; J. Yang *et al.*, 2020). En effet, l'étude de cellules mésenchymateuses provenant de patients ou modèles murins montrent des caractéristiques plus ambiguës, partageant des marqueurs moléculaires épithéliaux et mésenchymateux (Figure 9A) (Dongre & Weinberg, 2019; Shibue & Weinberg, 2017). Ces observations sont également confortées par le fait que les facteurs de transcription de l'EMT dits « faibles » (*i.e.*, permettant l'expression conjointe de facteurs épithéliaux et mésenchymateux) sont les EMT-TFs majoritairement impliqués dans les EMT physiologiques (*i.e.*, familles Snail et Twist ; cf. Chapitre 3 – partie III).

L'idée d'une succession linéaire d'évènements est également mise en question par des observations plus récentes. Du fait de la pluralité des voies de signalisation pouvant aboutir à l'établissement de l'EMT, il est désormais admis qu'il existe autant d'EMT que de type et de contexte cellulaires (J. Yang *et al.*, 2020). En effet, les états partiels de l'EMT (*i.e.*, présence de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au sein d'une même cellule) sont difficilement caractérisés, et caractérisables, car différents en fonction du contexte cellulaire (J. Yang *et al.*, 2020). De plus, l'acquisition des caractéristiques mésenchymateuses n'étant pas définitive

(réversion du processus par transition mésenchymato-épithéliale, MET ; cf. Chapitre 3 – partie III-1), le nouveau modèle de schématisation de l'EMT devrait donc ressembler à un réseau d'états cellulaires, connectés entre eux et réversibles.

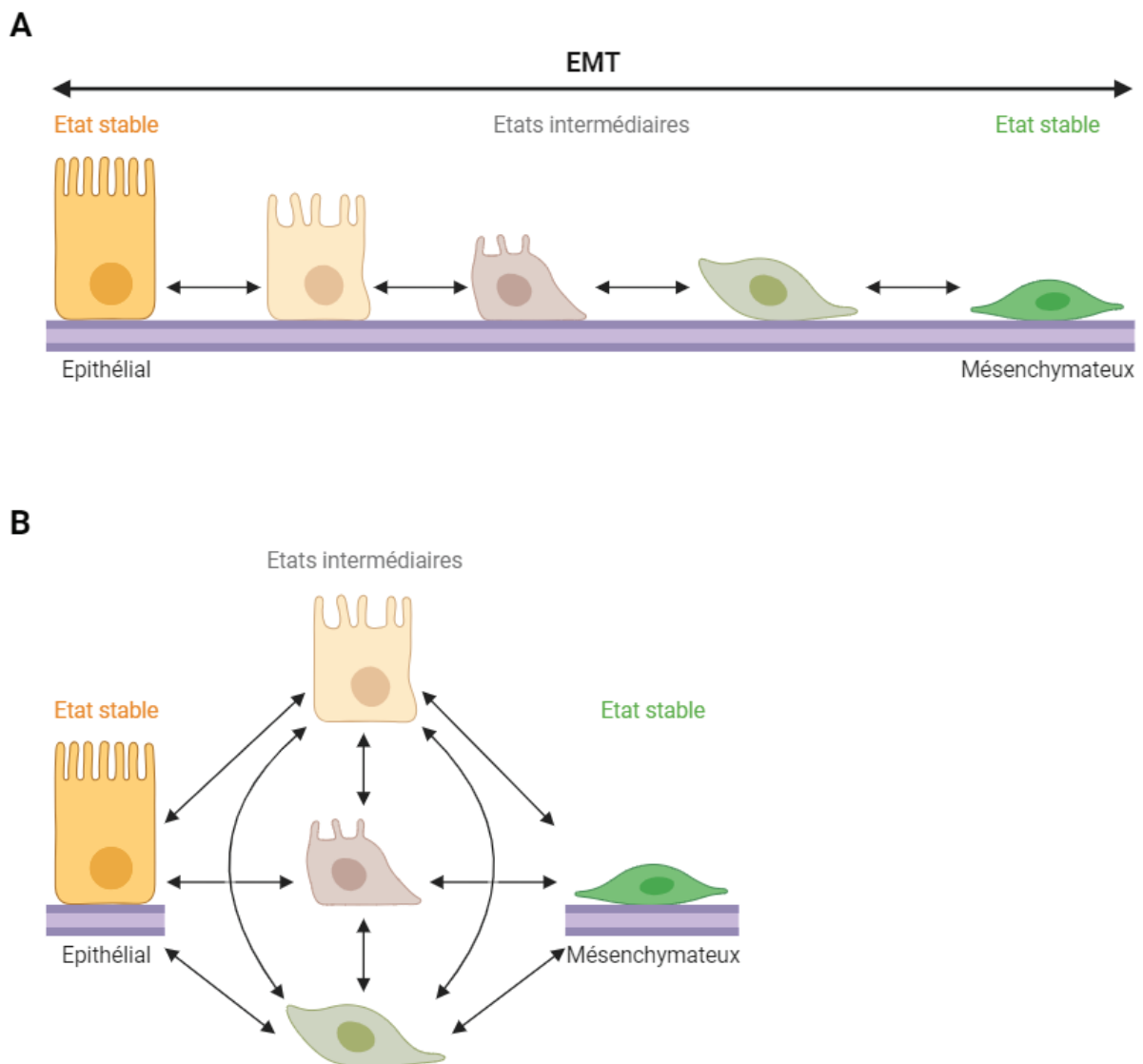


Figure 9 : Schémas simplifiés de la transition épithélio-mésenchymateuse au niveau cellulaire. **(A)** Représentation historique du processus linéaire de l'EMT dans lequel les différentes étapes se succèdent les unes aux autres de façon réversible. **(B)** Proposition de représentation de l'EMT selon les critères définis par la TEMTIA en 2020. Dans cette représentation, les différents états de l'EMT ne sont pas indispensables et sont interchangeable. EMP : plasticité épithélio-mésenchymateuse ; EMT : transition épithélio-mésenchymateuse.

Pour faire face aux difficultés de nomenclature liées à la pluralité d'acteurs et de contextes cellulaires de l'EMT, un consensus a été mis en place autour d'une définition appropriée de l'EMT. En 2020, l'association internationale de l'EMT (TEMTIA) a donc défini l'EMT comme un processus multi-facette, souvent réversible, permettant aux cellules épithéliales de se transdifférencier en cellules mésenchymateuses par le biais de la perte, individuelle ou collective, des propriétés d'adhésion cellule-cellule et l'acquisition de capacités migratoires et invasives (Figure 9B) (J. Yang *et al.*, 2020). De plus, les états partiels de l'EMT sont établis sous la nomenclature « *epithelial-to-mesenchymal plasticity* » (EMP) afin de traduire l'aspect réversible et multi-facette de ce processus (J. Yang *et al.*, 2020). Dans cette définition de l'EMT, les aspects moléculaires de l'EMT ont été volontairement écartés car ne permettant pas de définir l'établissement d'une EMT au regard de la pluralité d'acteurs recensés.

II. Aspect moléculaire de la transition épithélio-mésenchymateuse

Dans cette partie, je m'attacherai à décrire les principaux mécanismes d'induction et de régulation de l'EMT. En effet, compte-tenu de la diversité des mécanismes pouvant être impliqués en fonction des différents contextes cellulaires, le descriptif ci-dessous ne sera pas exhaustif, mais permettra de présenter les acteurs moléculaires principaux impliqués dans la mise en place et le maintien de l'EMT.

1. Voies de signalisation d'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse

Les voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien de l'EMT sont diverses. En effet, l'EMT est un processus physiologique essentiel survenant dans des contextes différents (cf. Chapitre 3 – partie III) et qui nécessite ainsi l'activation de voies de signalisation majeures et redondantes afin de compenser d'éventuelles anomalies. Ainsi, on compte au moins 7 voies de signalisation pouvant être induites différenciellement en fonction du contexte cellulaire (Lamouille *et al.*, 2014). Ces principales voies de signalisation sont résumées dans la Figure 10. Toutes ces voies de signalisation ont pour finalité la régulation de l'expression génique qui induisent les changements moléculaires à l'origine des changements cellulaires décrits précédemment.

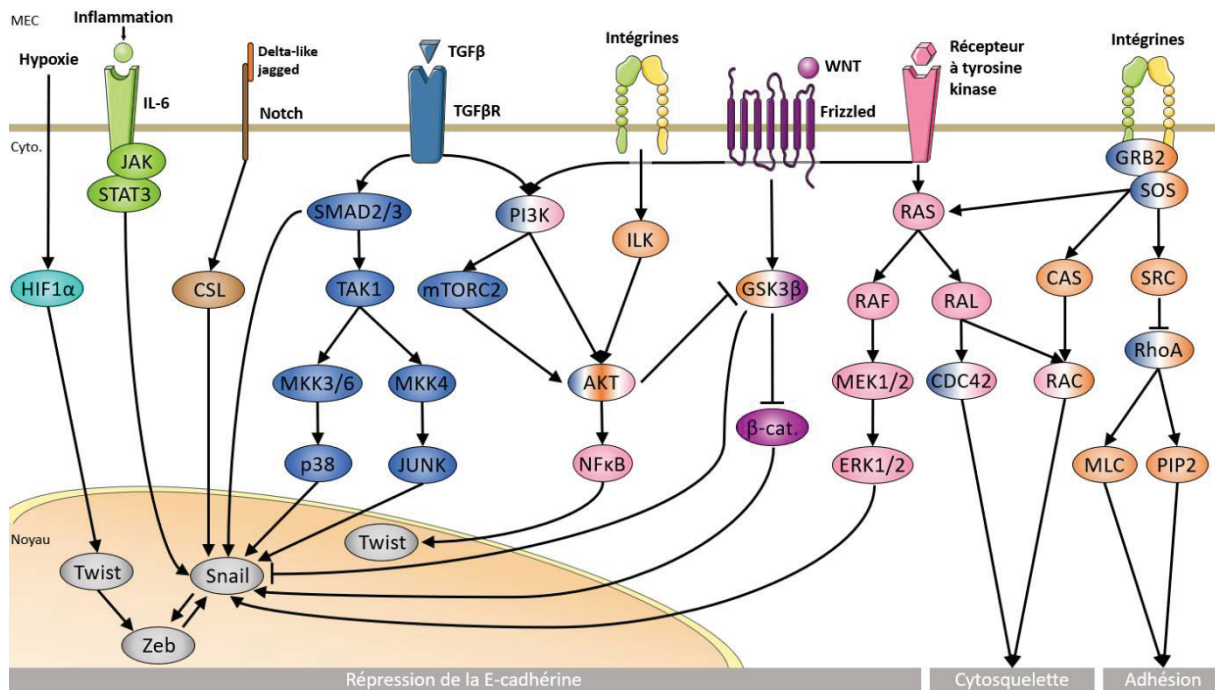


Figure 10 : Schéma simplifié des principales voies de signalisation impliquées dans l'EMT. Les facteurs de transcription de l'EMT sont identifiés par famille. β -cat. : β -caténine ; Cyto. : cytoplasme ; MEC : matrice extracellulaire. Basé sur (Lamouille *et al.*, 2014) et GeneTex (v.25-Oct-2020).

Différents stimuli induisent les voies de signalisation de l'EMT pour répondre à des changements environnementaux. Par exemple, la dégradation de la matrice extracellulaire, par blessure mécanique ou par les MMPs, induit la signalisation des intégrines qui promeut la réorganisation du cytosquelette et des jonctions d'adhésion (Lamouille *et al.*, 2014). Cette voie de signalisation dépendante des intégrines communique avec la voie de signalisation dépendante des récepteurs à tyrosine kinases (*e.g.*, EGF, HGH, FGF, etc.) et la voie de signalisation dépendante du TGF β (Lamouille *et al.*, 2014). Ces voies de signalisation (récepteurs à tyrosine kinases et TGF β) peuvent également être induites directement par des cytokines extracellulaires. En particulier, la dégradation de la matrice extracellulaire permet le relargage des protéines et facteurs de croissance piégés dans les fibres de la matrice extracellulaire activant ces voies de signalisation (Bonnans *et al.*, 2014; Hynes, 2009).

Parmi les facteurs libérés lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, le TGF β est la cytokine ayant la capacité d'induction de l'EMT la plus forte : on parle de TGF β latent (Mamuya & Duncan, 2012). La famille protéique du TGF β comprend de nombreux ligands dont, en particulier, trois formes de TGF β et la famille des BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*). Alors que l'expression de TGF β 2, TGF β 3 et Nodal semble réservée à l'embryogenèse (EMT

type I ; cf. Chapitre 3 – partie III-1), l'expression de TGF β 1 semble plus ubiquitaire (Acloque *et al.*, 2009; Lamouille *et al.*, 2014; Mercado-Pimentel & Runyan, 2007; Nawshad *et al.*, 2004). En effet, l'expression de TGF β 1 favorise les processus d'EMT types II et III (cf. Chapitre 3 – partie III-2 et 3), comme par exemple les fibroses hépatiques, pulmonaires et rénales, ou encore l'invasion des cellules cancéreuses (Gressner *et al.*, 2002; Katsuno *et al.*, 2013; Schnaper *et al.*, 2003; Willis & Borok, 2007). L'activation des récepteurs au TGF β (TGF β R) peut induire deux voies de signalisation en fonction du ligand : l'une dépendante et l'autre indépendante des protéines SMAD (Figure 10). La voie SMAD permet, outre l'activation de la transcription des EMT-TFs SNAIL et ZEB1 (Lamouille *et al.*, 2014), l'activation des protéines CDC42 et RhoA rendant possible le remaniement du cytosquelette et des jonctions cellulaires (Lamouille *et al.*, 2014; Ridley, 2011).

En plus de l'activation de la voie dépendante du TGF β , les cellules épithéliales sont également réceptives aux facteurs de croissance, activateurs de la voie des récepteurs à tyrosine kinases (RTK). La voie des RTK présente non seulement de multiples connexions avec les voies induites par le TGF β (*e.g.*, PI3K-AKT et JNK) mais permet aussi l'activation de la voie des MAP kinases (MAPK), (Lamouille *et al.*, 2014), qui induit la transcription des EMT-TFs SNAIL et SLUG (Grotegut *et al.*, 2006; Makrodouli *et al.*, 2011; Strizzi *et al.*, 2004) et la sécrétion des MMPs (Ahmed *et al.*, 2006; Vallés *et al.*, 2009). En raison de leur diversité, les RTK permettent une activation différentielle des voies de signalisation en fonction du contexte cellulaire. On notera ainsi que l'activation des voies FGF et HGF, contrairement aux voies EGF ou IGF, apparait principalement dans un contexte embryonnaire (Ciruna & Rossant, 2001; Romano & Runyan, 2000).

Enfin, d'autres voies de signalisation permettent l'activation et la régulation de l'EMT. Certaines de ces voies dépendent, comme celles présentées ci-dessus, de la réception de signaux externes *via* des ligands comme les voies WNT, IL-6 et Notch. La voie WNT est connectée aux voies TGF β et RTK et induit la translocation nucléaire de la β -caténine, permettant l'activation de la transcription des EMT-TFs de la famille Snail (Figure 10) (Niehrs, 2012; B. P. Zhou *et al.*, 2004). En revanche, les voies liées aux récepteurs IL-6 et Notch sont relativement indépendantes et activent toutes deux la transcription des EMT-TFs de la famille Snail (Lamouille *et al.*, 2014). Pour finir, certaines voies de signalisation sont dépendantes de facteurs mécaniques (voie des intégrines) ou de facteurs chimiques (voie HIF) (Figure 10). La pluralité de ces mécanismes d'activation permet ainsi une adaptabilité rapide des cellules à leur

environnement biologique, chimique et mécanique (Leggett *et al.*, 2021) par le biais de l'induction d'une EMT adaptée au contexte cellulaire.

2. Rôle majeur de la régulation de l'expression génique au cours de l'EMT

a. Transcription et épigénétique

De par son aspect dynamique et réversible, les modifications morphologiques de l'EMT sont largement médiées par des modifications transcriptionnelles (*i.e.*, touchant l'ARNm) et épigénétiques (*i.e.*, touchant l'accessibilité d'un gène). En réponse aux changements environnementaux, l'expression génique des cellules épithéliales est rapidement modulée pour diminuer l'expression des marqueurs épithéliaux (*e.g.*, CDH1, claudines, etc.) et induire l'expression des marqueurs mésenchymateux (*e.g.*, CDH2, VIM, etc.) au niveau transcriptionnel (Figure 11). Par ailleurs, afin de permettre le maintien de l'acquisition de ces modulations de l'expression génique, diverses modifications épigénétiques surviennent comme une réduction des marqueurs de l'hétérochromatine (*e.g.*, di-méthylation des histones H3K9) ou une augmentation des marqueurs de l'euchromatine (*e.g.*, tri-méthylation des histones H3K4) (McDonald *et al.*, 2011). Ces modifications transcriptionnelles et épigénétiques sont médiées par les facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TFs) dont l'expression et l'activité est régulée par différentes voies de signalisation (cf. Chapitre 3 – partie II-1).

Les facteurs de transcription de l'EMT sont regroupés en 3 grandes familles principales : Zeb, Snail et Twist. Leur expression est activée précocement au cours de l'EMT et différenciellement en fonction de la voie de signalisation initiatrice (cf. Chapitre 3 – partie II-1) (Lamouille *et al.*, 2014). Ces EMT-TFs contiennent des domaines de liaison aux séquences E-box de l'ADN : *zinc-finger* pour les familles Zeb et Snail, et *basic helix-loop-helix* (bHLH) pour la famille Twist (Chang *et al.*, 2015; Nieto, 2002; Héctor Peinado *et al.*, 2007). L'interaction des EMT-TFs avec les séquences E-box de l'ADN permettent le recrutement de co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription et/ou des modifications épigénétiques nécessaires à l'établissement de l'EMT. Comme ces EMT-TFs appartiennent à la même grande famille moléculaire des protéines ciblant les E-box, leurs cibles sont relativement similaires, bien que certaines spécificités existent (Figure 11). On notera par exemple que les EMT-TFs

ZEB1 et SNAIL sont de forts répresseurs épithéliaux, activant modérément l'expression des marqueurs mésenchymateux, tandis que l'EMT-TF TWIST1 est un fort activateur mésenchymateux, réprimant plus modérément l'expression des marqueurs épithéliaux (Nieto *et al.*, 2016). Ainsi, la co-régulation des différents EMT-TFs est indispensable à la progression de l'EMT, chacun ayant des spécificités particulières.

L'EMT-TF ZEB1 interagit avec la protéine R-Smad, elle-même activée par phosphorylation par la voie de signalisation TGF β (cf. Chapitre 3 – partie II-2). Ce complexe ZEB1/R-Smad recrute le complexe co-activateur p300, régulant l'activité d'autres facteurs de transcriptions tels que p53, Rb, etc. par acétylation, mais aussi l'acétylation d'histones (H. M. Chan *et al.*, 2001; Gu & Roeder, 1997; Postigo *et al.*, 2003). L'interaction du complexe ZEB1/R-Smad avec p300 est dépendante de l'activation de ZEB1. Cette activation est médiée par l'acétylation de ZEB1 par la protéine PCAF et permet le relargage du co-répresseur CtBP. Cette activation n'est cependant pas observée pour l'EMT-TF ZEB2 dont l'interaction avec PCAF n'a pas été montrée (Postigo, 2003; Postigo *et al.*, 2003). Ainsi, l'absence d'acétylation de ZEB1 permet le maintien de son activité répressive par le biais de son interaction avec le co-répresseur CtBP et/ou BRG1. Par exemple, au cours de l'EMT, l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine (CDH1) est médiée par l'interaction de ZEB1/CtBP avec le promoteur du gène *CDH1*, permettant ainsi la désacétylation des histones et donc l'inhibition de l'expression génique (Sánchez-Tilló *et al.*, 2010; Y. Shi *et al.*, 2003). De plus, ZEB1 a également été décrit comme recruteur de la déméthylase LSD1 (*Lys-Specific Demethylase 1*) et des désacétylases d'histones HDAC1 et 2 (Aghdassi *et al.*, 2012; J. Wang *et al.*, 2007).

L'expression de *CDH1* est également fortement modulée par l'EMT-TF SNAIL, aux niveaux transcriptionnel et épigénétique. De la même façon que ZEB1, l'EMT-TF SNAIL se fixe aux séquences E-box du promoteur *CDH1* et permet le recrutement de plusieurs co-répresseurs de la transcription (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000), mais également des désacétylases HDAC1/2 et 3, de la déméthylase LSD1 et du complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) composé entre autres de la méthyltransférase EZH2 (Herranz *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010; Hector Peinado *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2011). Le recrutement de ces régulateurs épigénétiques permet la modulation coordonnée des méthylations et acétylations des histones H3K4, H3K9 et H3K27. La modulation de ces marques épigénétiques par SNAIL permet également l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que les collagènes, les MMPs ou les autres EMT-TFs (familles Zeb et Twist ; Figure 11) (Lamouille *et al.*, 2014).

L'EMT-TF TWIST1 permet le recrutement de complexes activateurs (e.g., p300/CBP, etc.) et inhibiteurs (e.g., dimérisation avec des répresseur) de la transcription (Connerney *et al.*, 2008; Massari & Murre, 2000; Y. Song *et al.*, 2006). TWIST1 régule également les marques épigénétiques du gène *CDH1* par le recrutement de la méthyltransférase SETD8. SETD8 induit la mono-méthylation de l'histone H4K20, ayant pour conséquence l'inhibition du gène *CDH1*, mais également l'accessibilité des promoteurs du gène *CDH2* (N-cadhérine, marqueur mésoenchymateux) (F. Yang *et al.*, 2012). Dans des lignées cellulaires de cancer tête et cou, l'activité de TWIST1 est également dépendante du recrutement du complexe PRC2 (M. H. Yang *et al.*, 2010), tout comme l'EMT-TF SNAIL.

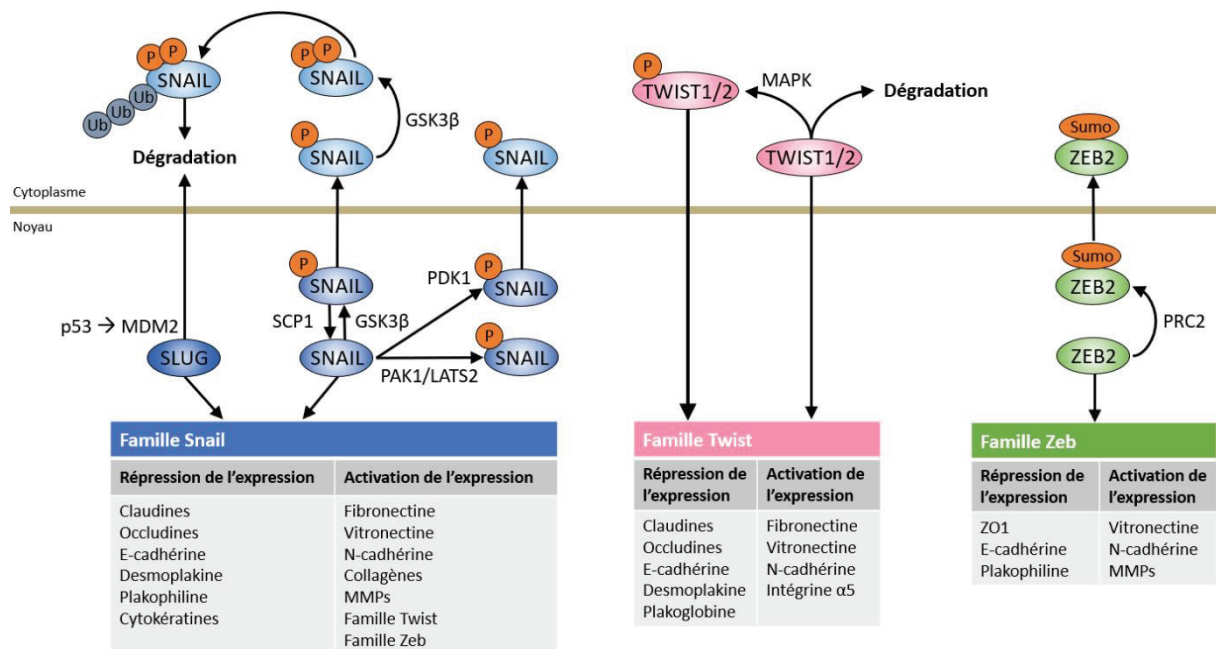


Figure 11 : Schéma représentatif des principaux EMT-TFs, leurs cibles et leur régulation. Les EMT-TFs sont principalement régulés par exportation dans le cytoplasme. Cette exportation est induite par l'ajout de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation (SNAIL) ou la sumoylation (ZEB2). A l'inverse, la phosphorylation de TWIST1/2 induit sa translocation nucléaire et est donc un activateur de l'activité de TWIST1/2. P : phosphorylation ; Sumo : sumoylation. Adapté de (Lamouille *et al.*, 2014).

Du fait de leur rôle central dans l'initiation et la régulation de l'EMT, l'expression et l'activité des EMT-TFs sont finement régulées. Leur expression est induite rapidement par de nombreuses voies de signalisation. Par ailleurs, on peut aussi noter une régulation par des modifications post-traductionnelles des ETM-TFs, comme l'ajout de phosphorylations et de

sumoylations sur SNAIL/TWIST et ZEB2 respectivement. Ces modifications post-traductionnelles permettent leur inactivation par translocation cytoplasmique, mais peuvent également augmenter la stabilité de l'EMT-TF en fonction de leur nature et localisation protéique (Lamouille *et al.*, 2014). De plus, la régulation des EMT-TFs, mais aussi de marqueurs clés de l'EMT, repose également sur des boucles de rétro-contrôle impliquant les microARNs.

b. Régulation post-transcriptionnelle des ARNm

Au cours de l'EMT, la régulation post-transcriptionnelle joue un rôle essentiel car elle permet d'adapter rapidement le transcriptome aux besoins cellulaires. Ainsi, l'EMT a été associée à des mécanismes d'épissage alternatif mais aussi à des boucles de rétro-contrôle par les microARNs (miARNs).

L'épissage alternatif est un mécanisme moléculaire permettant la genèse de plusieurs ARNm à partir d'un même gène. Ce processus fait intervenir différentes protéines capables de lier l'ARN (*RNA-binding protein*, RBP). Ces RBPs se fixent à l'ARN sur des séquences particulières et permettent l'activation ou l'inhibition de la reconnaissance du site d'épissage par le spliceosome (Will & Lührmann, 2011). Ainsi, les protéines du spliceosome appartenant à la famille des hnRNPs sont généralement associées à une inhibition du site d'épissage, tandis que les protéines de la famille des SR (*serine-arginine-rich*) sont généralement associées à une activation du site d'épissage (Ghigna *et al.*, 2008). Ces événements d'épissage alternatif sont fréquents dans les cellules eucaryotes et sont régulièrement associés à la promotion de l'EMT dans différents contextes biologiques (Blech-Hermoni & Ladd, 2013). Parmi les diverses cibles d'épissage alternatif impliquées dans l'EMT, on retrouve par exemple la fibronectine (Schwarzbauer *et al.*, 1983), le récepteur à l'estrogène β (Treeck *et al.*, 2007, 2008) ou le facteur de croissance VEGFA (Hervé *et al.*, 2005) (pour revue voir (Kelemen *et al.*, 2013)). Par exemple, l'épissage alternatif du domaine EDA de la fibronectine, décrit pour son rôle pro-EMT, est régulé négativement par la protéine SRSF1 et positivement par la protéine hnRNPA1 (E. S. White *et al.*, 2008). De la même façon, la protéine RBFOX2 est un modulateur de l'épissage alternatif des ARNm pro-EMT *CTTN*, *PARD3* et *DNM2*. L'inhibition de RBFOX2 induit une diminution de la capacité d'invasion des cellules mésenchymateuses (Braeutigam *et al.*, 2013).

Un autre mécanisme de régulation post-transcriptionnelle des ARNm implique les miARNs. Ces ARNs non-codants de 20 à 24 nucléotides présentent plus de 2 500 membres chez l'Homme, régulant plus de 60% des gènes (Shu *et al.*, 2017). Les miARNs sont codés de différentes façons : dans l'intron ou l'exon d'un gène codant ou régulés par leur propre promoteur, en cluster ou en gène unique. La synthèse des miARNs implique la transcription d'un précurseur (pri-miARN) par l'ARN polymérase II, suivi d'un *processing* nucléaire par la RNase de type III Droscha (pré-miARN), l'exportation vers le cytoplasme par la protéine exportin-5 et d'un *processing* cytoplasmique par la RNase de type III Dicer permettant l'obtention du miARN mature. Le mécanisme d'action majoritaire des miARNs repose sur la reconnaissance par complémentarité de séquence de la séquence *seed* du miARN avec la région 3'UTR d'un ARNm, permettant la formation d'un ARN double-brin. Cette conformation double-brin va permettre le recrutement de la protéine AGO (Pasquinelli, 2012). Plusieurs mécanismes ultérieurs sont possibles : (i) dégradation de l'ARNm cible (recrutement du complexe de digestion RISC ou du complexe de déadénylation CCR4-NOT), (ii) inhibition de la traduction (de façon dépendante ou indépendante de CCR4-NOT) ou (iii) activation de la traduction (recrutement de la protéine FMR1) (Dragomir *et al.*, 2022; Pasquinelli, 2012). Cependant, la régulation de l'apparition de ces trois mécanismes n'est pas totalement élucidée.

Au cours de l'EMT il existe une boucle de régulation dépendante des miARNs permettant la régulation fine des EMT-TFs. La boucle de rétro-contrôle la plus étudiée est la boucle miR-200/ZEB1. En effet, la famille miR-200 des miARNs déstabilise l'ARNm codant pour *ZEB1* qui réprime, en retour, les promoteurs des deux clusters de la famille miR-200. La famille miR-200 est composée de 5 membres (miR-200a/b/c, miR-141 et miR-429) distribués en 2 clusters au regard de leur séquence *seed*. Le cluster I (miR-200a/b et miR-429) possède 3 sites de fixation sur l'ARNm *ZEB1* et 3 sites sur l'ARNm *ZEB2*, tandis que le cluster II (miR-200c et miR-141) possède 5 sites de fixation sur l'ARNm *ZEB1* et 6 sites de fixation sur l'ARNm *ZEB2* (S. Brabletz & Brabletz, 2010). De ce fait, la famille miR-200 est un des acteurs centraux de la régulation de l'EMT. Inversement, les promoteurs des clusters I et II de la famille miR-200 présentent respectivement 2 et 3 sites de fixation des EMT-TFs *ZEB1/2* dans leurs promoteurs (S. Brabletz & Brabletz, 2010; Bracken *et al.*, 2008). Bien que cette boucle de régulation *ZEB/miR-200* soit l'axe de régulation dépendant des miARNs le plus documenté dans l'EMT, de nombreux autres miARNs sont impliqués dans la régulation de l'EMT, aussi bien au niveau

des EMT-TFs que des marqueurs épithéliaux (Lamouille *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2016; Zhang & Ma, 2012).

III. Aspects physiologiques et pathologiques de la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse est séparée en trois grands types, chacun survenant dans des conditions physio-pathologiques particulières. Dans cette partie, je m'attacherai à détailler brièvement le rôle de chacun de ces trois types. Une présentation plus complète est disponible dans la revue de la littérature fournie à la fin de ce chapitre (cf. Chapitre 3 – partie IV). De plus, il est à noter qu'au cours de mon doctorat, mon modèle d'étude correspondait à l'EMT type II.

1. EMT type I

L'EMT type I constitue un processus biologique impliqué dans la genèse d'un nouvel organisme possédant une organisation tri-dimensionnelle complexe. En effet, l'EMT type I intervient dès les premières heures de la vie d'un organisme.

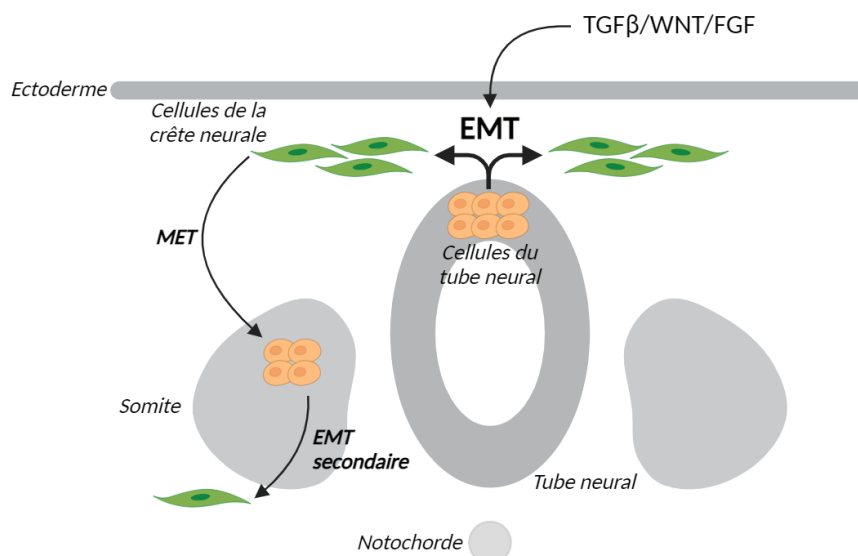


Figure 12 : Schéma de l'EMT type I. L'EMT type I permet l'organisation tri-dimensionnelle des cellules afin de créer un nouvel organisme. Cette organisation est médiée par différentes voies de signalisation (e.g., TGFβ, WNT, FGF, etc.) et permet une succession de cycles EMT/MET. EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MET : transition méso-épithéliale. Adapté de (Morin *et al.*, 2022).

Au cours du développement, l'EMT joue un rôle crucial lors de (i) la gastrulation et de la formation de la crête neurale (EMT type I primaire ; 14^{ème} jour post-fécondation chez l'Homme), (ii) la formation de cellules multipotentes (EMT type I secondaire ; 18-20^{ème} jour post-fécondation chez l'Homme) et (iii) l'organisation tri-dimensionnelle du cœur (EMT type I tertiaire ; à partir du 30^{ème} jour post-fécondation chez l'Homme). Ces trois étapes d'EMT sont entrecoupées de phases de MET et aboutissent à la formation d'un nouvel être vivant fonctionnel (Figure 12). De par sa complexité, l'EMT type I fait intervenir des mécanismes moléculaires particuliers, non cités précédemment, que je détaillerai au fur et à mesure de mes propos.

a. Les trois phases de l'EMT type I

Chez les vertébrés, la gastrulation correspond aux étapes permettant la formation des trois feuilletts tissulaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) et leur organisation tri-dimensionnelle (invagination). Au cours de la gastrulation, les cellules du nœud primitif (aussi appelé centre de Spemann chez le xénope) sont capables d'initier l'invagination, permettant alors la colonisation de la totalité de l'embryon par les cellules embryonnaires. Les cellules du nœud primitif sont définies moléculairement par l'accumulation de β -caténine nucléaire, permettant l'induction de la voie de signalisation WNT (Figure 12). Dans ce contexte, la voie de signalisation WNT permet l'activation des voies TGF β et FGF par l'intermédiaire des facteurs de transcription Goosecoid et Nodal, considérés comme des EMT-TFs (Ciruna & Rossant, 2001). Les étapes de l'EMT type I primaire permettant les mouvements tri-dimensionnels cellulaires (gastrulation et de formation de la crête neurale) sont donc induites par la voie TGF β , par le biais de l'activation des EMT-TFs SNAIL et SLUG (Carver *et al.*, 2001; Nieto *et al.*, 1994). En revanche, les étapes de spécification des différents feuilletts embryonnaires sont dépendantes de la voie FGF (Carver *et al.*, 2001; Ciruna & Rossant, 2001). La voie FGF a également été décrite comme permettant le maintien de l'expression des facteurs Snail au cours de la gastrulation et comme acteur de la formation de la crête neurale. En effet, en association avec les voies WNT, NOTCH et de l'acide rétinoïque, la voie FGF permet la formation d'un gradient de BMP4 (*Bone Morphogenesis Protein 4*) nécessaire à l'induction du facteur c-Myb dans les cellules épithéliales de la crête neurale, induisant l'expression des facteurs de transcription Snail2 et Msx1, essentiels à la finalisation de l'EMT type I primaire (Karafiat *et al.*, 2005, 2007). Ainsi, il existe des voies de signalisation analogues entre la

gastrulation et la formation de la crête neurale. En revanche, même si certaines protéines sont indispensables pour la gastrulation, il n'en est rien pour la formation de la crête neurale dont les voies de signalisation et EMT-TFs sont plus redondants. Par exemple, même si Snail est indispensable pour la gastrulation (léthalité du phénotype murin *Snail*^{-/-} au stade E7.5 dû à un défaut de formation des membranes extra-embryonnaires), sa mutation expérimentale conditionnelle (uniquement dans les tissus intra-embryonnaires) est partiellement compensée lors de la formation de la crête neurale chez la souris (Murray & Gridley, 2006). A la suite de l'EMT primaire, une phase de MET permet la formation de la notochorde, des somites et des précurseurs du système urogénital. La MET somitique est notamment caractérisée par l'inhibition de *Snail* (Dale *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2007).

Par la suite, seules les cellules des somites et précurseurs du système urogénital seront concernées par l'EMT secondaire. Cette EMT type I secondaire permet la répartition de cellules multipotentes dans l'embryon afin de former les différents organes (Figure 12). Par exemple, chez les mâles, le canal de Müller régresse après une EMT induite par la *Müllerian-inhibiting substance* (MIS) (Zhan *et al.*, 2006) et la formation des testicules résulte de la migration de cellules endothéliales mésonephriques subissant une transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) (Combes *et al.*, 2009).

Le seul organe nécessitant un cycle supplémentaire d'EMT/MET, et donc une EMT type I tertiaire, est le cœur. En effet, la formation des deux pôles cardiaques à partir des cellules cardiaques, spécialisées dès la gastrulation, est réalisée lors de l'EMT type I secondaire. Les cellules mésenchymateuses résultant de l'EMT secondaire donnent naissance à des cellules endothéliales par MET : on parle donc d'EndMT tertiaire. Les cellules endothéliales du canal atrio-ventriculaire subissent l'EndMT tertiaire et envahissent le tissu cardiaque pour former le coussin endocardique dont les cellules formeront par la suite le complexe atrio-ventriculaire (Nakajima *et al.*, 2000). D'un point de vue moléculaire, la EndMT tertiaire fait principalement intervenir la voie du TGF β (Mercado-Pimentel & Runyan, 2007). La translocation nucléaire du domaine cytoplasmique de TGF β 2 induit l'expression du facteur de transcription Su(H)/RBPjk/CBf1, un activateur de la transcription de l'EMT-TF SNAIL (Timmerman *et al.*, 2004).

b. EMT type I et pathologies développementales

Comparé à la pluralité d'acteurs présentés ci-dessus, le lien fonctionnel entre EMT type I et pathologies reste faible. En effet, la génération de modèles homozygotes *knock-out* pour différents facteurs, dont les EMT-TFs (e.g., familles *Snail*, *Zeb*, *TWIST1*), s'est révélée infructueuse car ces délétions sont souvent léthales (Birkhoff et al., 2021; Carver *et al.*, 2001; Z. F. Chen & Behringer, 1995; Y. Liu *et al.*, 2008). Par exemple, chez la souris, le *knock-out* du gène *Grhl2*, régulateur de l'EMT et activateur de l'expression des miARNs de la famille miR-200, induit une surexpression de l'EMT-TF *Zeb1* et un défaut léthal de fermeture de la crête neurale. Dans ce modèle murin, l'inhibition de *Zeb1* permet le rétablissement de l'EMT type I et l'obtention d'un embryon viable, démontrant le rôle clé de l'EMT dans cette étape de l'embryogenèse (Carpinelli *et al.*, 2020).

En revanche, de nombreuses mutations dans les voies de signalisation de l'EMT et les EMT-TFs ont été décrites dans des pathologies associées à une altération du processus de l'EMT type I. Chez l'Homme, les patients atteints de défauts de l'EMT type I présentent (i) des malformations crânio-faciales modérées à sévères, associées principalement à des défauts de formation des extrémités et de la colonne vertébrale (neurocristopathies) et (ii) des anomalies génétiques touchant les gènes codant pour les EMT-TFs ou les récepteurs FGFR. La description des syndromes de craniosynostose les plus communs est présentée dans le Tableau 2 (Sawh-Martinez & Steinbacher, 2019).

Les disparités cliniques observables entre, mais aussi au sein de, ces syndromes impliquant des gènes de la même famille, ne sont pas clairement comprises. En revanche, l'aspect particulièrement plastique de l'EMT type I semble être une source majeure d'hétérogénéité puisqu'on constate une compensation partielle de l'absence/inactivité de certains facteurs chez les individus. En effet, les altérations du gène *TWIST1* sont partiellement compensées, puisque l'individu est viable, contrairement aux mutations de *Snail* comme démontré chez la souris (Carver *et al.*, 2001; Nieto *et al.*, 1994). On peut également soulever l'importance primordiale de la voie FGF dans l'EMT type I, contrairement aux autres types d'EMT dont les mécanismes ont été décrits précédemment (cf. Chapitre 3 – partie II). En effet, des expériences chez des souris *knock-out* pour la protéine MT1-MMP (cf. Chapitre 3 – partie I-1b) ont montré que le phénotype de craniosynostose observé est induit par un déficit d'activation du récepteur FGFR2 (K. M. Chan *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012).

Tableau 2 : Description moléculaire des craniosynostoses les plus communes chez l'Homme.

Syndrome	Gène(s)	Mutation(s)	Impact(s) moléculaire(s)	Référence(s)
Apert	<i>FGFR2</i>	Substitution Ser252Trp ou Pro253Arg (98%)	Mutation des domaines immunoglobuline-like II et III ; Augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand	(Ibrahimi <i>et al.</i> , 2001)
Couzon	<i>FGFR2</i>	Substitution Ala344Pro (95%)	Mutation des exons des domaines immunoglobuline-like II et III ; Défaut de glycosylation et de flux intra-cellulaire de FGFR2	(Al-Namnam <i>et al.</i> , 2019)
Pfeiffer	<i>FGFR2</i> ; <i>FGFR1</i>	25 mutations <i>FGFR2</i> recensées (60-70%) ; Mutation additionnelle de <i>FGFR1</i> (5%)	N/A	(Fearon & Rhodes, 2009)
Muenke	<i>FGFR3</i>	Substitution Pro250Arg	N/A	(Kruszka <i>et al.</i> , 2006)
Saethre-Chotzen	<i>TWIST1</i>	Translocation de la région 7p21 (37%) ; Mutations non-sens et faux-sens	Arrêt traductionnel prématuré empêchant la traduction des domaines de liaison à l'ADN et du domaine HLH ; Inactivité des domaines fonctionnels	(Gripp <i>et al.</i> , 2000; D. Johnson <i>et al.</i> , 1998)
Mowat-Wilson	<i>ZEB2</i>	N/A	Défaut de signalisation de la voie BMP	(Vega-Lopez <i>et al.</i> , 2018)
Waardenburg	<i>SNAI2</i>	N/A	N/A	(Mirhadi <i>et al.</i> , 2020; Vega-Lopez <i>et al.</i> , 2018)

2. EMT type II

L'EMT type II intervient dès la naissance et pour toute la durée de vie de l'individu puisqu'elle permet le maintien de l'homéostasie tissulaire. On la retrouve lors de la cicatrisation au sens large, survenant à la suite d'agressions, comme les blessures affectant les différents organes (*e.g.*, peau, foie, poumon, etc.) ou de changements hormonaux régulant la vie cyclique des organes génitaux, comme le renouvellement de l'épithélium ovarien chez la femme (Figure 13) (D. Kim *et al.*, 2017; Nieto *et al.*, 2016). On retrouve également l'EMT type II, de façon plus prononcée, au cours de la puberté. En effet, la formation d'une glande mammaire fonctionnelle chez la femme résulte de la migration collective de cellules au phénotype mésenchymateux partiel (Kurley *et al.*, 2012; Shamir & Ewald, 2015). L'origine des cellules

mésenchymateuses impliquées dans l'EMT type II n'est pas encore claire. Deux théories subsistent : (i) les cellules épithéliales ou endothéliales blessées subissent une EMT, ou (ii) les fibroblastes ou cellules épithéliales non blessées dans l'environnement subissent une EMT (J. Yang *et al.*, 2020). Cette ambivalence est notamment liée au phénotype mésenchymateux partiel souvent présenté par les cellules de l'EMT type II (Grande *et al.*, 2015; Lovisa *et al.*, 2015). En revanche, on notera un consensus concernant l'activation de l'EMT type II par les voies de signalisation pro-inflammatoires détaillées précédemment que sont les voies TGF β et PDGF (cf. Chapitre 2 – partie II) (Wynn, 2008).

En contexte physiologique, la fin du processus d'EMT type II se traduit par la dégradation de la matrice extracellulaire créée par les myofibroblastes et son remplacement par une matrice définitive, et l'entrée en apoptose des myofibroblastes activés (Desmoulière *et al.*, 2003). Une inflammation chronique et/ou persistante peut engendrer l'activation incontrôlée ou le non-arrêt de l'EMT : on parle alors de fibrose (Figure 13). La fibrose est souvent associée aux maladies chroniques du foie et des reins (Guarino *et al.*, 2009; Wynn, 2008) mais on peut également la retrouver à la suite d'opérations comme dans le cas de la fibrose mammaire (Claen *et al.*, 2010). Cliniquement, la fibrose se caractérise par l'augmentation de la dureté et de la densité du tissu. On note alors une augmentation du nombre de myofibroblastes dans la zone touchée, et un enrichissement en matrice extracellulaire pouvant aboutir à une altération du fonctionnement de l'organe touché.

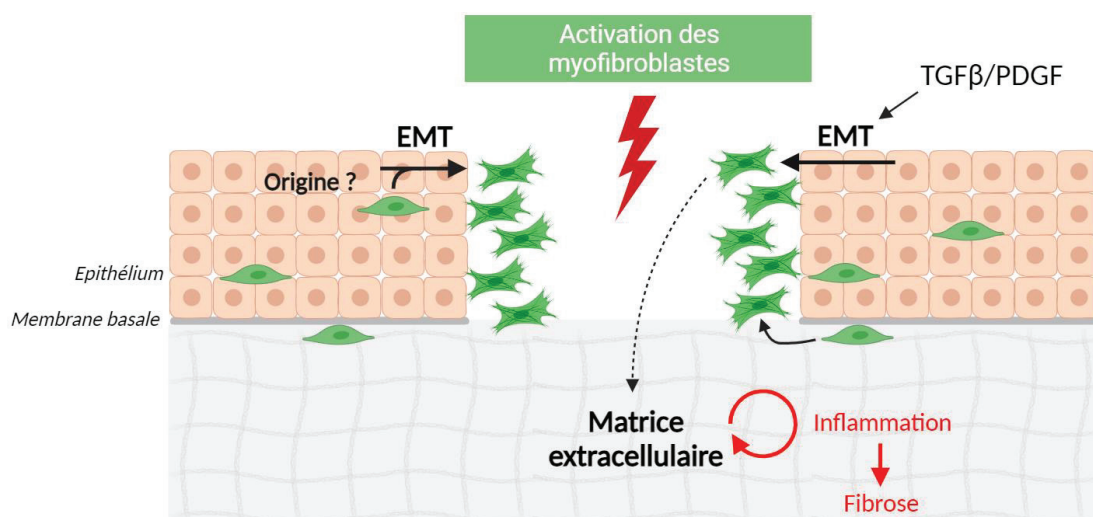


Figure 13 : Représentation schématique de l'EMT type II. L'EMT type II intervient de façon post-embryonnaire en réponse à un stress mécanique ou chimique. Elle permet de préserver l'intégrité tissulaire en permettant notamment la cicatrisation. De façon pathologique, l'activation chronique de l'EMT type II est impliquée dans le développement des fibroses. EMT : transition épithélio-mésenchymateuse. Adapté de (Morin *et al.*, 2022).

D'un point de vue moléculaire, l'EMT type II, physiologique et pathologique, est indissociable de la matrice extracellulaire. En effet, pour pouvoir se déplacer, la cellule mésenchymateuse doit pouvoir dégrader la matrice extracellulaire existante, mais aussi en produire une nouvelle afin de pouvoir reconstituer l'homéostasie cellulaire. Une forte expression de ces protéases est corrélée à une augmentation du risque de fibrose, comme par exemple MMP-2 et MMP-9 dans le rein (Mansour *et al.*, 2017; Zeisberg *et al.*, 2002).

De plus, l'altération des voies de signalisation joue un rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de la fibrose. Premièrement, les MMPs sont des activateurs directs de la voie TGF β de par leur rôle d'activateurs protéolytiques du TGF β extracellulaire contenu dans la matrice extracellulaire (Cheng & Lovett, 2003). Ainsi, l'activation du TGF β extracellulaire induit la voie TGF β cellulaire et donc l'activation des EMT-TFs (cf. Chapitre 2 - partie II). En ce sens, l'altération de l'expression des EMT-TFs a également été démontrée comme inducteur de la fibrose (Boutet *et al.*, 2006; Chua *et al.*, 2007; J. Yang *et al.*, 2004) ainsi que de la fibrose cystique, maladie autosomale récessive caractérisée par une insuffisance pulmonaire et des atteintes digestives, hépatiques et rénales, présentant une EMT médiée par l'EMT-TF TWIST1 (Quaresma *et al.*, 2020). De plus, des altérations génétiques (types SNVs) de la protéine TGF β ont également été mises en évidence comme ayant un rôle dans la broncho-pneumopathie chronique obstructive (COPD), une maladie chronique des poumons (Königshoffa *et al.*, 2009), et dans la fibrose cystique (Harris *et al.*, 2011). La COPD et la fibrose cystique partagent des similitudes transcriptomiques permettant de suggérer un lien entre l'EMT type II et ces maladies (Clarke *et al.*, 2015). En revanche, peu de données moléculaires et fonctionnelles, associées à des données cliniques, existent pour permettre la caractérisation de l'impact d'altérations génétiques sur l'EMT type II. La plupart des données existantes traitent en effet des fibroses induites par un processus inflammatoire (*e.g.*, foie, post-opératoire, etc.).

L'EMT type II présente un aspect physiologique essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire. Son fonctionnement repose sur l'activation des voies de signalisation classiques de l'EMT (*e.g.*, TGF β , PDGF, inflammation, etc. ; cf. Chapitre 2 – partie II). L'apparition d'une EMT type II pathologique repose majoritairement sur l'apparition d'une inflammation chronique, induisant l'activation chronique des voies de signalisation de l'EMT. Peu de données existent concernant l'implication d'altérations épigénétiques et/ou transcriptomiques

intrinsèques aux cellules épithéliales et/ou fibroblastes. L'aspect inflammatoire semble donc avoir un rôle primordial dans l'induction et le maintien de l'EMT type II.

3. EMT type III

Contrairement aux autres types d'EMT, l'EMT type III correspond à une EMT exclusivement pathologique. En effet, l'EMT type III intervient dans le cancer. Son implication est encore en débat quant à son rôle dans l'initiation tumorale, mais la communauté scientifique s'accorde sur son rôle notable dans la progression tumorale, de façon générale, et en particulier dans la formation métastatique et la résistance aux traitements anti-tumoraux (Dongre & Weinberg, 2019; Lambert *et al.*, 2017; Shibue & Weinberg, 2017). Les cellules mésenchymateuses impliquées dans l'EMT type III présentent un phénotype mésenchymateux partiel, exprimant alors des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux (Bierie *et al.*, 2017; Chaffer *et al.*, 2016). C'est notamment le cas des cellules tumorales circulantes capables de se déplacer jusqu'à un site tumoral secondaire où elles subiront une MET et formeront ainsi un site tumoral distant (*i.e.*, métastase) (Figure 14) (Chaffer *et al.*, 2006; Dongre & Weinberg, 2019; Gao *et al.*, 2012; Korpál *et al.*, 2011).

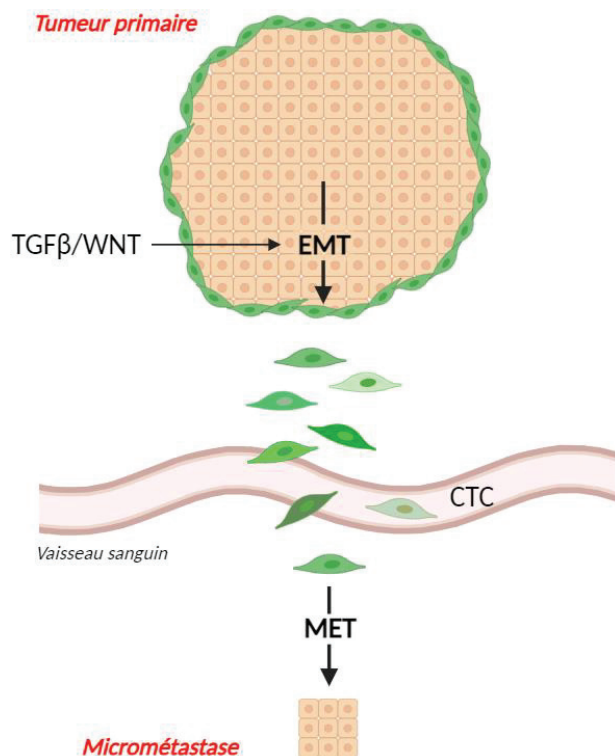


Figure 14 : Représentation schématique de l'EMT type III. L'EMT type III intervient de façon pathologique dans la progression métastatique. Les cellules de la tumeur primaire vont acquérir la capacité de se mouvoir dans l'organisme via l'EMT. Ces cellules sont retrouvées de façon circulante (CTC) chez les patients et possèdent généralement des caractéristiques mésenchymateuses partielles. CTC : cellule tumorale circulante ; EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MET : transition mésenchymato-épithéliale. Adapté de (Morin *et al.*, 2022).

D'un point de vue cellulaire, l'EMT type III est très fortement liée à l'EMT type I. En effet, l'EMT type III implique la notion de cellule souche cancéreuse et celle de colonisation de tissu distant (métastase) (Mani *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2008; Singh & Settleman, 2010). Ainsi, la réactivation des EMT-TFs est indispensable à l'acquisition de ces capacités et s'effectue *via* les voies de signalisation physiologiques (*i.e.*, TGF β , WNT, etc.) en association, ou en réponse, à l'expression de facteurs pro-oncogéniques (*e.g.*, Ras, c-Myc, etc.). Par exemple, dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC), l'EMT-TF ZEB1 est essentiel pour la formation métastatique (S. Brabletz *et al.*, 2011; Krebs *et al.*, 2017), contrairement aux EMT-TFs SNAIL et TWIST1 impliqués dans la résistance aux traitements du PDAC (X. Zheng *et al.*, 2015). En revanche, SNAIL et TWIST1 ont été démontrés comme induisant la dissémination métastatique dans les cancers du sein (Tran *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017). Ces discordances entre études démontrent une hétérogénéité intra- et intertumorale chez les patients. Cette diversité peut s'expliquer par l'existence d'une EMT type III partielle, permettant la présence de cellules à divers stades de l'EMT, ayant des propriétés différentes. Ceci donne alors un avantage sélectif à la tumeur, en vue d'une dissémination métastatique dans des micro-environnements variés. Cette hypothèse est soutenue par le phénotype des cellules cancéreuses circulantes très proche d'un phénotype mésenchymateux partiel (Figure 14) (Armstrong *et al.*, 2011; S. Wu *et al.*, 2015; M. Yu *et al.*, 2013). De plus, Wu *et al.* ont démontré que les cellules tumorales provenant de tumeurs de haut grade expriment de façon plus importante les EMT-TFs SNAIL et TWIST1, inducteurs des états partiels de l'EMT (S. Wu *et al.*, 2015).

En plus de son rôle dans la progression métastatique, l'EMT type III est également impliquée dans la résistance aux traitements tels que la chimiothérapie, les thérapies ciblées ou l'immunothérapie (Dongre & Weinberg, 2019; Y. Tang *et al.*, 2020). Cependant, il n'est pas encore clairement établi si cette résistance aux traitements est directement dépendante de l'état mésenchymateux ou si elle dépend des comportements cellulaires annexes tels que l'acquisition de propriétés souches par les cellules mésenchymateuses par exemple (Shibue & Weinberg, 2017).

Contrairement à l'EMT type I, l'EMT type III n'a pas été associée à des mutations des facteurs directement impliqués dans l'EMT (*i.e.*, EMT-TFs, marqueurs épithéliaux/mésenchymateux, etc.). En revanche, de nombreuses données révèlent une

association entre le niveau d'expression des EMT-TFs et l'agressivité et/ou le stade tumoral dans de nombreux types de cancers (Dongre & Weinberg, 2019).

IV. Régulation traductionnelle : nouveau critère de caractérisation de l'EMT ?

Revue scientifique : “Heterogeneity and dynamic of EMT through the plasticity of ribosome and mRNA translation”

Cette revue de la littérature dont je suis autrice en 1ère position a été publiée en mars 2022 dans le journal Biochimica and Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer. Le manuscrit est inclus à la suite de cette introduction.

a. Contexte

Jusqu'à présent, il n'a été traité dans ce manuscrit de thèse que de régulation de l'expression génique impliquée dans l'EMT, au niveau transcriptomique et épigénétique. En effet, les mécanismes moléculaires de l'EMT ont été décortiqués au cours des dernières décennies, aboutissant à la découverte des facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TFs) et des voies de signalisation de l'EMT (*i.e.*, TGF β , WNT, NOTCH, etc.). Devant le nombre important de ces travaux, l'EMT est aujourd'hui clairement associé à la régulation transcriptionnelle.

Cependant, depuis les 5 dernières années, un nombre croissant de publications évoquent les difficultés liées à l'amélioration de la compréhension et de la classification des différents processus, notamment moléculaires, de l'EMT. En effet, l'association internationale de l'EMT (TEMTIA) a pointé du doigt en 2020 le manque crucial d'approches permettant (i) la distinction des différentes EMT ainsi que (ii) l'hétérogénéité de chacune d'elle, notamment d'un point de vue de leur dynamique (J. Yang *et al.*, 2020). De plus, l'émergence de nouvelles approches moléculaires semble indispensable pour améliorer les approches diagnostiques et thérapeutiques, et donc la prise en charge des patients souffrant de pathologies liées à l'EMT. Nous proposons de considérer la régulation traductionnelle comme un nouvel acteur majeur de l'EMT. Bien que peu de données aient été mises en perspectives jusqu'à présent concernant le

rôle de la régulation traductionnelle au cours de l'EMT, il est primordial de considérer cette étape de l'expression génique comme un potentiel outil de caractérisation et de compréhension de l'EMT.

L'étude de la régulation traductionnelle au cours de l'EMT a été un axe d'intérêt majeur de mon doctorat. Aussi, lors de mon arrivée en thèse, j'ai souhaité effectuer des recherches bibliographiques approfondies sur cette thématique. Or, j'ai pu constater qu'aucune revue de la littérature concernant la régulation traductionnelle au cours de l'EMT n'avait été réalisée, malgré le besoin croissant de nouvelles approches dans le domaine de l'EMT ou encore du rôle croissant de la traduction et de la machinerie traductionnelle dans la compréhension de processus physio-pathologiques. Cette revue met donc en lien les différentes études existantes et discute l'implication et l'apport de l'étude de la régulation traductionnelle pour la compréhension de l'EMT. Le format de cette revue a été orienté à destination de la communauté EMT afin de leur proposer de nouvelles perspectives de recherche, basées sur des données déjà existantes mais éparses.

b. Résultats principaux

Cette revue est découpée en trois parties, chacune centrée sur un type d'EMT (type I, II ou III). Cela permet tout d'abord de constater une disparité dans le nombre d'études traitant le lien entre régulation traductionnelle/ribosome et EMT : l'EMT type I présentant le moins de données moléculaires, contrairement à l'EMT type III. Cependant, malgré ces différences notables du nombre de publications, des parallèles peuvent être fait concernant les types de régulation traductionnelle possibles entre les différents types d'EMT. En particulier, les cibles majeures de la régulation traductionnelle sont les facteurs de transcription ainsi que les RNA-binding protéines (RBPs), et ce dès les premières phases d'induction de l'EMT, indépendamment du contexte biologique. De même, l'implication du ribosome et son hétérogénéité de composition, déjà bien établi dans l'EMT type I, semble être un axe innovant de compréhension des mécanismes moléculaires des EMT de types II et III. La mise en perspectives de ces différentes études permet l'élaboration de parallèles et la mise en évidence de mécanismes communs au processus général de l'EMT.

Enfin, la convergence des mécanismes de régulation traductionnelle observés dans les différents types d'EMT nous a permis d'établir des hypothèses concernant la transposition de molécules thérapeutiques d'un contexte à l'autre. En effet, les inhibiteurs de la voie mTOR,

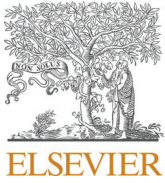
couramment utilisés pour l'inhibition de la formation métastatique, pourraient être utilisés dans le traitement des fibroses. Bien entendu, ces hypothèses restent à être évaluées expérimentalement, mais apportent un nouveau point de vue sur la compréhension et la réflexion thérapeutique autour des maladies liées au processus de l'EMT. Par ailleurs, étant donné l'émergence du rôle du ribosome dans le contrôle traductionnel, thématique au cœur de mon projet de thèse, j'ai tâché d'inclure le peu de données liant ribosome et EMT dans cette revue. Il a ainsi été mis en évidence 6 composants ribosomiques directement impliqués dans les types II et III de l'EMT (*e.g.*, EPRS, MRPL13, RPL22L1, RPS5, RPS7 et les ARNr) ainsi que 15 protéines régulées traductionnellement, dont 6 impliquent un IRES, régulateur fort de l'activité ribosomique (cf. Chapitre 1).

c. Ma contribution

La pandémie du COVID-19 ayant démarrée en France quelques mois après le début de mon stage de Master 2 dans l'équipe, et ayant continuée pendant le début de mon doctorat, j'ai donc décidé de mettre à profit mes heures de télétravail confinées pour écrire une revue de la littérature traitant de l'apport de la régulation traductionnelle dans le contexte de l'EMT.

En tant que première autrice, j'ai rassemblé la totalité de la bibliographie, participé à l'élaboration du plan, écrit la première version du manuscrit en toute autonomie, réalisé les figures de ce manuscrit et participé activement aux différentes étapes de soumission et de révision de cette revue. Ces différentes étapes, ainsi que la réflexion scientifique, ont été faites conjointement avec mes co-auteurs.

d. Manuscrit

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

BBA - Reviews on Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbcan

Review

Heterogeneity and dynamic of EMT through the plasticity of ribosome and mRNA translation

Chloé Morin^{a,b,c}, Caroline Moyret-Lalle^{a,b,c}, Hichem C. Mertani^{a,b,c}, Jean-Jacques Diaz^{a,b,c},
Virginie Marcel^{a,b,c,*}

^a Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, F-69373 Lyon Cedex 08, France

^b Institut Convergence PLASCAN, 69373 Lyon cedex 08, France

^c DevWeCan Labex Laboratory, 69373 Lyon cedex 08, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Epithelial to mesenchymal transition (EMT)
Translation
Ribosome
Components of translational machinery
Development
Fibrosis
Cancer

ABSTRACT

Growing evidence exposes translation and its translational machinery as key players in establishing and maintaining physiological and pathological biological processes. Examining translation may not only provide new biological insight but also identify novel innovative therapeutic targets in several fields of biology, including that of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). EMT is currently considered as a dynamic and reversible trans-differentiation process sustaining the transition from an epithelial to mesenchymal phenotype, known to be mainly driven by transcriptional reprogramming. However, it seems that the characterization of EMT plasticity is challenging, relying exclusively on transcriptomic and epigenetic approaches. Indeed, heterogeneity in EMT programs was reported to depend on the biological context. Here, by reviewing the involvement of translational control, translational machinery and ribosome biogenesis characterizing the different types of EMT, from embryonic and adult physiological to pathological contexts, we discuss the added value of integrating translational control and its machinery to depict the heterogeneity and dynamics of EMT programs.

1. Introduction

The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a dynamic and often reversible cellular process of transdifferentiation during which an epithelial cell acquires mesenchymal characteristics, due to profound remodeling of gene expression [1,2]. A recent consensual report listed EMT hallmarks, namely loss of adhesiveness and polarity properties, and the acquisition of a particular cytoskeletal architecture to enhance migratory properties [3]. EMT contributes to tissue and organ formation during embryogenesis (*i.e.*, type I EMT) and to their homeostasis and function in adults (*i.e.*, type II EMT). In turn, impaired, abnormal or excessive activation of EMT plays a role in human pathologies, including neuropathies, fibrosis and cancer [4,5]. Today, cancer (*i.e.*, type III EMT) remains the most studied context in which EMT can occur. Transcriptional reprogramming represents a central axis entailing a switch in the expression of epithelial markers (*e.g.*, E-cadherin/*CDH1*, cytokeratins) into mesenchymal ones (*e.g.*, N-cadherin/*CDH2*, vimentin/*VIM*) [2,3]. This reprogramming relies on EMT transcription factors (EMT-TFs); the

core EMT-TFs being Twist, Snail and Zeb family members, which are activated in response to diverse signaling pathways including TGF- β , Wnt, Notch or HIF [1,6].

Intriguingly, the phenotypic transition from one state to another seems to differ according to the EMT-TF. Indeed, the expression of some EMT-TFs, such as Zeb1, results in a “complete” transdifferentiation, whereas other EMT-TFs, including Twist1 or Snail, induce only a “partial” EMT characterized by cells displaying a combination of epithelial and mesenchymal properties [2]. The existence of these intermediate states suggests either that alternative pathways can lead to EMT, or that evolution from one state to another relies on a linear continuum of distinct EMT states, as supported by computational modeling studies [7–10]. A current hypothesis is that cells are “locked” at different time points, reflecting intermediate stable states, through epigenetic events to avoid reversion and to allow additional transcriptionally-driven molecular changes to occur [1]. Indeed, EMT-TFs have also been shown to act as co-factors of epigenetic regulators, such as the DNA methyltransferase 1 (DNMT1), which contributes to maintaining the long-

* Corresponding author at: Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, F-69373 Lyon Cedex 08, France.

E-mail address: virginie.marcel@lyon.unicancer.fr (V. Marcel).

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188718>

Received 5 January 2022; Received in revised form 2 March 2022; Accepted 11 March 2022

Available online 15 March 2022

0304-419X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

lasting decreased expression of the epithelial CDH1 marker [6,11,12]. In addition, microRNAs (miRNAs), such as the miR-200 family, contribute to negative feedback loops regulating EMT-TFs and EMT markers at the post-transcriptional level [7,9,13,14].

Hence, EMT encompasses highly heterogeneous cellular and molecular programs [3], and a precise definition of EMT states should also highlight novel features reflecting the heterogeneity of EMT programs. A vision limited to the restricted transcriptome will remain incomplete knowing that EMT relies on a multi-layered molecular mechanism, and that the transcriptome may be highly different from the translome [15]. Indeed, translational regulation may introduce an additional layer of heterogeneity to finely characterize the different EMT programs.

Translation relies on different mechanisms, including a global change in protein synthesis through the modulation of key signaling pathways or canonical translation factors, and a finer change in the translation of specific mRNAs due to cis- and trans-regulatory elements (Box 1).

Here, we review the contribution of translational control on EMT. We report the involvement of translational control, but also components and generation of the translational machinery (Box 2), in EMT through the viewpoint of physio-pathological EMT-related features, from rare and distant relationships in type I EMT to the strongest evidence in type III EMT. Data will be discussed to illustrate the added value of integrating translational control into the current picture of the complex multi-layered regulation of gene expression that drives EMT.

Box 1

Translation: process and regulation. Translation is a multi-step process leading to protein synthesis from mRNA (for reviews see [156,176,179]). During the initiation step, the small 40S ribosomal subunit (blue) associated with the initiator tRNA (tRNAⁱ) is recruited to the chemically modified 5'-end mRNA (m⁷G or cap, black circle) by direct interaction between eukaryotic initiation factors (eIFs, red). There, it scans the 5' UTR mRNA region until the AUG starting codon, where the recruitment of the large 60S ribosomal subunit (green) to form the active 80S ribosome occurs. The elongation step then includes the antisense recognition of the mRNA codon by the tRNA anticodon; the addition of the novel amino acid carried by the tRNA to the neosynthesized peptide (colored circles); and the translocation of the ribosome every three nucleotides along the mRNA. Finally, the termination step occurs at a stop codon, where the tRNA-mimic factor enters into the ribosome promoting the release of the neosynthesized peptide.

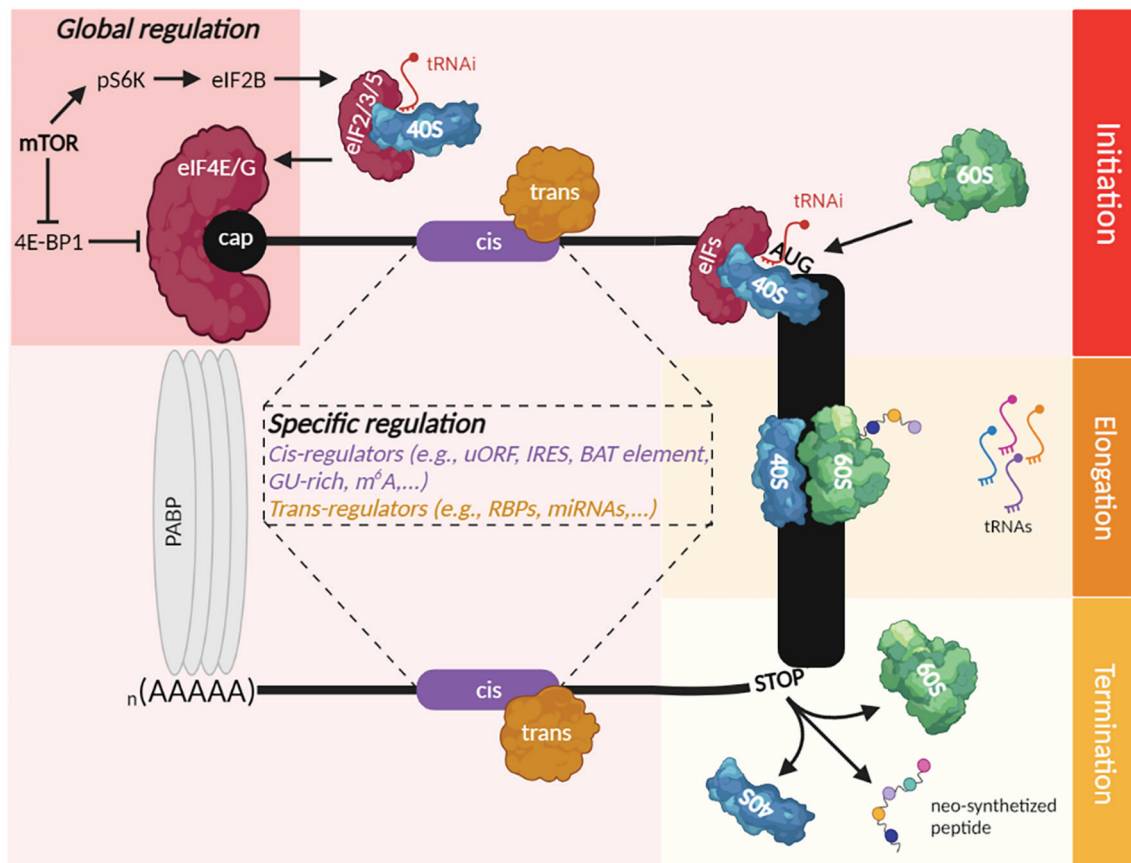


Figure Box 1.

Translation is a high-energy consuming process that is tightly regulated mainly during initiation. First, translation of all mRNAs can be regulated at once through cap and eIFs, whose activities are dependent on signaling pathways, including mTOR. It phosphorylates 4E-BP1 that releases eIF4E thus promoting phospho-eIF4E:cap interaction and protein synthesis. mTOR also promotes eIF2B phosphorylation by phosphorylating S6K, leading to the tRNAⁱ loading onto the 40S. Second, specific regulation of mRNA translation is dependent on mRNA regulatory sequences, structures or chemical modifications (cis-regulators (purple): upstream Open Reading Frame – uORFs; Internal Ribosome Entry Site – IRES; TGF-β-Activated Translation – BAT element; GU-rich sequence; N6-methyladenosine (m⁶A)...) that can be bound by positive or negative trans-regulators (orange), which corresponds to either RNA-binding proteins (RBPs) or non-coding RNAs, such as microRNAs (miRNAs). Recently, unexpected actors of translational regulation have been identified, the tRNAs and ribosomes.

Box 2

Ribosome: composition, biogenesis and its emerging role as a translational regulator. The ribosome translates mRNAs into proteins (for reviews see [30,179–181]). In human, it contains 80 ribosomal proteins (RPs) and 4 ribosomal RNAs (rRNAs) divided into two ribosomal subunits, the small 40S (blue) and the large 60S (green) ones. Ribosome biogenesis requires the three RNA polymerases (RNA Pol) and more than 300 factors. Ribosome assembly being mainly dependent on rRNA availability, regulation of ribosome biogenesis is usually studied through the limited step of rRNA synthesis. The rDNA genes are spread across the 5 acrocentric chromosomes and aggregate together during transcription to form the nucleolus. There, the RNA Pol I synthesizes the precursor 47S pre-rRNA, which is chemically modified (2'O-ribose methylation or 2'Ome, pseudo-uridylation...) and whose cleavage gives rise to individual 5.8S, 18S and 28S rRNAs. The fourth rRNA 5S and tRNAs are synthesized by RNA Pol III, and RPs by RNA Pol II. In the nucleolus, rRNAs and the most internal RPs are associated, while the most external RPs are associated with the ribosome in the cytoplasm. Defects in ribosome biogenesis induced by mutant RPs or ribosome biogenesis factors, have been associated with ribosomopathies, corresponding to developmental syndromes [180].

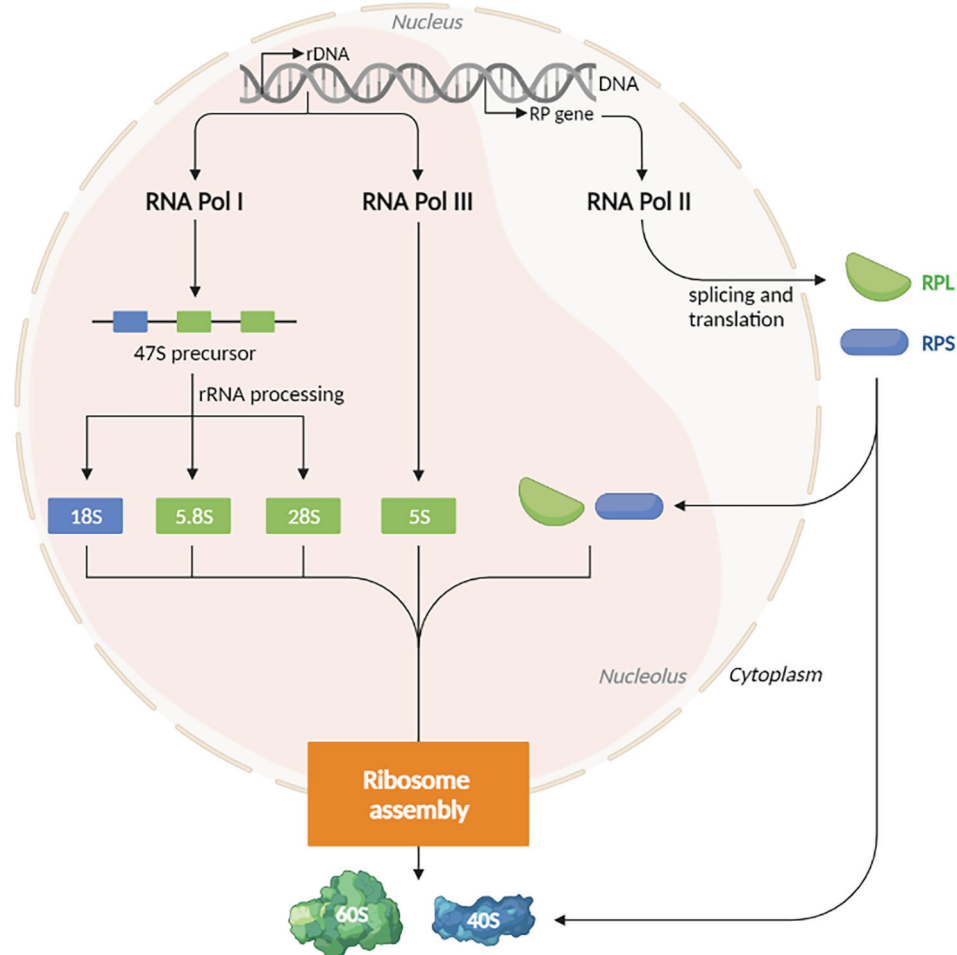


Figure Box 2.

Recently, ribosomes emerge also as direct regulators of translation (concept of “specialized ribosome”, for review see [30,49]). Ribosomes can display distinct compositions and are associated with a preference in translating specific mRNAs [30,31]. In mouse embryonic stem cells (mESCs), RPL10A- and RPS25-containing ribosomes favor the translation of mRNAs encoding proteins of extracellular matrix organization or vitamin B12 pathway, respectively [48]. Moreover, alterations in rRNA 2'Ome have been shown to favor IRES-dependent translation of mRNAs encoding key oncogenes such as IGF1R or VEGFA [148,182–184].

2. Scattered evidence in type I EMT

2.1. Type I EMT in embryogenesis

Type I EMT contributes to embryogenesis through (i) the detachment of epithelial cells; (ii) the coordination of collective long-distance migration of cells to a particular embryonic location; and (iii) the permanent or temporary reversion into epithelial state through mesenchymal-to-epithelial transition (MET) to limit early cell differentiation [1,16,17]. Type I EMT has been reported at three main steps of

embryogenesis. Primary EMT contributes to the early steps of development by promoting migration. For instance, neural crest cells with acquired mesenchymal properties migrate from the ectoderm-derived neural tube to distinct regions of the embryo to constitute pools of cells required for the future formation of skeletal and connective tissues of the nervous system [3,5,18] (Fig. 1). In contrast, secondary EMT contributes to the generation of a pool of epithelial cells able to differentiate into a limited number of cell types (e.g., epithelial precursors of somites). Tertiary EMT (or EndMT, for Endothelial-to-Mesenchymal Transition) contributes to the tridimensional organization of some organs by

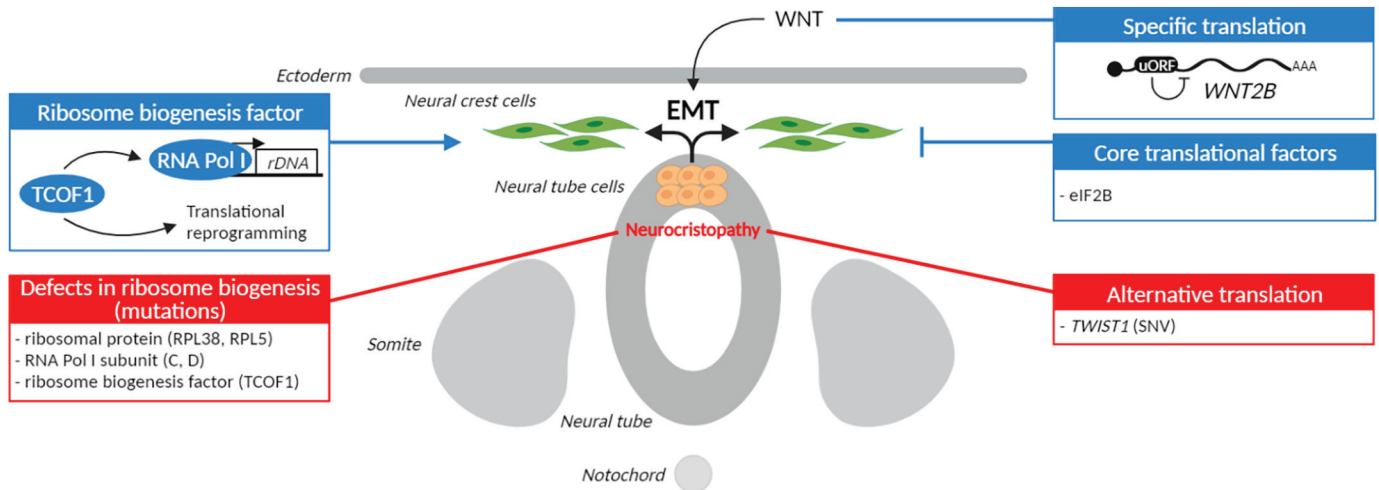


Fig. 1. Association between translational machinery and EMT during neural crest cell formation.

During embryogenesis, type I EMT contributes to the formation of neural crest cells (NCCs, green) displaying mesenchymal properties through the trans-differentiation of epithelial neural tube cells (orange) that will form skeletal and connective tissues of the nervous system. Components of the translational machinery and translational regulatory processes (blue boxes) have been reported in normal NCC formation, but also in NCC-derived pathologies (red box). Indeed, defects in type I EMT lead to neurocristopathies, among which some ribosomopathies, which are driven by genetic alterations in genes encoding ribosomal proteins or ribosome biogenesis factors. In type I EMT, only few data detailing molecular mechanisms of translational regulation have been described, most of the studies linking EMT and translation or translational machinery only providing associative relationships. Black circle, line and AAA tracks: schematic poly-adenylated mRNA with 5'-cap; black oval box: translational cis-regulatory element; rectangle box with arrow: schematic gene with its promoter; blue circle: protein; uORF: upstream Open-Reading Frame.

successive rounds of EMT/MET (e.g., heart formation) [18,19]. Type I EMT is triggered by a large number of signaling pathways including TGF- β , BMP, FGF, WNT, Notch or Hedgehog (for review, see [20]), unlike the more specific activation seen in both normal and tumoral adult tissues.

To date, the molecular aspects of type I EMT have been extensively studied at transcriptional and post-transcriptional levels (i.e., mRNA splicing and stability). It is well illustrated for the regulation of the *CDH1* gene expression [11,21,22]. However, the role of translation and the translational machinery in type I EMT has never been directly addressed, likely due to the complexity of the models and the need for large amounts of biological material for translation-related analyses. Nevertheless, few studies might provide links between EMT and translation or translational machinery during embryogenesis.

2.2. Overlaps in space and time

EMT-related signaling pathways and subsequent expression of EMT-TFs display distinct patterns depending on space and time in embryo. In *Drosophila melanogaster*, the coordinated activity of Twist and Snail regulates the establishment of the dorso-ventral polarity of the embryo during gastrulation, via the regulation of the switch in expression of E-cadherin to N-cadherin [23]. Interestingly, localized mRNA translation plays a key role in embryogenesis. Thus, as illustrated by the few examples below, by comparing overlap of spatio-temporal activation of EMT and regulation of translation during development, we could speculate on an association between translation and type I EMT.

During the first hours of drosophila embryo life, the establishment of the antero-posterior axis is dependent on the restricted translation of some mRNAs, such as *OSKAR*, to the posterior pole of the embryo thanks to its interaction with RNA-binding proteins (RBPs) [24]. Among RBPs regulating spatial translation during antero-posterior axis formation [25], expression of the protein z-DNA/RNA binding protein-1 (ZBP1) decreases in early chick embryos concomitantly with the expression of two mesenchymal markers, the laminin receptor and integrin $\alpha 6$ (*INHA6*) during neural crest formation. Moreover, its expression impairs EMT and neural crest formation [26]. Although ZBP1 has been shown to co-immunoprecipitate with *INHA6* mRNA, its involvement in regulating

INHA6 mRNA translation has not been investigated in this study. In addition, several RBPs (e.g., FXR1, QK, CPEB4) have been shown to regulate post-transcriptional mRNA levels in EMT during heart formation [27,28]. This suggests that RBPs, involved in post-transcriptional processes including translation, might contribute in EMT during embryogenesis.

In vertebrates, another emerging translational regulator might be of interest in type I EMT, the ribosome itself (Box 2). The antero-posterior definition of body axis is highly dependent on the expression of *HOX* family members. They are known to regulate the activation of type I EMT-related pathways, in particular WNT, BMP and FGF [29]. Recent data demonstrate that *HOX* expression is regulated at the translational level by the ribosomes [30,31]. At E11 and during mouse skeleton axial patterning, the heterozygous depletion of the ribosomal protein RPL38 impairs translation of *Hox* mRNA driven by particular cis-regulatory elements located in their 5'-untranslated region (5'UTR) termed Internal Ribosome Entry Sites (IRES) [32,33] (Box 1). Interestingly, RPL38 is highly expressed within the neural tube and in mesenchymal cells that give rise to both vertebrate cartilage and dermis [32]. Although it has not been investigated whether RPL38-containing ribosomes induce type I EMT through enhanced *Hox* mRNA translation, its particular expression pattern suggests a link, either direct or indirect, between RPL38 and EMT during embryogenesis. Other RPs show particular expression patterns associated with type I EMT-related tissues, including RPL5 whose expression is restricted to precursors of heart formation and whose depletion leads to heart defects [34,35]. These data suggest a role for RPs in development that may be dependent on EMT. Functional studies are now required to clearly assess whether overexpression of RPL38 or RPL5 contributes to EMT during neural crest formation and heart formation, respectively.

To date, only one cis-regulatory element involved in translational control has been linked to type I EMT. It comes from the Wnt pathway, which also plays a key role in the spatio-temporal development of embryo axis [36] (Fig. 1). Among the Wnt family members, the *WNT2B* gene (or *WNT13*) is expressed in the mesoderm during gastrulation [37] and results in several isoforms through the usage of both alternative splicing sites and translation start codons [38]. Translation initiation of *WNT13B* and *WNT13C* mRNA isoforms is reduced by the presence of an

upstream Open Reading Frame (uORF), a 5'UTR cis-regulatory element [36] (Box 1). uORFs are known to inhibit translation initiation by recruiting ribosomes on their own AUG starting codon to translate a short - and probably non-functional - peptide and release the ribosome just before the AUG of the downstream ORF, thus reducing ribosome recruitment to it [39]. A detailed examination of the 5'UTR sequence indicates that several *WNT* mRNAs encompass uORFs. Although the

uORF-mediated translational control of *WNT2B* on type I EMT has not been investigated, it suggests a role for translation in activating the EMT-related Wnt pathway during gastrulation.

2.3. Neurocristopathies and ribosomopathies

The only evidence suggesting that translational control and

Table 1
Translational regulation of EMT-related genes.

Gene	EMT process	Associated disease/phenotype	Translational cis-regulator	Translational trans-regulator	Translational regulation	References
Pro-EMT pathways						
WNT2B / WNT13	Type I EMT	Gastrulation (altered development of neural axis, somites, limb bud and nephron)	uORF	Not required	Negative	[36]
DAB2	Type II EMT	TGF- β dependent E-cadherin to N-cadherin/vimentin switch	BAT element in 3'UTR	hnRNPE1	Negative (elongation through eEF1A1)	[80]
	Type III EMT	TGF- β dependent E-cadherin to N-cadherin/vimentin switch	BAT element in 3'UTR	hnRNPE1	Negative (elongation through eEF1A1)	[81]
ILEI	Type II EMT	TGF- β dependent E-cadherin to N-cadherin/vimentin switch	BAT element in 3'UTR	hnRNPE1	Negative	[80]
	Type III EMT	TGF- β dependent E-cadherin to N-cadherin/vimentin switch	BAT element in 3'UTR	hnRNPE1	Negative (elongation through eEF1A1)	[81]
PDGFR α	Type II EMT	Myofibroblasts proliferation	3'UTR	CPEB2	Positive	[89]
EMT-TFs						
TWIST1	Type I EMT	Neural crest formation; Saethre-Chotzen syndrome	single nucleotide variants in 5'UTR creating alternative translational start sites	Not required	Negative	[43]
	Type III EMT	Cell migration and invasion	IRES	YB-1	Positive	[139]
HIF1A	Type III EMT	Cell migration and invasion	5'UTR IRES	YB-1	Positive	[140]
LEF1	Type III EMT	Not investigated	5'UTR IRES	Not investigated	Positive	[141]
SNAI1	Type II EMT	Cell migration	5'UTR cap Not investigated	eIF3E eIF4E eEF2/METTL3	Negative Positive Positive	[75,76] [78] [133,135]
	Type III EMT	Cell migration and invasion	3'UTR GU-rich region 5'UTR cap IRES	CELFP1 4E-BP1 YB-1	Positive Negative Positive	[130] [164] [139]
SNAI2	Type II EMT	Cell migration	5'UTR cap	eIF3E	Negative	[76]
ZEB1	Type III EMT	Cell migration and invasion; E-cadherin/vimentin switch	Alternative 3'UTR polyA lacking miRNAs binding sites Not investigated	miRNAs miR-200c and miR-141	Positive Negative (through eIF4E)	[136] [165]
ZEB2	Type II EMT	Cell migration	3'UTR AU-rich sequence 5'UTR cap	hnRNPA1 eIF3E	Negative Negative	[165] [75,76]
	Type III EMT	Cell migration and invasion	IRES retention through splicing inhibition via Snail-dependent natural antisense transcript (NAT) Enrichment in rare triplet codon	Not investigated tRNA	Positive Negative (elongation)	[138] [137]
Mesenchymal proteins						
INHBA	Type III EMT	Cell migration and invasion (breast)	Not investigated	hnRNPE1	Negative	[131]
LAMB1	Type III EMT	PDGF-dependent signaling metastasis formation	IRES	LA	Positive	[142-144]
VIM	Type II EMT	Cell migration	5'UTR cap	eIF3E	Negative	[75]
ECM components						
COL1	Type II EMT	Hepatic/lung fibroblast	stem-loop in 5'UTR	LARP6	Negative (sequestration via vimentin)	[87]
		Mouse cardiac fibroblast	Proline-rich regions	LARP6/DHX9 EPRS-dependent tRNAs	Positive Positive	[91]

machinery plays a role in EMT during embryogenesis comes from studies dedicated to familial disorders. Developmental defects of the embryonic neural crest cell lineages have been associated with a large set of syndromes related to craniofacial malformations, arising from genetic events and classified as neurocristopathies [40,41]. The main demonstration that neurocristopathies are dependent on type I EMT defects is based on the identification of genetic alterations in EMT-TFs, including *TWIST1* in craniosynostosis, *ZEB2* in Mowat Wilson syndrome or *SNAIL2* in Waardenburg syndromes [41]. Moreover, functional demonstrations have been established such as the fact that in Grainyhead-like 2 (GRHL2)-null mice exhibiting embryonic lethality associated with neural tube defects and cleft face phenotype, homozygous depletion of the EMT-TF *Zeb1* is sufficient to rescue palate and facial defects [42]. Interestingly, alteration of translation through genetic alterations has been identified in neurocristopathies. Non-coding single nucleotide variants (SNVs) altering translation have been reported in the 5'UTR of *TWIST1* mRNA of undiagnosed neurocristopathic patients (Saethre-Chotzen syndrome) [43] (Table 1). These SNVs create alternative translation start sites upstream the canonical AUG starting site thus creating an alternative uORF which reduces *TWIST1* protein level. The role of translation in type I EMT-related diseases is also supported by the observation that the translational factor eIF2B, involved in the loading of the initiator Met-tRNA (tRNAi) (Box 1), inhibits the migration of neural crest cells [44].

Within neurocristopathies, some ribosomopathies have been described, indicating a relationship between the translational apparatus and EMT-related defects that might be independent of translational regulation [41,45]. Ribosomopathies are indeed developmental disorders that result from the mutation or depletion of genes encoding ribosomal proteins (RPs) or factors involved in ribosome biogenesis, the multi-step process leading to the production of ribosomes [46] (Box 2). These genetic defects induce tissue-specific developmental aberrations by reducing ribosome biogenesis; thus promoting cell cycle arrest and apoptosis through the activation of p53 [47]. An alternative hypothesis suggests that alteration in ribosome composition (Box 2), induced by mutation in *RP* coding genes or specific *RP* expression, directly alters translation of some key developmental mRNAs, such as *HOX* family members [48,49]. In mice, *RP* homozygous depletion promotes phenotypes overlapping with neurocristopathy features, such as craniofacial (RPL38) or heart (RPL5) defects [34,41]. In zebrafish, mutation in the ribosome biogenesis factor *ESF1* coding gene induces severe neural crest cell-derived defects [50]. More importantly, two ribosomopathies are classified as neurocristopathies: the Diamond-Blackfan Anemia (DBA) syndrome is associated with mutation in one of at least 14 *RP* genes which leads to defects in neural crest formation with failure in erythropoiesis and skeletal development; and the Treacher Collins syndrome (TCS), in which patients display cleft lip/palate, associated with mutation in the RNA polymerase I (RNA Pol I) subunits *POLR1C* and *POLR1D* or in the ribosome biogenesis factor *TCOF1* coding genes [34,41,45,51,52].

The overlap between tissue malformations observed in neurocristopathies and ribosomopathies suggests a relationship between the translational machinery and EMT-related neural crest formation. Some data clearly supports this idea. First, ubiquitinylation of wild-type *TCOF1*, involved in TCS when mutated, favors ribosome biogenesis through the formation of a stable complex with RNA Pol I and ribosome modification enzymes thus promoting a translational reprogramming that specifies neural crest formation, although the molecular mechanism remains to be deciphered [53,54] (Fig. 1). Second, using ethynyl uridine pulse assays to analyze ribosomal RNA (rRNA) synthesis in chick (stage 18/19) and mouse (E9.0) embryos, it was demonstrated that rRNA synthesis increased in migrating and non-proliferating cells which are located in neural crest routes [55]. While this study did not investigate directly the level of ribosomal protein synthesis, it provided a novel perspective on the association between ribosome biogenesis and type I EMT.

Though these may only be associative relationships, some data suggest a link between spatio-temporal activation of type I EMT and translational regulation, as well as between ribosome and neural crest formation (Fig. 1). However, whether the amount of ribosome and/or its specific composition is important in neural crest specification remains to be investigated. Determining the impact of depletion of RPs or ribosome biogenesis factors (e.g., RPL38, TCOF1) in GRHL2-null mice on rescue of neural defects, may demonstrate the direct link between ribosome and type I EMT as it was assessed for EMT-TFs two decades ago [42]. Interestingly, similar emerging concepts arise from studying the role of translation and the translational machinery in embryonic stem cells (ESCs) (for reviews see [15,56–58]). Experimental data are now required to demonstrate the direct role of the translational machinery and translational control in type I EMT, and whether the translational machinery and translational control may represent molecular features to finely characterize the heterogeneity and dynamics of EMT in embryogenesis.

3. Translational control in type II EMT

3.1. Type II EMT in tissue homeostasis

In adults, type II EMT contributes to tissue homeostasis in response to injury (e.g., skin, lung, kidney) and during normal adulthood (e.g., ovarian epithelium during post-ovulation period) [1,17]. In response to injury, the myofibroblasts are responsible for wound contraction during which the edges of the wound migrate towards the center (Fig. 2). They also produce the matrix metalloproteases (MMPs), which regulate extracellular matrix (ECM) destruction and reorganization required for immune cells to reach the wound and for the establishment of a proper scar [59]. Although the precursor of myofibroblasts is still a matter of debate (i.e., derived from injured epithelial or endothelial cells, or from local fibroblasts or epithelial cells), they are probably derived from an EMT process [60–65]. Indeed, EMT-derived myofibroblasts display mesenchymal properties and express specific markers, including α SMA, FSP1 and collagen I, irrespective of their origin. Moreover, myofibroblast activation is dependent on pro-inflammatory compounds, among which the EMT-inducers TGF- β and PGDF [66].

In the case of unlimited wound-healing associated with chronic or persistent inflammation, myofibroblasts secrete an extensive amount of ECM components with a specific composition (i.e., enrichment in tenascins, integrins and collagens). This excessive secretion is not compensated by the usual production by myofibroblasts of MMP capable of degrading ECM. It results in fibrosis, which is phenotypically associated with the overgrowth, hardening, and scarring of tissues. Fibrosis can compromise organ function and lead to organ failure, and is frequently observed in chronic diseases of the liver, kidney and lung [59,66]. The molecular events leading to the aberrant activation of myofibroblasts involved in fibrosis are poorly understood and involve aberrant extracellular signals (e.g., ECM composition, inflammatory cytokines, immune system activity) (for reviews see [16,67,68]). EMT plays essential role in fibrosis. Indeed, several studies reported that core EMT-TFs, including Twist1, Snail and Zeb1, are individually sufficient to promote fibrosis [69–71]. Interestingly and in contrast to type I EMT, some evidence indicates that translation directly contributes to type II EMT and fibrosis.

3.2. TGF- β : a regulator of translation

The major signaling pathway regulating wound-healing is TGF- β . It activates pro-inflammatory and pro-EMT pathways, such as BMP/SMAD, leading to EMT-TF transcriptional activation and α SMA expression, the marker of fibroblast activation [60,63,72]. A strong link has been observed between TGF- β signaling, type II EMT and translation (Fig. 2). It first includes interplay with translation initiation factors, such as the eIF3 complex and eIF4E that are involved in the recruitment of the

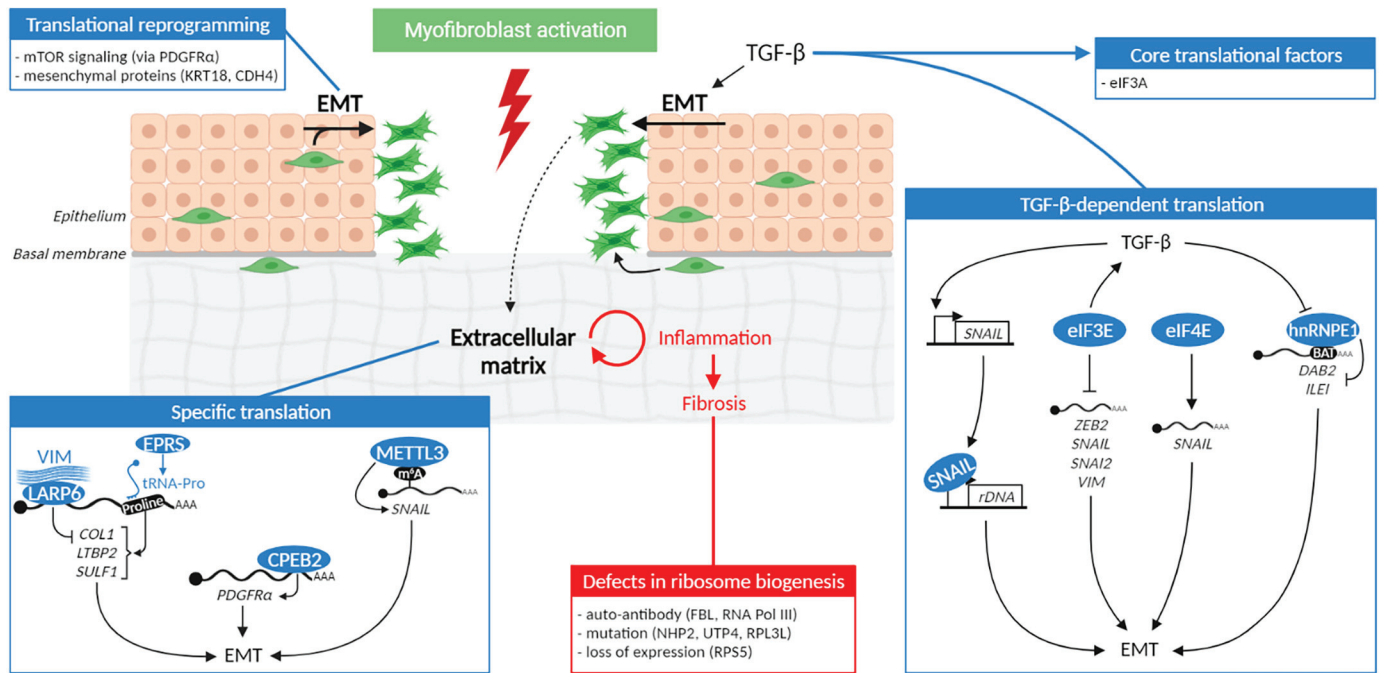


Fig. 2. Translational regulation involved in myofibroblast activation and fibrosis.

Type II EMT corresponds to myofibroblast activation (green star-shaped cells) that transdifferentiate from either epithelial cells (orange) or fibroblasts (green) in response to microenvironmental changes promoting wound contraction and production of extracellular matrix (grey) to maintain homeostasis. Both global and specific translation (Box 1) have been described in type II EMT (blue boxes). TGF- β , the main signaling pathway involved in the activation of type II EMT, induces translational reprogramming through different mechanisms involving eIFs, EMT-TFs or RBPs (right-hand blue box). In addition, EMT-TFs and EMT markers are regulated by specific translational events (bottom left blue box). In case of chronic inflammation, uncontrolled production of extracellular matrix leads to fibrosis resulting in the overgrowth, hardening, and scarring of tissues (red). It has been shown that fibrosis is triggered and associated with various defects in ribosome biogenesis (red box). Black circle, line and AAA tracks: schematic poly-adenylated mRNA with 5'-cap; black oval box: translational cis-regulatory element; rectangular box with arrow: schematic gene with its promoter; blue circle: protein; BAT: TGF- β -activated translation element; m⁶A: N⁶-methyladenosine; proline: proline-rich sequence; tRNA: transfer RNA.

small 40S ribosomal subunit on capped-mRNA (Box 1). In primary rat pulmonary cells, TGF- β treatment increases the translational factor eIF3A levels, which contributes to cell proliferation, E-cadherin/vimentin switch and production of collagen I and α SMA. In turn, inhibition of eIF3A through ectopic expression of the eIF3A-targeting miR-497 or siRNA approach partially reverses EMT [73,74]. In non-transformed mammary epithelial MCF10A and MCF12A cells, a decrease in another subunit of the eIF3 complex, eIF3E, favors TGF- β secretion and cap-independent translation of the EMT-TFs ZEB2 and SNAIL, as well as VIM as shown by a gene-specific approach [75,76]. Similarly, eIF4E is required for TGF- β -induced EMT in NMuMG or primary rat cells, the expression of a mutant form or the usage of an antagonist being sufficient to reduce acquisition of EMT characteristics [77,78]. At the molecular level, inhibition of eIF4E by 4Ei-1 antagonist decreases the association of SNAIL mRNA with active ribosomes in response to TGF- β treatment, indicative of an eIF4E-induced SNAIL mRNA translation in TGF- β -induced cells [78]. This suggests that TGF- β induces type II EMT in an eIF-dependent manner, at least in part by enhancing EMT-TF translation.

Large-scale analyses also revealed changes in the translational program in response to TGF- β . Two approaches were used: 1- polysome profiling - corresponding to the analysis of differentially ribosome-associated mRNAs using microarrays, RNA-seq or RTqPCR; 2- ribosome profiling - identifying mRNA fragments protected by the ribosome using RNA-seq to precisely determine the change in translation and location of ribosomes on mRNAs [31]. By using ribosome profiling to study the early phase of human primary cardiac fibroblast conversion to myofibroblasts, a recent study demonstrated that TGF- β stimulation induces translational dysregulation of 67 mRNAs with no change in mRNA levels 45 min post-treatment onwards [79]. Gene ontology

revealed an enrichment in “transcription regulator activity”, suggesting that in response to TGF- β , translation allows a rapid induction of transcriptional reprogramming to promote myofibroblast activation and type II EMT. This TGF- β -induced change in translation is associated with modulation in the expression pattern of RBPs, including reduced expression in RBPs that inhibit fibroblast activation [79]. These data suggest that TGF- β drives a translational reprogramming through RBPs-dependent mechanisms, as detailed for two EMT inducers, disabled-2 (DAB2) and interleukin-like EMT inducer (ILEI) that contain TGF- β -activated translation (BAT) elements in their 3'UTR mRNA region (Fig. 2). In murine epithelial cells, TGF- β treatment favors translation of *Dab2* and *Ilei* mRNAs by inducing the dissociation of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 (hnRNPE1) from BAT elements. hnRNPE1 is a RBP which interferes with translation elongation by inhibiting the release of the embryonic elongation translational factor eEF1A1 once its associated tRNA has been delivered to the ribosome [80,81]. It is noteworthy that comparison of normal and pathological myofibroblast transcriptome using polysome profiling (e.g., idiopathic pulmonary fibroblasts) also reveals a translational modification during fibrosis that affects several mRNAs including EMT-related mRNAs such as *KRT18* or *CDH4* [82]. Overall, these data support the notion that TGF- β induces a profound translational reprogramming to trigger myofibroblast activation.

3.3. Specific translation of EMT markers

Specific translation of mRNAs encoding markers of myofibroblasts has been explored in recent years. The secreted ECM component collagen I, both marker of myofibroblast and inducer of EMT, remains a prototypic model to study mRNA stability and localized translation (for

review see [83]). Stefanovic's group deciphered over two decades a regulatory model that involves LARP6, a RBP of the LA protein family member specific of collagen I (*COL1*) mRNA [84] (Fig. 2). In fibroblasts, LARP6 interacts with both vimentin protein and a stem-loop structure contained in the 5'UTR of *COL1* mRNA, thus sequestering *COL1* mRNAs to vimentin filaments [85]. It enables formation of a pool of *COL1* mRNAs protected from degradation and from translation. In activated

hepatic myofibroblasts (*i.e.*, hepatic stellate cells or HSCs) compared to normal fibroblasts, *COL1* mRNAs are translocated to the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) and translated within the ER lumen where post-translational modifications occur before secretion of collagen I polypeptides. Translocation and recruitment to ribosomes can be either LARP6-dependent or -independent [86,87]. Moreover, it has been shown that LARP6 recruits RNA helicase A (or DHX9), known to

Table 2

Components of the translational machinery involved in EMT.

Protein	Role in translation	EMT process	Associated disease/phenotype	Translational target	Inducer or inhibitor of EMT	References
Signaling pathways						
4E-BP1	Inhibitor of cap-dependent translation by direct interaction with eIF4E	Type III EMT	Cell migration and invasion; Colorectal cancer liver metastasis	eIF4E cap-dependent translation of <i>SNAIL</i> mRNA	Negative	[164]
			Cell migration and invasion (prostate)	eIF4E cap-dependent translation of <i>VIM</i> , <i>YB-1</i> and <i>CD44</i> mRNAs	Negative	[167]
			Cell migration and invasion; E-cadherin/vimentin switch (breast)	Not investigated	Negative	[166]
mTOR	Activator of global protein synthesis and ribosome biogenesis factors	Type II EMT	Fibrosis; Myofibroblast activation	Not investigated	Positive	[107,108]
		Type III EMT	Lung fibroblast	Collagen I	Positive	[110]
			Lung metastasis	FMRP-dependent <i>ZEB2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>CDH1</i> and <i>VIM</i> mRNAs translation	Positive	[145]
			Cell migration and invasion (breast)	CELFI1-dependent <i>SNAIL</i> mRNA translation	Positive	[130]
MNK1	MAPK-interacting protein kinase	Type III EMT	Cell migration and invasion (pancreas); E-cadherin/vimentin switch	hnRNPA1-dependent <i>ZEB1</i> mRNA translation	Negative	[165]
TCOF1	Activator of RNA pol I and rRNA chemical modification enzymes	Type I EMT	Neural crest cell specification; Treacher-Collin Syndrome	Ubiquitination promotes formation of a stable complex with RNA polymerase I and ribosome modifications enzymes and translational reprogramming	Positive	[53,54]
Translational machinery components						
eIF2B	eIF2 complex subunit involved in the loading of the initiator Met-tRNA (tRNAi)	Type I EMT	Neural crest cell migration	Not investigated	Negative	[44]
eIF3A	eIF3 complex subunit involved in the stabilization of the eIF2: tRNAi:40S complex	Type II EMT	Cell proliferation; E-cadherin/vimentin switch; Collagen I and α SMA production	Not investigated	Positive	[73,74]
eIF3E	eIF3 complex subunit involved in the stabilization of the eIF2: tRNAi:40S complex	Type II EMT	TGF- β secretion; E-cadherin/vimentin switch	Cap-dependent translation of <i>ZEB2</i> , <i>SNAIL</i> , <i>VIM</i> mRNAs	Negative	[75]
eIF4E	eIF4 complex subunit involved in the recruitment of the small 40S ribosomal subunit on the mRNA	Type II EMT	Cell migration; α SMA production; actin reorganization	Cap-dependent <i>SNAIL</i> mRNA recruitment into active polysomes	Positive	[78]
		Type III EMT	Cell migration and invasion (breast)	TGF- β -dependent translation of <i>SNAIL</i> mRNA	Positive	[77]
			Cell migration and invasion (pancreas)	<i>ZEB1</i> mRNA translation through <i>ZEB1</i> -targeting miRNAs induction	Negative	[165]
eIF5A2	eIF5 complex subunit involved in the first peptide bond formation	Type III EMT	Cell motility; Metastasis formation; E-cadherin/vimentin switch; Cisplatin resistance	Not investigated	Positive	[157,160,161,185]
Ribosomal biogenesis						
EPRS	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	Type II EMT	Fibrosis	Proline-rich mRNAs (collagen I)	Positive	[91]
MRPL13	Ribosomal protein of the mitochondrial ribosome	Type III EMT	Cell migration and invasion; E-cadherin/vimentin switch	Not investigated	Positive	[151]
RPL22L1	Ribosomal protein of the 60S large subunit	Type III EMT	Cell migration and invasion; E-cadherin/vimentin switch (ovary)	Not investigated	Positive	[153]
RPS5	Ribosomal protein of the 40S small subunit	Type II EMT	Inhibition of fibrosis initiation; α SMA expression	Not investigated	Negative	[103]
RPS7	Ribosomal protein of the 40S small subunit	Type III EMT	Cell migration and invasion; E-cadherin/vimentin switch (prostate)	Not investigated	Positive	[152]
rRNA	Ribosomal RNA	Type II EMT	Fibrosis	TGF- β induced <i>SNAIL</i> binding to rDNA promoter	Positive	[55]

facilitate translation initiation of structured mRNAs [88]. In collagen-producing cells (*i.e.*, HSCs and human lung fibroblasts), RNA helicase A is overexpressed and promotes translation of *COL1* mRNA in a LARP6-dependent manner [88]. Synthesis of collagen I polypeptides in myofibroblasts is thus controlled by localized and specific translational control. In addition to synthesis of ECM components, specific translation also plays a role in the regulation of myofibroblast proliferation. For example, the RBP CPEB2 binds *PDGFR α* mRNA through its 3'UTR and increases its translation [89]. In CPEB2-KO myofibroblast progenitors, the ectopic expression of CPEB2 is sufficient for recovering *PDGFR α* -induced cell proliferation [89]. Therefore, cellular and biological features of myofibroblasts rely on specific translational regulation through distinct cis- and trans-regulatory elements (Table 1).

Recent advances show that components of the translational machinery can act as direct regulators of translation, including tRNA and ribosome (Boxes 1 and 2). Indeed, modulation of the tRNA repertoire affects translation of specific mRNAs, cell enrichment in particular tRNAs promoting translation of transcripts enriched for their cognate codons [39]. Modulation of tRNA repertoire includes alteration of tRNA activity, which may rely on RNA chemical modifications (for review see [90]). The glutamyl-prolyl-tRNA synthetase *EPRS* is overexpressed in various human and mouse fibrotic models [91]. Moreover, the heterozygous depletion of *Eprs* gene in mice decreases cardiac fibrosis by 50%. Finally, as shown by polysome profiling analyses, reduction of *EPRS* expression is sufficient to decrease translation of proline-rich mRNAs encoding pro-fibrotic proteins such as collagens, LTBP2 and SULF1 [91]. These data suggest that alteration of tRNA chemical modifications plays a role in fibrogenesis. Similar hypothesis might be proposed regarding ribosomes. A recent study of Barna's lab demonstrated that RPL10A-containing ribosomes which represent a subpopulation of the ribosomes in murine epithelial stem cells, favor translation of mRNAs encoding protein involved in ECM organization [48]. In a second study, comparison of translation capacity between murine myofibroblasts and their precursors during kidney fibrosis using RPL10A-associated mRNAs as a surrogate of polysome purification, revealed significant enrichment in translation of pro-fibrotic proteins, such as TIMP1 (metalloprotease inhibitor) and CD90 (cell-matrix interaction protein) [92]. Based on Barna's discovery, we can hypothesize that a particular sub-population of ribosomes was enriched in kidney fibrogenesis model using this particular purification of translated mRNAs. Thus, we may speculate that overexpression of RPL10A in fibroblasts may induce a myofibroblast phenotype driven by RPL10A-containing ribosomes that specifically control translation of ECM components. Altogether, data available support the notion that the translational machinery itself as well as RBP contributes to the specific translation of mRNAs that are key actors of type II EMT characteristics (Table 2).

3.4. Ribosome biogenesis and mTOR pathway

Like in type I EMT, several studies suggest a link between ribosome biogenesis (Box 2) and type II EMT. In non-transformed murine mammary gland NMuMG cells, an increase in ribosome biogenesis monitored using rRNA synthesis has been observed in response to TGF- β probably through Snail binding to rDNA promoters [55] (Fig. 2). Moreover, inhibition of rRNA synthesis using the RNA Pol I inhibitor CX-5461 reduces TGF- β -induced EMT activation and progression in NMuMG cells [55], prevents the development of fibrosis-related pulmonary arterial remodeling in rats [93], and inhibits fibroblast proliferation and activation in primary cardiac fibroblasts probably in a p53-dependent manner [94]. However, markers of fibroblast activation and underlying molecular mechanisms have not been assessed, precluding any conclusion regarding the direct role of ribosome biogenesis in myofibroblast activation or fibrosis.

Similar associations have been observed in clinic. Patients displaying systemic sclerosis, an autoimmune disease characterized by skin and lung fibrosis, are diagnosed using auto-antibodies that recognize

fibrillarin (FBL), a rRNA biogenesis factor [95]. Likewise, auto-antibodies of RNA Pol III, which is responsible for tRNA transcription (Box 1), are frequently observed in scleroderma and are highly specific for scleroderma diagnosis [96–98]. Once again, these data support a relationship between an increase in ribosome biogenesis, type II EMT and fibrosis. In contrast, some studies suggest a negative association. First, the missense mutation of NHP2 ribonucleoprotein encoding gene, a rRNA biogenesis factor, has been linked to *Dyskeratosis congenita*, an inherited disease characterized by pulmonary fibrosis [99]. Second, germline mutation in the C-terminus coding region of Utp4 has been identified in North American childhood cirrhosis, Utp4 being required for correct 18S and 28S rRNA processing [100,101]. Third, reduced expression of RPL3L is associated with atrial fibrillation, which results from atrial fibrosis [102]. Finally, overexpression of the ribosomal protein RPS5 has been shown to inhibit activation of hepatic stellate cells, and thus fibrosis initiation, upon TGF- β treatment [103]. This in turn is associated with reduced synthesis of α SMA and collagen I proteins. Knowing that RPS5 is suspected of having extra-ribosomal functions [104–106], its increase may impair fibrogenesis by regulating translation *via* ribosome-dependent or -independent means. All these data suggest that ribosome biogenesis may impact normal or pathological type II EMT, though positively or negatively, and underlying molecular mechanisms are still unclear (Fig. 2).

Ribosome biogenesis and global protein synthesis are regulated by several signaling pathways, including the mTOR pathway. In particular the mTORC1 subunit (or Raptor) regulates ribosome biogenesis and translation through two main axes: the 4E-BP1/eIF4E and pS6K/eIF2B (Box 1). Interestingly, the mTOR pathway is activated by various EMT-related signaling pathways and has been associated with fibrosis (Table 2). In primary pulmonary fibroblasts, inhibition of the mTOR pathway using the P529 molecule decreases TGF- β -induced myofibroblast activation, as well as synthesis and deposition of ECM components *in vitro* [107]. Similar observations were reported using another mTOR inhibitor (LY294002) in rat renal fibroblasts [108]. Moreover, the *PDGFR α* signaling pathway is associated with increased levels of mRNAs encoding proteins belonging to mTOR signaling and mRNA translation in mouse models mimicking adipose tissue fibrosis [109]. Finally, it has been reported that murine lung myofibroblasts display an increase in glutaminolysis resulting in the production of α -ketoglutarate that promotes *COL1* mRNA translation in a mTOR-dependent manner [110]. Aside from this latter study, it remains unknown whether mTOR-associated type II EMT features result from an increase in global protein synthesis (*e.g.*, puromycylation assay) or specific change in translation (*e.g.*, ribosome profiling). Overall, these data support the notion that mTOR-associated translational regulation is implicated in type II EMT.

Globally, an increase in ribosome biogenesis and canonical eIF factors, as well as activation of mTOR signaling, have been shown to be one of the hallmarks of activated fibroblasts and of fibrosis in various organs (Table 2) (Fig. 2). However, in contrast to type I EMT, numerous events of specific translation have been deeply analyzed in type II EMT. Not only TGF- β signaling clearly induces translational reprogramming at an early stage of fibroblast activation, but the synthesis of collagen I polypeptides requires a finely-controlled translational program at a particular subcellular localization (Table 1). It has to be noted that translation can also contribute to fibrosis in response to aberrant inflammatory signals in addition to EMT cues (for review see [111]). For instance in primary hepatic stellate cells (HSCs), the combination of exposure to macrophage-conditioned medium enriched in pro-inflammatory cytokines, and overexpression of the ribosome-associated protein RACK1 triggers assembly of the canonical translation eIF4F factor to promote translation of pro-fibrotic factors such as collagen I [112]. Growing data support the notion that translational reprogramming participates in triggering type II EMT in response to various signaling pathways. It is now essential to assess whether plasticity in the translational landscape can help to more finely depict and

characterize the heterogeneity of EMT programs. Such hypothesis might be investigated by comparing for instance the transcriptome in different EMT-related signaling pathways using polysome profile-based sequencing approaches.

4. Translation: key player of type III EMT

4.1. Type III EMT in cancer

EMT plays a key role in the formation of metastasis [113]. The current dogma states that most of epithelial cancer cells located at the invasive front undergo EMT. Mesenchymal and intermediate states cancer cells forming clusters with other cells of the microenvironment intravasate into blood vessels and encountered for part of the circulating tumor cells (CTCs) (Fig. 3). At distant organs, some CTCs extravasate into a novel environment where they may remain dormant before undergoing MET, thus reacquiring proliferative properties, leading to the formation of micrometastases [113]. The first demonstration that EMT contributes to cancer progression dates back to the 1990s. In various epithelial cancer cell lines (e.g., breast, lung, bladder, colon), down-regulation of *CDH1* in association with TGF- β treatment promotes acquisition of myofibroblast characteristics associated with invasive properties [16,114–117]. In the late 2010s, core EMT-TFs were shown to be required for cancer cell dissemination [118–120]. In addition to promoting metastasis, EMT also seems to induce resistance to anti-cancer therapies, including chemotherapy, targeted therapies and immunotherapy [113]. Finally, some data suggest that EMT-TF reactivation might be one of the first steps leading to a pre-neoplastic stage by inhibiting senescence process [121]. Interestingly, partial EMT features have been well described in type III EMT and seem to be key to understand the role of EMT in cancer progression. Indeed, the existence

of partial EMT provides a pool of cancer cells with different properties, some of them having the most adequate features to survive in a defined environment, a key advantage when speaking of metastasis or resistance to therapies [122,123].

Similarly to the wound-healing response, reactivation of EMT programs in adult epithelial cancer cells results from the expression of core EMT-TFs by EMT signaling pathways (i.e., TGF- β , WNT, tyrosine kinases...). These pathways are activated either intrinsically since most of them are key oncogenic driver pathways, or in response to oncogenic activation induced for example by RAS or c-Myc. At the molecular level, in addition to transcriptional reprogramming, numerous post-transcriptional molecular mechanisms have been described in type III EMT, including regulation of mRNA splicing, mRNA stability and mRNA translation (for reviews on translation see [124,125]) (Tables 1 and 2). Among the main molecular regulators of EMT, miRNAs are involved in several feedback loops with EMT-TFs, regulating EMT and cancer progression through the repression of EMT-TFs and of mesenchymal markers [14]. Although it is still under debate, miRNAs not only promote mRNA degradation but also repress mRNA translation [126]. It has been reported that during the early step of breast cancer initiation, recapitulated by serial xenografting of H-RAS overexpressing MCF10A cells, translation of *TWIST1* mRNA is repressed by miR-580 in a 3' UTR sequence-specific manner, as illustrated by a luciferase reporter assay; this repression is increased by cytoplasmic polyadenylation binding protein (CPEB) [127]. In addition to miRNAs, numerous mechanisms regulating translation have also been well described in type III EMT. Indeed, in contrast to type I and II EMT, translational regulation has been well documented in EMT-induced cancer progression. Here, we will discuss only those not described above and novel advances in the field.

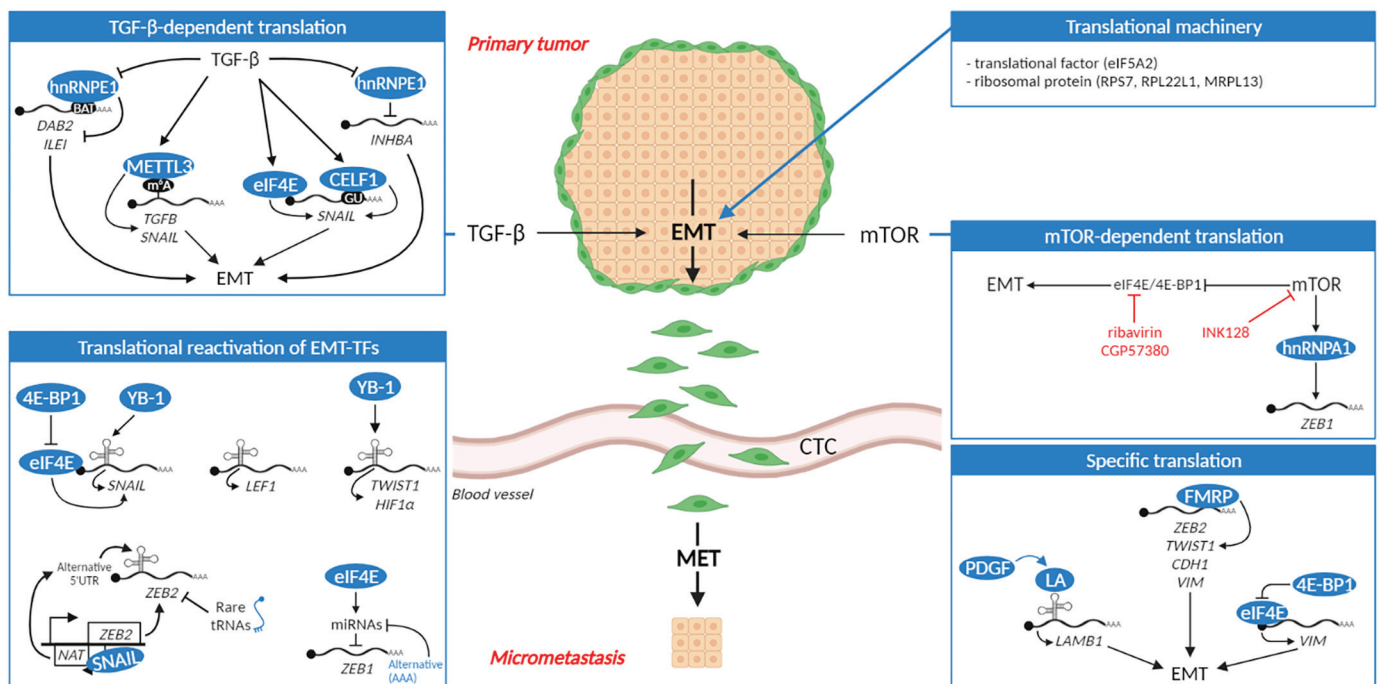


Fig. 3. Translational control and machinery as drivers of EMT-related cancer progression.

Type III EMT is essential for cancer, mainly for metastasis formation. Tumor epithelial cells (orange) transdifferentiate into peripheral mesenchymal cells (green) able to migrate and intravasate into blood vessels, becoming circulating tumor cells (CTCs), and extravasate at a distant site to form a micrometastasis by undergoing a mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Compared to other EMT types, numerous studies report a role of translational machinery and regulation in type III EMT (blue boxes). In addition to TGF- β -dependent translation, reactivation of EMT-TFs and EMT markers through specific translation have been described, mainly via Internal Ribosome Entry Site (IRES, symbolized by structured line). Moreover, involvement of mTOR signaling, the main regulator of cap-dependent translation, allows the identification of several drugs inhibiting EMT (red). Black circle, line and AAA tracks: schematic gene with its promoter; blue circle: protein; BAT: TGF- β -activated translation element; GU: guanine-uracil-rich region; m6A: N6-methyladenosine; tRNA: transfer RNA.

4.2. TGF- β , translation and cancer progression

As for type II EMT, TGF- β signaling promotes translational reprogramming during cancer progression [128]. Using polysome profiling, it appears that 18% of EMT-related genes are translationally regulated in response to TGF- β in the mouse cancerous Ep-H-RAS cellular model, including vimentin, collagen I or DAB2 [129]. Interestingly, comparison of polysome profiles from TGF- β -induced type II and III EMT highlighted specificities in the translated mRNAs that are enriched in mRNAs favoring metastasis formation such as the hypoxia-inducible transcription factor HIF1 α or members of the EGF family. These data suggest that the TGF- β -induced translational program can help in discriminating between type II and III EMT. Another polysome profiling performed in the serial xenografting of H-RAS overexpressing MCF10A cells identified a common GU-rich motif in the 3'UTR of TGF- β -translationally dysregulated mRNAs, included *SNAIL1* mRNA sequence [130]. In response to TGF- β , this GU-rich motif is bound by the CELF1 RBP which increases mRNA translation; this molecular mechanism fitting with the observation that CELF1 enhances formation of lung metastasis *in vivo* (Fig. 3).

In cancer development as in type II EMT, TGF- β controls translational elongation (Fig. 3). In breast adenocarcinoma MCF7 cells, TGF- β treatment induces the dissociation of hnRNPE1 from BAT elements of *DAB2* and *ILEI* mRNAs, thus enhancing their translation and EMT-related metastatic lesions *in vivo* [81]. Another target of the TGF- β /hnRNPE1 axis is inhibin β A (INHBA), which is overexpressed and associated with poor prognosis in breast cancer [131]. Indeed, TGF- β treatment or hnRNPE1 silencing promote translation of *INHBA*, which in turn increases cell proliferation, migration and invasiveness.

TGF- β -induced type III EMT also involves epitranscriptomics-related control of translation, a mechanism which has not yet been described in type II EMT. Epitranscriptomics corresponds to an emerging layer of gene expression based on chemical modifications of RNA that control their processing, stability and activity [132]. TGF- β treatment increases the level of N6-methyladenosine (m⁶A) in total mRNAs in both ovarian HeLa and liver HepG2 cancer cells [133]. In addition, TGF- β -induced EMT in cancerous ovarian HeLa cells is dependent on METTL3, a methyltransferase, whose depletion reduces cell migration and invasion *in vitro* and lung metastasis *in vivo* [133,134]. Modulation of METTL3 expression and activity shows that METTL3 chemically modifies EMT-related genes in a specific manner. *SNAIL1*, but not *ZEB2*, mRNA is m⁶A modified to promote its translation by favoring the binding of the elongation factor eEF2 [133]. TGF- β mRNA itself is post-transcriptionally modified by METTL3 to enhance its translation, this mechanism contributing to the TGF- β autocrine loop [134]. Similarly, the methyltransferase METTL3 increases *SNAIL1* mRNA translation and cell migration in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines [135]. These data support the essential role of translational reprogramming in TGF- β -induced EMT. Moreover, although it remains to be clearly addressed, these observations suggest that the distinct translation-associated mechanisms and EMT-related mRNA targets could help in depicting heterogeneity in TGF- β -induced type II and III EMT.

4.3. Translational reactivation of EMT-TFs

The strongest evidence for translational regulation as a direct actor of type III EMT relies on the various demonstrations of EMT-TF reactivation by specific translational mechanisms; this is well-illustrated by the Zeb1/Zeb2 family members (Table 1). First, increased translation in *ZEB1* mRNA has been suggested to contribute to chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) [136]. In mouse MiaPaCa-2 and Pt45P1 PDAC cells, gemcitabine reduces global protein synthesis although *ZEB1* mRNA translation is maintained due to the reliance on an alternative polyA mRNA form lacking a 3'UTR fragment enriched in miRNA binding sites (Fig. 3). Second, in a panel of lung cancer cell lines, translation of *ZEB2* but not of *ZEB1* mRNA is reduced by the presence of

rare triplets (i.e., Leu(UUA)-Gly(GGU)-Val(GUA)) resulting in translation pausing, likely in an environmental sequence-dependent manner [137]. Finally, *ZEB2* activation by Snail is dependent on translational regulation [138]. During Snail-induced EMT in colorectal cancer cells, a natural antisense RNA of *ZEB2* is synthesized (*ZEB2* NAT) that prevents elimination of IRES by alternative splicing of 5'UTR *ZEB2* mRNA and thus induces *ZEB2* mRNA translation. IRES are structures localized upstream but close to the AUG start site that recruits the small 40S:tRNAi either through direct interaction or through RBPs termed ITAFs (IRES-transactivating factors) and promote translational initiation, in particular in response to environmental stress [39] (Box 1).

In addition to *ZEB2*, reactivation by IRES-dependent translation in breast, sarcoma and colorectal cancer cell models has been described for the core EMT-TFs Snail, Slug and Twist1, as well as for additional TFs promoting type III EMT, such as LEF1 and HIF1A [139–141] (Fig. 3). Most of this IRES-dependent translation requires the presence of RBP YB-1; thus explaining the acquisition of type III EMT characteristics in YB-1 overexpressing cells [139]. Such an IRES-dependent translational mechanism has also been reported for the laminin B1 (*LAMB1*) mesenchymal marker during type III EMT in normal (MIM-1-4) and Ras-overexpressing (MIM-R) murine hepatocytes [142]. In this case, PDGF signal was shown to promote the accumulation of the RBP LA at the IRES of *LAMB1* mRNA which stimulates IRES-dependent translation [143,144] (Fig. 3). Other RBPs modulate translation of EMT markers through direct mRNA binding, such as FMRP, whose knock-down increases *CDH1* translation and decreases lung metastasis *in vivo* in mouse breast cancer 4T1 cell lines [145]. Another RBP corresponds to UNR, which enhances translational elongation of *VIM* mRNA in melanoma thus contributing to cell migration and invasion [146]. Overall, these findings support the notion that translation can be the primary event leading to EMT-TF reactivation and thus cancer progression (Table 1). Interestingly, a switch between cap- and IRES-dependent translation has been described during cancer initiation and progression, probably due to a change in composition of the translational machinery or in the RBP expression pattern [39,147–149]. Since IRES-dependent translation has not yet been described in type I and II EMT, this specific translational mechanism may be a specific molecular feature of type III EMT. Comparing IRES-dependent activity using bicistronic reporter assays encompassing 5'UTR of EMT-TFs in cellular models mimicking either types I, II and III EMT would fill this gap.

4.4. Translational machinery in EMT cancer progression

Similarly to type I EMT, some alteration in ribosome biogenesis and ribosomal proteins have been associated with EMT in cancer (Table 2). In HT29 colorectal cancer cells, the overexpression of GNL3 (or nucleostemin), a ribosome biogenesis factor, promote EMT by activating the Wnt signaling pathway, indicating that cancer progression may be mediated by altered ribosome biogenesis [150]. Regarding RPs, reduced expression of RPS7 in prostate PC3 cells, of RPL22L1 in a panel of ovarian cancer cells or of the mitochondrial MRPL13 ribosomal protein in breast cancer inhibits proliferation, migration and expression of mesenchymal proteins, such as N-cadherin, vimentin or Snail [151–153]. In addition, high expression of these RPs is associated with poor prognosis in the related cancer type. However, no molecular mechanism has been proposed and whether overexpression of these RPs triggers type III EMT through translation remains to be determined. Intriguingly, it has been reported that passive incorporation of purified bacterial ribosome particles in MCF7 cancer cells induces the formation of cell clusters characterized by an increased expression of both vimentin and Twist1 [154,155]. Whether this corresponds to a stress response or is a ribosome-associated effect remains unclear.

In addition to ribosomal proteins, type III EMT is linked to the initiation translation factor eIF5A2 (Table 2). eIF5A2 plays a key role in the formation of the activated small 40S ribosomal subunit by contributing to the interaction between the 40S and the eIF2-GTP:tRNAi [156]

(Box 1). First, eIF5A2 was reported to be overexpressed in several cancers, including in at least 50% of metastatic hepatocellular carcinoma (HCC) in a series of 45 HCC [157,158]. Second, overexpression of eIF5A2 promotes cell motility and invasion as well as a decrease in E-cadherin associated with an increase in vimentin and N-cadherin level in hepatocellular and colorectal cellular models, but also liver metastasis formation *in vivo* [157,159]. In contrast, eIF5A2 silencing increases E-cadherin and reduces vimentin protein level in non-small cell lung carcinoma cell models, as well as in estrogen-positive breast cancer HCC1937 cell lines [159,160]. Third, eIF5A2 contributes to cisplatin resistance in gastric cancer by promoting acquisition of mesenchymal characteristics [161]. Although these data support a role for eIF5A2 in type III EMT, both in metastatic formation and resistance to chemotherapy, neither the molecular mechanism by which eIF5A2 promotes type III EMT nor whether it corresponds to a translational-dependent or independent mechanism has been deciphered. These data and previous ones support an association between type III EMT and ribosome components or core initiation translational factors, although whether it involves translational control remains largely unknown.

4.5. mTOR/4E-BP1/eIF4E axis and therapies

The role of the mTOR signaling pathway in promoting type III EMT gained interest over the last few years (for reviews see [147,156]). It involves mTORC1 signaling, which phosphorylates 4E-BP1 thus inhibiting 4E-BP1/eIF4E and subsequently promoting eIF4G/eIF4E/cap-mRNA interaction and protein synthesis (Box 1). Growing data demonstrate that activation of mTORC1 contributes to metastasis through EMT (Table 2). It has been shown that decreased expression of the mTORC1 using shRNA strategy in HCT116 and SW480 colorectal cancer cell lines reduces the expression of the EMT-TFs *SNAI1* and *Twist1* and the mesenchymal marker vimentin that contribute to reducing cell migration and invasion, and *in vivo* metastatic formation [162]. In the same line, the interplay between β -catenin and the mTOR pathway favors extracellular matrix invasion of SW480 colorectal cancer cells, supporting a link between mTOR and type III EMT [163]. The role of mTOR signaling in type III EMT is sustained by the observation that reduced expression of the 4E-BP1 protein is associated with decreased expression of mesenchymal markers in breast and colorectal cancer cell lines while reduced expression of eIF4E or expression of mutant eIF4E have opposite effects in PDAC and MYC/RAS transformed mouse embryonic fibroblast (MEF) cell lines [77,164–166]. It has been proposed that mTORC1-induced type III EMT relies on translational reactivation of some EMT-TFs through 4E-BP1 and eIF4E [77,164]. For example, in response to mutant eIF4E overexpression, the level of polysome-associated *SNAI1* mRNA is decreased in c-MYC/H-RAS transformed MEFs [77].

The role of the mTOR/4E-BP1/eIF4E axis in metastatic formation through acquisition of EMT hallmarks is also derived from the use of pharmacological compounds, concomitantly offering a novel therapeutic opportunity. Despite advances in patient management and survival, some specific types of cancers remain highly aggressive, resistant or with high risk of relapse, especially those implicating EMT processes. In prostate cancer, the mTOR inhibitor INK128 reduces metastasis formation in a mouse model of pre-invasive prostate cancer, and inhibits vimentin at the protein but not mRNA level in a 4E-BP1- and eIF4E-dependent manner [167]. In addition, in chemoresistant epithelial ovarian cancer cell lines, inhibition of mTOR signaling by BEZ235, also a PI3K/AKT inhibitor, reverses the cisplatin-associated mesenchymal phenotype through MET and inhibits both colony formation and expression of cancer stem cell markers [168]. Inhibitors of eIF4E (*i.e.*, ribavirin) and of eIF4G (*i.e.*, 4EGI-1) also impair EMT-induced migration in non-small cell lung cancer and colorectal cell lines [164,169]. Moreover, activation of eIF4E is dependent on MAPK-interacting protein kinases (MNK), eIF4E phosphorylation inhibiting the 4E-BP1/eIF4E interaction [147]. In agreement with previous data, the production of

collagen by 5FU-resistant PDAC cells is reduced following treatment with the CGP57380 MNK inhibitor, likely through MET, as CGP57380 increases *CDH1* mRNA level but inhibits *VIM* mRNA level [165]. Interestingly, this study also shows that *ZEB1* mRNA translation is decreased in a hnRNPA1-dependent manner in response to MNK1 silencing, providing an additional molecular mechanism modulating translation of EMT-TFs (Table 1). These data support the notion that the mTOR/4E-BP1/eIF4E axis triggers type III EMT, at least in part by modulating specific translation of some EMT-TFs and mesenchymal markers, but also provides therapeutic strategies to target EMT in cancers (Table 2). Additional therapeutic opportunities may arise from additional targetable EMT features. First, Rao and colleagues reported that KSR1, a key scaffold protein of the RAF/MEK/ERK pathway, favors translation of EPSTI1 in colorectal cancer cells that promotes cell invasion and migration through EMT, suggesting that the ERK inhibitor may be a good candidate to target EMT [170]. Second, Feng and colleagues demonstrated that EMT is associated with activation of the PERK-eIF2 α axis to sustain the synthesis of secreted proteins by the endoplasmic reticulum (ER), explaining the high sensitivity of cancer cells with mesenchymal traits to ER stress [171]. Understanding translation-related processes in type III EMT may thus constitute a novel approach to developing EMT-related anti-cancer therapies.

In contrast to type I and II EMT, translational regulation has been extensively studied in type III EMT. Studying EMT-related cancer processes clearly demonstrates that reactivation of EMT-TFs by translational mechanisms drives EMT, highlighting translation not only as a consequence of EMT induction but also as a direct effector of type III EMT (Table 1). Moreover, some specificities in the translation/translational machinery and EMT-related cancer development have been identified in type III EMT, although this may result from the lack of data in physiological EMT-related processes. Studies dedicated to translational regulation in types I and II EMT, both from an *in vivo* and translational point of view, may help to decipher which process relies on canonical EMT involvement from the ones specific to cancer-related EMT. Nevertheless, these translational specificities might provide useful markers to identify EMT-related cancers that remain the most aggressive ones. Studying EMT-related cancers from the translation angle could reveal lead to the discovery of novel therapeutic approaches for limiting metastatic progression and resistance to therapy.

5. Perspectives

Since the late 2000s, the scientific community has gathered evidence demonstrating that translation and the translational machinery not only contribute but also trigger all types of EMT processes, this evidence increasing in number and strength from type I to III EMT. The fact that translational reactivation of core EMT-TFs or that modulation of core translational factors and ribosomal proteins are sufficient to initiate EMT sustains this emerging notion (Tables 1 and 2). How can translation help in decrypting EMT in the near future?

The current view is that transcription induces a shift in the expression of EMT markers that can be locked by epigenetic marks [3,172]. Because it is one of the last steps of gene expression, translation enables rapid adaptation to environmental changes, which is also a hallmark of EMT [39,173]. It is thus not surprising that translational activation of EMT-TFs or TGF- β -induced translational reprogramming foster rapid adaptation to microenvironmental changes during wound-healing and cancer progression. Additional embryonic EMT-related signaling pathways have been shown to promote translational reprogramming; though in non-related EMT processes, including Hedgehog or FGF, indicative of a more general process [174,175]. Moreover, EMT translational reprogramming is mainly characterized by the remodeling of both transcriptional regulators and RBP expression patterns, suggesting that translation directly contributes to shaping particular transcriptional reprogramming, as well as to providing the necessary RBPs to efficiently translate this new transcriptome. This coordination in transcription and

translation has already been described for key transcription factors such as p53 [176,177]. Having gained insights in translational and epigenetic events (e.g., METTL3 methyltransferase, miRNAs) [178], and the role of translation in regulating well-known EMT loops, (e.g., EMT-TFs cross-talks and autocrine activation of TGF- β), we can hypothesize a role for translational regulation in establishment of epigenetic modifications. During complete or intermediate EMT, translation might be the initial but transient event that pushes and coordinates a more profound transcriptional reprogramming that is locked at persistent states through epigenetic marks. Thus, investigating EMT, whichever the type, through an integrated multi-omics approach will be key to drawing novel hypotheses regarding the dynamics of EMT.

Such studies will also help to fully capture the heterogeneity of EMT programs. It is well illustrated by specificity in translational machinery and mechanisms in EMT, for instance through differences observed in TGF- β -induced translational machinery in type II and III EMT; specificity in the 40S-associated eIFs (i.e., eIF2B in type I EMT; eIF3 in type II EMT; and eIF5A2 in type III EMT); or specific translational mechanism allowing to discriminate particular EMT-TFs (i.e., m⁶A in *SNAIL1* but not *ZEB2*; rare codon in *ZEB1* but not *ZEB2*) or type III EMT from others (i.e., IRES- and m⁶A-controlled translation in type III). However, since a majority of EMT-related translational mechanisms stem from the study of cancer cells, whether these differences are real or biased remains to be deciphered. Interestingly in adults, translation at the endoplasmic reticulum membrane is key to sustaining the secretion of proteins by mesenchymal cells. Localized translation may thus also be a determining factor in the origin of mesenchymal cells, since predisposition of epithelial cells to entering an EMT might be dependent on their ability to translate within some particular sub-cellular compartments. This view might also offer novel hypotheses in type I EMT, owing to the importance of localized translation in embryo formation.

In addition to providing additional molecular traits to improve our understanding of EMT, translation and the translational machinery provide an ideal basis to target EMT-related diseases. Not only do inhibitors of mTOR impede EMT-induced metastatic formation in cancer, but also inhibition of ribosome biogenesis using novel anti-RNA Pol I drugs may be of interest in fibrosis-related diseases. Exploring translation and the translational machinery will undoubtedly provide major breakthroughs in the field of EMT in the near future.

Author contributions

Conceptualization, V.M.; writing-original draft preparation, C.M., V.M.; intellectual contribution, C.M., C.M.L., H.C.M., J.-J.D., V.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by ITMO Cancer, grant number 20CN063-00 (REMOTE); by INCa, grant number 2019-138 (MARACAS); and by Ligue Nationale Contre le Cancer, grant “Enfants Adolescents Cancer 2020” (Rhabdorigin) and PPE-2021 (sMETHY). C.M. was PhD fellow from Ligue Nationale Contre le Cancer.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Brigitte Manship for English editing.

References

- [1] M.A. Nieto, R.Y.Y.J. Huang, R.A.A. Jackson, J.P.P. Thiery, EMT: 2016, *Cell* 166 (2016) 21–45, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.

- [2] R. Kalluri, R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1420–1428, <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- [3] J. Yang, P. Antin, G. Berx, C. Blanpain, T. Brabletz, M. Bronner, K. Campbell, A. Cano, J. Casanova, G. Christofori, S. Dedhar, R. Derynck, H.L. Ford, J. Fuxe, A. Garcia de Herreros, G.J. Goodall, A.-K. Hadjantonakis, R.J.Y. Huang, C. Kalchauer, R. Kalluri, Y. Kang, Y. Khew-Goodall, H. Levine, J. Liu, G. D. Longmore, S.A. Mani, J. Massagué, R. Mayor, D. McClay, K.E. Mostov, D. F. Newgreen, M.A. Nieto, A. Puisieux, R. Runyan, P. Savagner, B. Stanger, M. P. Stemmler, Y. Takahashi, M. Takeichi, E. Theveneau, J.P. Thiery, E. W. Thompson, R.A. Weinberg, E.D. Williams, J. Xing, B.P. Zhou, G. Sheng, Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 341–352, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.
- [4] J. Yang, R.A. Weinberg, Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis, *Dev. Cell* 14 (2008) 818–829, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009>.
- [5] T. Chen, Y. You, H. Jiang, Z.Z. Wang, Epithelial–mesenchymal transition (EMT): a biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis, *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 3261–3272, <https://doi.org/10.1002/jcp.25797>.
- [6] J. Espada, H. Peinado, L. Lopez-Serra, F. Setién, P. Lopez-Serra, A. Portela, J. Renart, E. Carrasco, M. Calvo, A. Juarroz, A. Cano, M. Esteller, Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 9194–9205, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr658>.
- [7] M. Lu, M.K. Jolly, H. Levine, J.N. Onuchic, E. Ben-Jacob, MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 18144–18149, <https://doi.org/10.1073/pnas.1318192110/-DCSUPPLEMENTAL>.
- [8] T. Hong, K. Watanabe, C.H. Ta, A. Villarreal-Ponce, Q. Nie, X. Dai, An Ovol2-Zeb1 mutual inhibitory circuit governs bidirectional and multi-step transition between epithelial and mesenchymal states, *PLoS Comput. Biol.* 11 (2015), <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBL1004569>.
- [9] X.J. Tian, H. Zhang, J. Xing, Coupled reversible and irreversible bistable switches underlying TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition, *Biophys. J.* 105 (2013) 1079, <https://doi.org/10.1016/J.BJP.2013.07.011>.
- [10] S.N. Steinway, J.G.T. Zaňudo, P.J. Michel, D.J. Feith, T.P. Loughran, R. Albert, Combinatorial interventions inhibit TGF β -driven epithelial-to-mesenchymal transition and support hybrid cellular phenotypes, *NPJ Syst. Biol. Appl.* 1 (2015) 15014, <https://doi.org/10.1038/NPJSBA.2015.14>.
- [11] S.J. Serrano-Gomez, M. Mazivey, S.K. Alahari, Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications, *Mol. Cancer* 15 (2016), <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0502-x>.
- [12] W.L. Tam, R.A. Weinberg, The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer, *Nat. Med.* 19 (2013) 1438–1449, <https://doi.org/10.1038/nm.3336>.
- [13] B. De Craene, G. Berx, Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression, *Nat. Rev. Cancer* 13 (2013) 97–110, <https://doi.org/10.1038/nrc3447>.
- [14] C. Moyret-Lalle, E. Ruiz, A. Puisieux, Epithelial-mesenchymal transition transcription factors and miRNAs: “Plastic surgeons” of breast cancer, *World J. Clin. Oncol.* 5 (2014) 311, <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.311>.
- [15] T. Tebaldi, A. Re, G. Viero, I. Pegoretti, A. Passerini, E. Blanzieri, A. Quattrone, Widespread uncoupling between transcriptome and translational variations after stimulus in mammalian cells, *BMC Genomics* 13 (2012) 220, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-220>.
- [16] J.P. Thiery, H. Acloque, R.Y.J. Huang, M.A. Nieto, Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell* 139 (2009) 871–890, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- [17] D. Kim, T. Xing, Z. Yang, R. Dudek, Q. Lu, Y.-H. Chen, Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview, *J. Clin. Med.* 7 (2017) 1, <https://doi.org/10.3390/jcm7010001>.
- [18] Y.S. Kim, B.R. Yi, N.H. Kim, K.C. Choi, Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells, *Exp. Mol. Med.* 46 (2014), e108, <https://doi.org/10.1038/emm.2014.44>.
- [19] Y. Nakajima, T. Yamagishi, S. Hokari, H. Nakamura, Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)- β and bone morphogenetic protein (BMP), *Anat. Rec.* 258 (2000) 119–127, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000201\)258:2<119::AID-ARI>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<119::AID-ARI>3.0.CO;2-U).
- [20] D.M. Gonzalez, D. Medici, Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Sci. Signal.* 7 (2014) re8, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>.
- [21] A. Gheldof, G. Berx, Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition, in: *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, Elsevier B.V., 2013, pp. 317–336, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5>.
- [22] M.L. Matos, L. Lapyckij, M. Rosso, M.J. Besso, M.V. Mencucci, C.I.M. Briggiler, S. Giustina, L.I. Furlong, M.H. Vazquez-Levin, Identification of a novel human E-cadherin splice variant and assessment of its effects upon EMT-related events, *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 1368–1386, <https://doi.org/10.1002/jcp.25622>.
- [23] H. Oda, S. Tsukita, M. Takeichi, Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during drosophila gastrulation, *Dev. Biol.* 203 (1998) 435–450, <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9047>.
- [24] M. Chekulaeva, M.W. Hentze, A. Ephrussi, Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles, *Cell* 124 (2006) 521–533, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.031>.

- [25] F. Besse, A. Ephrussi, Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 971–980, <https://doi.org/10.1038/nrm2548>.
- [26] M.S. Carmel, N. Kahane, F. Oberman, R. Miloslavski, D. Sela-Donenfeld, C. Kalcheim, J.K. Yisraeli, A novel role for VICKZ proteins in maintaining epithelial integrity during embryogenesis, *PLoS One* 10 (2015), e0136408, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136408>.
- [27] Y. Blech-Hermoni, A.N. Ladd, RNA binding proteins in the regulation of heart development, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 2467–2478, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.008>.
- [28] A.N. Ladd, New insights into the role of RNA-binding proteins in the regulation of heart development, in: *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, Elsevier Inc, 2016, pp. 125–185, <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.12.009>.
- [29] A.J. Durston, H.J. Jansen, S.A. Wacker, Review: time-space translation regulates trunk axial patterning in the early vertebrate embryo, *Genomics* 95 (2010) 250–255, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.11.002>.
- [30] N.D. Venezia, A. Vincent, V. Marcel, F. Catez, J.J. Diaz, Emerging role of eukaryote ribosomes in translational control, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1226, <https://doi.org/10.3390/ijms20051226>.
- [31] N.R. Genuth, M. Barna, Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms, *Nat. Rev. Genet.* 19 (2018) 431–452, <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0008-z>.
- [32] N. Kondrashov, A. Pusic, C.R. Stumpf, K. Shimizu, A.C. Hsieh, S. Xue, J. Ishijima, T. Shiroishi, M. Barna, Ribosome-mediated specificity in hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning, *Cell* 145 (2011) 383–397, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.028>.
- [33] S. Xue, S. Tian, K. Fujii, W. Kladwang, R. Das, M. Barna, RNA regulons in hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation, *Nature* 517 (2015) 33–38, <https://doi.org/10.1038/nature14010>.
- [34] Z. Shi, M. Barna, Translating the genome in time and space: specialized ribosomes, RNA regulons, and RNA-binding proteins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31 (2015) 31–54, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125346>.
- [35] H.T. Gazda, M.R. Sheen, A. Vlachos, V. Choesmel, M.F. O'Donohue, H. Schneider, N. Darras, C. Hasman, C.A. Sieff, P.E. Newburger, S.E. Ball, E. Niewiadomska, M. Matsyjak, J.M. Zaucha, B. Glader, C. Niemeyer, J.J. Meerpohl, E. Atsidaftos, J. M. Lipton, P.E. Gleizes, A.H. Beggs, Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in diamond-blackfan anemia patients, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2008) 769–780, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.004>.
- [36] T. Tang, K. Rector, C.D. Barnett, C.D. Mao, Upstream open reading frames regulate the expression of the nuclear Wnt13 isoforms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366 (2008) 1081–1088, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.092>.
- [37] L.D.J. Zakin, S. Mazan, M. Maury, N. Martin, J.L. Guénet, P. Brûlet, Structure and expression of Wnt13, a novel mouse Wnt2 related gene, *Mech. Dev.* 73 (1998) 107–116, [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00040-9).
- [38] I.T. Struewing, A. Toborek, C.D. Mao, Mitochondrial and nuclear forms of Wnt13 are generated via alternative promoters, alternative RNA splicing, and alternative translation start sites, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7282–7293, <https://doi.org/10.1074/jbc.M51182200>.
- [39] M.L. Truitt, D. Ruggero, New frontiers in translational control of the cancer genome, *Nat. Rev. Cancer* 16 (2016) 288–304, <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.27>.
- [40] K.E.N. Watt, P.A. Trainor, Neurocristopathies. The etiology and pathogenesis of disorders arising from defects in neural crest cell development, in: *Neural Crest Cells Evol. Dev. Dis.*, Elsevier Inc., 2014, pp. 361–394, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401730-6.00018-1>.
- [41] G.A. Vega-Lopez, S. Cerrizuela, C. Tribulo, M.J. Aybar, Neurocristopathies: new insights 150 years after the neural crest discovery, *Dev. Biol.* 444 (2018) S110–S143, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.05.013>.
- [42] M.R. Carpinelli, M.E. De Vries, A. Auden, T. Butt, Z. Deng, D.D. Partridge, L. B. Miles, S.R. Georgy, J.J. Haigh, C. Darido, S. Brabletz, T. Brabletz, M. P. Stemmler, S. Dworkin, S.M. Jane, Inactivation of Zeb1 in GRHL2-deficient mouse embryos rescues mid-gestation viability and secondary palate closure, *DMM Dis. Model. Mech.* 13 (2020), <https://doi.org/10.1242/dmm.042218>.
- [43] Y. Zhou, N. Koelling, A.L. Fenwick, S.J. McGowan, E. Calpena, S.A. Wall, S. F. Smithson, A.O.M. Wilkie, S.R.F. Twigg, Disruption of TWIST1 translation by 5' UTR variants in saethre-chotzen syndrome, *Hum. Mutat.* 39 (2018) 1360–1365, <https://doi.org/10.1002/humu.23598>.
- [44] E. Falletta, L. Sanchez-del-Campo, J. Chauhan, M. Effer, A. Kenyon, C. J. Kershaw, R. Siddaway, R. Lisle, R. Freter, M.J. Daniels, X. Lu, T. Tüting, M. Middleton, F.M. Buffa, A.E. Willis, G. Pavitt, Z.A. Ronai, T. Sauka-Spengler, M. Hölzel, C.R. Goding, Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma, *Genes Dev.* 31 (2017) 18–33, <https://doi.org/10.1101/gad.290940.116>.
- [45] A.P. Ross, K.S. Zarbalis, The emerging roles of ribosome biogenesis in craniofacial development, *Front. Physiol.* 5 (FEB) (2014) 26, <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00026>.
- [46] E.W. Mills, R. Green, Ribosomopathies: there's strength in numbers, *Science* (80-) 358 (2017), <https://doi.org/10.1126/science.aan2755>.
- [47] G.C. Tiu, C.H. Kerr, C.M. Forester, P.S. Krishnarao, H.D. Rosenblatt, N. Raj, T. C. Lantz, O. Zhulyn, M.E. Bowen, L. Shokat, L.D. Attardi, D. Ruggero, M. Barna, A p53-dependent translational program directs tissue-selective phenotypes in a model of ribosomopathies, *Dev. Cell* 56 (2021) 2089–2102.e11, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.06.013>.
- [48] Z. Shi, K. Fujii, K.M. Kovary, N.R. Genuth, H.L. Röst, M.N. Teruel, M. Barna, Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide, *Mol. Cell* 67 (2017) 71–83, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>, e7.
- [49] S. Xue, M. Barna, Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 355–369, <https://doi.org/10.1038/nrm3359>.
- [50] J.-Y. Chen, X. Tan, Z.-H. Wang, Y.-Z. Liu, J.-F. Zhou, X.-Z. Rong, L. Lu, Y. Li, The ribosome biogenesis protein Esf1 is essential for pharyngeal cartilage formation in zebrafish, *FEBS J.* 285 (2018) 3464–3484, <https://doi.org/10.1111/FEBS.14622>.
- [51] T.N. Willig, N. Drapchinskaia, I. Dianzani, S. Ball, C. Niemeyer, U. Ramenghi, K. Orfali, P. Gustavsson, E. Garelli, A. Brusco, C. Tiemann, J.L. Pérignon, C. Bouchier, L. Cicchiello, N. Dahl, N. Mohandas, G. Tchernia, Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression, *Blood* 94 (1999) 4294–4306, <https://doi.org/10.1182/blood.V94.12.4294>.
- [52] J.G. Dauwerse, J. Dixon, S. Seland, C.A.L. Ruivenkamp, A. Van Haeringen, L. H. Hoefsloot, D.J.M. Peters, A.C. De Boers, C. Daumer-Haas, R. Maiwald, C. Zweier, B. Kerr, A.M. Cobo, J.F. Toral, A.J.M. Hoogeboom, D.R. Lohmann, U. Hehr, M.J. Dixon, M.H. Breuning, D. Wiczorek, Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerase I and III cause treacher Collins syndrome, *Nat. Genet.* 43 (2011) 20–22, <https://doi.org/10.1038/ng.724>.
- [53] A. Werner, S. Iwasaki, C.A. McGourty, S. Medina-Ruiz, N. Teerikorpi, I. Fedrigo, N.T. Ingolia, M. Rape, Cell-fate determination by ubiquitin-dependent regulation of translation, *Nature* 525 (2015) 523–527, <https://doi.org/10.1038/nature14978>.
- [54] J. Dixon, N.C. Jones, L.L. Sandell, S.M. Jayasinghe, J. Crane, J.P. Rey, M.J. Dixon, P.A. Trainor, Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13403–13408, <https://doi.org/10.1073/pnas.0603730103>.
- [55] V. Prakash, B.B. Carson, J.M. Feenstra, R.A. Dass, P. Sekyrova, A. Hoshino, J. Petersen, Y. Guo, M.M. Parks, C.M. Kurylo, J.E. Batchelder, K. Haller, A. Hashimoto, H. Rundqvist, J.S. Condeelis, C.D. Allis, D. Drygin, M.A. Nieto, M. Andäng, P. Percipalle, J. Bergh, I. Adameyko, A.K.Ö. Farrants, J. Hartman, D. Lyden, K. Pietras, S.C. Blanchard, C.T. Vincent, Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease, *Nat. Commun.* 10 (2019) 18, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10100-8>.
- [56] M. Gabut, F. Bourdelais, S. Durand, Ribosome and translational control in stem cells, *Cells* 9 (2020) 497, <https://doi.org/10.3390/cells9020497>.
- [57] J. Hansson, M.R. Rafiee, S. Reiland, J.M. Polo, J. Gehring, S. Okawa, W. Huber, K. Hochedlinger, J. Krijgsvelde, Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency, *Cell Rep.* 2 (2012) 1579–1592, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.014>.
- [58] J.A. Saba, K. Liakath-Ali, R. Green, F.M. Watt, Translational control of stem cell function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22 (2021) 671–690, <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00386-2>.
- [59] M. Guarino, A. Tosoni, M. Nebuloni, Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition, *Hum. Pathol.* 40 (2009) 1365–1376, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.02.020>.
- [60] R. Kalluri, E.G. Neilson, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1776–1784, <https://doi.org/10.1172/jci20530>.
- [61] E.M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg, A.L. Dorfman, J.R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W.T. Pu, A.B. Roberts, E.G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo, R. Kalluri, Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis, *Nat. Med.* 13 (2007) 952–961, <https://doi.org/10.1038/nm1613>.
- [62] T.E. Quan, S.E. Cowper, R. Bucala, The role of circulating fibrocytes in fibrosis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 8 (2006) 145–150, <https://doi.org/10.1007/s11926-006-0055-x>.
- [63] B.C. Willis, R.M. DuBois, Z. Borok, Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3 (2006) 377–382, <https://doi.org/10.1513/pats.200601-004TK>.
- [64] M. Iwano, D. Plieth, T.M. Danoff, C. Xue, H. Okada, E.G. Neilson, Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 341–350, <https://doi.org/10.1172/jci15518>.
- [65] R. Abe, S.C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala, C.N. Metz, Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites, *J. Immunol.* 166 (2001) 7556–7562, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7556>.
- [66] T.A. Wynn, Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *J. Pathol.* 214 (2008) 199–210, <https://doi.org/10.1002/path.2277>.
- [67] J. Kryczka, J. Boncela, Proteases revisited: roles and therapeutic implications in fibrosis, *Mediat. Inflamm.* 2017 (2017) 12–18, <https://doi.org/10.1155/2017/2570154>.
- [68] D.C. Radisky, P.A. Kenny, M.J. Bissell, Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell. Biochem.* 101 (2007) 830–839, <https://doi.org/10.1002/jcb.21186>.
- [69] A. Boutet, C.A. De Frutos, P.H. Maxwell, M.J. Mayol, J. Romero, M.A. Nieto, Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney, *EMBO J.* 25 (2006) 5603–5613, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601421>.
- [70] H.L. Chua, P. Bhat-Nakshatri, S.E. Clare, A. Morimiya, S. Badve, H. Nakshatri, NF-κB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2, *Oncogene* 26 (2007) 711–724, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209808>.
- [71] J. Yang, S.A. Mani, J.L. Donaher, S. Ramaswamy, R.A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson, R.A. Weinberg, Twist, a master regulator

- of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis, *Cell* 117 (2004) 927–939, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>.
- [72] S. Zhou, X. Yin, M. Mayr, M. Noor, P.J. Hylands, Q. Xu, Proteomic landscape of TGF- β -induced fibrogenesis in renal fibroblasts, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–17, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75989-4>.
- [73] R. Guo, Y. Lv, Y. Ouyang, S. Liu, D. Li, The role of miR-497/EIF3A Axis in TGF β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix in rat alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts, *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 3401–3408, <https://doi.org/10.1002/jcb.25997>.
- [74] X.W. Li, Y.H. Wu, X.H. Li, D. Li, J. Du, C.P. Hu, Y.J. Li, Role of eukaryotic translation initiation factor 3a in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Eur. J. Pharmacol.* 749 (2015) 89–97, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.004>.
- [75] G. Desnoyers, L.D. Frost, L. Courteau, M.L. Wall, S.M. Lewis, Decreased eIF3e expression can mediate epithelial-to-mesenchymal transition through activation of the TGF β signaling pathway, *Mol. Cancer Res.* 13 (2015) 1421–1430, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0645>.
- [76] L.D. Gillis, S.M. Lewis, Decreased eIF3e/Int6 expression causes epithelial-to-mesenchymal transition in breast epithelial cells, *Oncogene* 32 (2013) 3598–3605, <https://doi.org/10.1038/onc.2012.371>.
- [77] N. Robichaud, S.V. Del Rincon, B. Huor, T. Alain, L.A. Petruccielli, J. Hearnden, C. Goncalves, S. Grotegut, C.H. Spruck, L. Furic, O. Larsson, W.J. Muller, W. H. Miller, N. Sonenberg, Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3, *Oncogene* 34 (2014) 2032–2042, <https://doi.org/10.1038/onc.2014.146>.
- [78] K.A. Smith, B. Zhou, S. Avdulov, A. Benyumov, M. Peterson, Y. Liu, A. Okon, P. Hergert, J. Braziunas, C.R. Wagner, Z. Borok, P.B. Bitterman, Transforming growth factor- β 1 induced epithelial mesenchymal transition is blocked by a chemical antagonist of translation factor eIF4E, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1038/srep18233>.
- [79] S. Chothani, S. Schäfer, E. Adami, S. Viswanathan, A.A. Widjaja, S.R. Langley, J. Tan, M. Wang, N.M. Quaife, C. Jian Pua, G. D'Agostino, S. Guna Shekaran, B. L. George, S. Lim, E. Yiqun Cao, S. van Heesch, F. Witte, L.E. Felkin, E. G. Christodoulou, J. Dong, S. Blachut, G. Patone, P.J.R. Barton, N. Hubner, S. A. Cook, O.J.L. Rackham, Widespread translational control of fibrosis in the human heart by RNA-binding proteins, *Circulation* 140 (2019) 937–951, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039596>.
- [80] A. Chaudhury, G.S. Hussey, P.S. Ray, G. Jin, P.L. Fox, P.H. Howe, TGF- β -mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 286–293, <https://doi.org/10.1038/ncb2029>.
- [81] G.S. Hussey, A. Chaudhury, A.E. Dawson, D.J. Lindner, C.R. Knudsen, M.C. J. Wilce, W.C. Merrick, P.H. Howe, Identification of an mRNP complex regulating tumorigenesis at the translational elongation step, *Mol. Cell* 41 (2011) 419–431, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.003>.
- [82] O. Larsson, D. Diebold, D. Fan, M. Peterson, R.S. Nho, P.B. Bitterman, C.A. Henke, Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control, *PLoS One* 3 (2008), e3220, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003220>.
- [83] Y. Zhang, B. Stefanovic, LARP6 meets collagen mRNA: specific regulation of type I collagen expression, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 419, <https://doi.org/10.3390/ijms17030419>.
- [84] B. Stefanovic, C. Hellerbrand, M. Holcik, M. Briendl, S.A. Liebhaber, D. A. Brenner, Post-transcriptional regulation of collagen alpha 1(I) mRNA in hepatic stellate cells, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 17 (1997) 212–214, <https://doi.org/10.1128/mcb.17.9.5201>.
- [85] A.A. Challa, B. Stefanovic, A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs, *Mol. Cell. Biol.* 31 (2011) 3773–3789, <https://doi.org/10.1128/mcb.05263-11>.
- [86] B. Stefanovic, L. Stefanovic, B. Schnabl, R. Bataller, D.A. Brenner, TRAM2 protein interacts with endoplasmic reticulum Ca2+ pump Serca2b and is necessary for collagen type I synthesis, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 1758–1768, <https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1758-1768.2004>.
- [87] L. Stefanovic, L. Longo, Y. Zhang, B. Stefanovic, Characterization of binding of LARP6 to the 5' stem-loop of collagen mRNAs: implications for synthesis of type I collagen, *RNA Biol.* 11 (2014) 1386–1401, <https://doi.org/10.1080/15476286.2014.996467>.
- [88] Z. Manojlovic, B. Stefanovic, A novel role of RNA helicase a in regulation of translation of type I collagen mRNAs, *RNA* 18 (2012) 321–334, <https://doi.org/10.1261/rna.030288.111>.
- [89] Y.T. Lai, H.W. Chao, A.C.Y. Lai, S.H. Lin, Y.J. Chang, Y.S. Huang, CPEB2-activated PDGFR α mRNA translation contributes to myofibroblast proliferation and pulmonary alveologenesis, *J. Biomed. Sci.* 27 (2020) 52, <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00643-0>.
- [90] T. Pan, Modifications and functional genomics of human transfer RNA, *Cell Res.* 28 (2018) 395–404, <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0013-y>.
- [91] J. Wu, K.C.V. Subbaiah, L.H. Xie, F. Jiang, E.S. Khor, D. Mickelsen, J.R. Myers, W. H.W. Tang, P. Yao, Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase regulates proline-rich profibrotic protein synthesis during cardiac fibrosis, *Circ. Res.* (2020) 827–846, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315999>.
- [92] I. Grgic, A.M. Krautzberger, A. Hofmeister, M. Lalli, D.P. DiRocco, S.V. Fleig, J. Liu, J.S. Duffield, A.P. McMahon, B. Aronow, B.D. Humphreys, Translational profiles of medullary myofibroblasts during kidney fibrosis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 (2014) 1979–1990, <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101143>.
- [93] X. Xu, H. Feng, C. Dai, W. Lu, J. Zhang, X. Guo, Q. Yin, J. Wang, X. Cui, F. Jiang, Therapeutic efficacy of the novel selective RNA polymerase I inhibitor CX-5461 on pulmonary arterial hypertension and associated vascular remodelling, *Br. J. Pharmacol.* 178 (2021) 1605–1619, <https://doi.org/10.1111/BPH.15385>.
- [94] S. Pang, Y. Chen, C. Dai, T. Liu, W. Zhang, J. Wang, X. Cui, X. Guo, F. Jiang, Anti-fibrotic effects of p53 activation induced by RNA polymerase I inhibitor in primary cardiac fibroblasts, *Eur. J. Pharmacol.* 907 (2021), 174303, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174303>.
- [95] J. Baßler, E. Hurt, Eukaryotic ribosome assembly, *Annu. Rev. Biochem.* 88 (2019) 281–306, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110817>.
- [96] E. Wielosz, M. Dryglewska, M. Majdan, Clinical consequences of the presence of anti-RNA pol III antibodies in systemic sclerosis, *Adv. Dermatol. Allergol.* 37 (2020) 909, <https://doi.org/10.5114/ADA.2020.102107>.
- [97] L. Maes, D. Blockmans, P. Verschueren, R. Westhovens, K. Op De Beéck, P. Vermeersch, K. Van den Bergh, R.W. Burlingame, M. Mahler, X. Bossuyt, Anti-PM/Sci-100 and anti-RNA-polymerase III antibodies in scleroderma, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 965–971, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.03.018>.
- [98] M. Yeganeh, N. Hernandez, RNA polymerase III transcription as a disease factor, *Genes Dev.* 34 (2020) 865, <https://doi.org/10.1101/GAD.333989.119>.
- [99] M. Benyelles, M.F. O'Donohue, L. Kermasson, E. Lainey, R. Borie, C. Lagresle-Peyrou, H. Nunes, C. Cazelles, C. Fourrage, E. Ollivier, A. Marçais, A.S. Gamez, F. Morice-Picard, D. Caillaud, N. Pottier, C. Ménard, I. Ba, A. Fernandes, B. Crestani, J.P. De Villartay, P.E. Gleizes, I. Callebaut, C. Kannengiesser, P. Revy, NHP2 deficiency impairs rRNA biogenesis and causes pulmonary fibrosis and Hoyeraal-hreidarsson syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 29 (2020) 907–922, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa011>.
- [100] E.F. Freed, J.L. Prieto, K.L. McCann, B. McStay, S.J. Baserga, NOL11, implicated in the pathogenesis of north american indian childhood cirrhosis, is required for pre-rRNA transcription and processing, *PLoS Genet.* 8 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002892>.
- [101] E.F. Freed, S.J. Baserga, The C-terminus of Utp4, mutated in childhood cirrhosis, is essential for ribosome biogenesis, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 4798–4806, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq185>.
- [102] R.B. Thoroldsdottir, G. Sveinbjornsson, P. Sulem, J.B. Nielsen, S. Jonsson, G. H. Halldorsson, P. Melsted, E.V. Ivarsdottir, O.B. Davidsson, R.P. Kristjansson, G. Thorleifsson, A. Helgadóttir, S. Gretarsdóttir, G. Norddahl, S. Rajamani, B. Torfason, A.S. Valgardsson, J.T. Sverrisson, V. Tragante, O.L. Holmen, F. W. Asselbergs, D.M. Roden, D. Darbar, T.R. Pedersen, M.S. Sabatine, C.J. Willer, M.-L. Løchen, B.V. Halldorsson, I. Jonsson, K. Hveem, D.O. Arnar, U. Thorsteinsdóttir, D.F. Gudbjartsson, H. Holm, K. Stefansson, Coding variants in RPL3L and MYZAP increase risk of atrial fibrillation, *Commun. Biol.* 1 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0068-9>.
- [103] W.-H. Xu, H.-G. Hu, Y. Tian, S.-Z. Wang, J. Li, J.-Z. Li, X. Deng, H. Qian, L. Qiu, Z.-L. Hu, Q.-Y. Wu, Y.-F. Chai, C. Guo, W.-F. Xie, J.-P. Zhang, Bioactive compound reveals a novel function for ribosomal protein S5 in hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis, *Hepatology* 60 (2014) 648–660, <https://doi.org/10.1002/hep.27138>.
- [104] C.N. Matragkou, H. Papachristou, Z. Karetsov, G. Papadopoulos, T. Papamarcaki, I.S. Vizirianakis, A.S. Tsiftoglou, T. Choli-Papadopoulou, On the intracellular trafficking of mouse S5 ribosomal protein from cytoplasm to nucleoli, *J. Mol. Biol.* 392 (2009) 1192–1204, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.049>.
- [105] C.N. Matragkou, E.T. Papachristou, S.S. Tezias, A.S. Tsiftoglou, T. Choli-Papadopoulou, I.S. Vizirianakis, The potential role of ribosomal protein S5 on cell cycle arrest and initiation of murine erythroleukemia cell differentiation, *J. Cell. Biochem.* 104 (2008) 1477–1490, <https://doi.org/10.1002/jcb.21722>.
- [106] I.S. Vizirianakis, E.T. Papachristou, P. Andreadis, E. Zopounidou, C.N. Matragkou, A.S. Tsiftoglou, Genetic manipulation of RPS5 gene expression modulates the initiation of commitment of MEL cells to erythroid maturation: implications in understanding ribosomopathies, *Int. J. Oncol.* 47 (2015) 303–314, <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3017>.
- [107] K.T. Ferguson, E.E. Torr, K. Bernau, J. Leet, D. Sherris, N. Sandbo, The novel mTOR complex 1/2 inhibitor P529 inhibits human lung myofibroblast differentiation, *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 2241–2249, <https://doi.org/10.1002/jcb.25878>.
- [108] C.E. Winbanks, L. Grimwood, A. Gasser, I.A. Darby, T.D. Hewitson, G.J. Becker, Role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR pathways in the regulation of renal fibroblast function and differentiation, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 206–219, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.08.004>.
- [109] T. Iwayama, C. Steele, L. Yao, M.G. Dozmorov, D. Karamichos, J.D. Wren, L. E. Olson, PDGFR α signaling drives adipose tissue fibrosis by targeting progenitor cell plasticity, *Genes Dev.* 29 (2015) 1106–1119, <https://doi.org/10.1101/gad.260554.115>.
- [110] J. Ge, H. Cui, N. Xie, S. Banerjee, S. Guo, S. Dubey, S. Barnes, G. Liu, Glutaminolysis promotes collagen translation and stability via α -ketoglutarate-mediated mTOR activation and proline hydroxylation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58 (2018) 378–390, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-02380C>.
- [111] B. Mazumder, X. Li, S. Barik, Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response, *J. Immunol.* 184 (2010) 3311–3319, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903778>.
- [112] M. Liu, P. Peng, J. Wang, L. Wang, F. Duan, D. Jia, Y. Ruan, J. Gu, RACK1-mediated translation control promotes liver fibrogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 255–261, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.040>.
- [113] A. Dongre, R.A. Weinberg, New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20 (2019) 69–84, <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- [114] U.H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner, W. Birchmeier, E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of

- human carcinoma cells, *J. Cell Biol.* 113 (1991) 173–185, <https://doi.org/10.1083/jcb.113.1.173>.
- [115] K. Vlemminckx, L. Vakaet, M. Mareel, W. Fiers, F. Van Roy, Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role, *Cell* 66 (1991) 107–119, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90143-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90143-M).
- [116] A.K. Perl, P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, G. Christofori, A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma, *Nature* 392 (1998) 190–193, <https://doi.org/10.1038/32433>.
- [117] M. Oft, K.H. Heider, H. Beug, TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis, *Curr. Biol.* 8 (1998) 1243–1252, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00533-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00533-7).
- [118] H.D. Tran, K. Luitel, M. Kim, K. Zhang, G.D. Longmore, D.D. Tran, Transient SNAIL expression is necessary for metastatic competence in breast cancer, *Cancer Res.* 74 (2014) 6330–6340, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0923>.
- [119] A.M. Krebs, J. Mitschke, M.L. Losada, O. Schmalhofer, M. Boerries, H. Busch, M. Boettcher, W. Reichardt, P. Bronsert, D. Mougiakakos, V.G. Brunton, C. Pilarczyk, T.H. Winkler, S. Brabletz, M.P. Stemmler, T. Brabletz, The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer, *Nat. Cell Biol.* 19 (2017) 518–529, <https://doi.org/10.1038/ncb3513>.
- [120] Y. Xu, D.K. Lee, Z. Feng, Y. Xu, W. Bu, Y. Li, L. Liao, J. Xu, Breast tumor cell-specific knockout of Twist1 inhibits cancer cell plasticity, dissemination, and lung metastasis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 11494–11499, <https://doi.org/10.1073/pnas.1618091114>.
- [121] H. De Blander, A.-P. Morel, A.P. Senaratne, M. Ouzounova, A. Puisieux, Cellular plasticity: a route to senescence exit and tumorigenesis, *Cancers (Basel)* 13 (2021), <https://doi.org/10.3390/CANCERS13184561>.
- [122] M. Saitoh, Involvement of partial EMT in cancer progression, *J. Biochem.* 164 (2018) 257–264, <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>.
- [123] I. Pastushenko, A. Brisebarre, A. Sifrim, M. Fioramonti, T. Revenco, S. Boumahdi, A. Van Keymeulen, D. Brown, V. Moers, S. Lemaire, S. De Clercq, E. Minguijón, C. Balsat, Y. Sokolow, C. Dubois, F. De Cock, S. Scozzaro, F. Sopena, A. Lanas, N. D'Haene, I. Salmon, J.-C. Marine, T. Voet, P.A. Sotiropoulou, C. Blanpain, Identification of the tumour transition states occurring during EMT, *Nature* 556 (2018) 463–468, <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0040-3>.
- [124] V. Evdokimova, C.E. Tognon, P.H.B. Sorensen, On translational regulation and EMT, *Semin. Cancer Biol.* 22 (2012) 437–445, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.007>.
- [125] A. Bera, S.M. Lewis, Regulation of epithelial-to-mesenchymal transition by alternative translation initiation mechanisms and its implications for cancer metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–16, <https://doi.org/10.3390/ijms21114075>.
- [126] M.R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz, Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs, *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 351–379, <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060308-103103>.
- [127] M.-L. Nairismägi, A. Vislovukh, Q. Meng, G. Kratassiouk, C. Beldiman, M. Petretich, R. Groisman, E.-M. Fuchtbauer, A. Harel-Bellan, I. Groisman, Translational control of TWIST1 expression in MCF-10A cell lines recapitulating breast cancer progression, *Oncogene* 31 (2012) 4960–4966, <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.650>.
- [128] Y. Katsuno, S. Lamouille, R. Derynck, TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression, *Curr. Opin. Oncol.* 25 (2013) 76–84, <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>.
- [129] M. Jechlinger, S. Grunert, I.H. Tamir, E. Janda, S. Lüdemann, T. Waerner, P. Seither, A. Weith, H. Beug, N. Kraut, Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression, *Oncogene* 22 (2003) 7155–7169, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206887>.
- [130] A. Chaudhury, S. Cheema, J.M. Fachine, N. Kongchan, G. Lu, L.M. Simon, T. Wang, S. Mao, D.G. Rosen, M.M. Ittmann, S.G. Hilsenbeck, C.A. Shaw, J. R. Neilson, CELF1 is a central node in post-transcriptional regulatory programmes underlying EMT, *Nat. Commun.* 7 (2016), <https://doi.org/10.1038/NCOMMS13362>.
- [131] B.V. Howley, G.S. Hussey, L.A. Link, P.H. Howe, Translational regulation of inhibin β A by TGF β via the RNA-binding protein hnRNP E1 enhances the invasiveness of epithelial-to-mesenchymal transitioned cells, *Oncogene* 35 (2016) 1725, <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.238>.
- [132] M. Frye, S.R. Jaffrey, T. Pan, G. Rechavi, T. Suzuki, RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 365–372, <https://doi.org/10.1038/NRG.2016.47>.
- [133] X. Lin, G. Chai, Y. Wu, J. Li, F. Chen, J. Liu, G. Luo, J. Tauler, J. Du, S. Lin, C. He, H. Wang, RNA m6A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of snail, *Nat. Commun.* 10 (2019), <https://doi.org/10.1038/S41467-019-09865-9>.
- [134] J. Li, F. Chen, Y. Peng, Z. Lv, X. Lin, Z. Chen, H. Wang, N6-methyladenosine regulates the expression and secretion of TGF β 1 to affect the epithelial-mesenchymal transition of cancer cells, *Cells* 9 (2020), <https://doi.org/10.3390/CELLS9020296>.
- [135] X. Wang, K. Li, Y. Wan, F. Chen, M. Cheng, G. Xiong, G. Wang, S. Chen, Z. Chen, J. Chen, X. Xu, C. Wang, L. Peng, D. Chen, Methyltransferase like 13 mediates the translation of snail in head and neck squamous cell carcinoma, *Int. J. Oral Sci.* 13 (2021) 1–11, <https://doi.org/10.1038/S41368-021-00130-8>.
- [136] I. Passacantilli, V. Panzeri, P. Bielli, D. Farini, E. Pillozzi, G.D. Fave, G. Capurso, C. Sette, Alternative polyadenylation of ZEB1 promotes its translation during genotoxic stress in pancreatic cancer cells, *Cell Death Dis.* 8 (2017), e3168, <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2017.562>.
- [137] W.R.W. Makhtar, G. Browne, A. Karountzos, C. Stevens, Y. Alghamdi, A. R. Bottrill, S. Mistry, E. Smith, M. Bushel, J.H. Pringle, A.E. Sayan, E. Tulchinsky, Short stretches of rare codons regulate translation of the transcription factor ZEB2 in cancer cells, *Oncogene* 36 (2017) 6640, <https://doi.org/10.1038/ONC.2017.273>.
- [138] M. Beltran, I. Puig, C. Peña, J.M. García, A.B. Álvarez, R. Peña, F. Bonilla, A.G. de Herrerros, A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition, *Genes Dev.* 22 (2008) 756, <https://doi.org/10.1101/GAD.455708>.
- [139] V. Evdokimova, C. Tognon, T. Ng, P. Ruzanov, N. Melnyk, D. Fink, A. Sorokin, L. P. Ovchinnikov, E. Davicioni, T.J. Triche, P.H.B. Sorensen, Translational activation of Snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition, *Cancer Cell.* 15 (2009) 402–415, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.017>.
- [140] A.M. El-Naggar, C.J. Veinotte, H. Cheng, T.G.P. Grunewald, G.L. Negri, S. P. Somasekharan, D.P. Corkery, F. Tirode, J. Mathers, D. Khan, A.H. Kyle, J. H. Baker, N.E. LePard, S. McKinney, S. Hajee, M. Bosiljic, G. Leprivier, C. E. Tognon, A.I. Minchinton, K.L. Bennenwith, O. Delattre, Y. Wang, G. Dellaire, J. N. Berman, P.H. Sorensen, Translational activation of HIF1 α by YB-1 promotes sarcoma metastasis, *Cancer Cell.* 27 (2015) 682–697, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2015.04.003>.
- [141] J. Jimenez, G.M. Jang, B.L. Semler, M.L. Waterman, An internal ribosome entry site mediates translation of lymphoid enhancer factor-1, *RNA* 11 (2005) 1385, <https://doi.org/10.1261/RNA.7226105>.
- [142] M. Petz, D. Kozina, H. Huber, T. Sivic, J. Seipelt, W. Sommergruber, W. Mikulits, The leader region of laminin B1 mRNA confers cap-independent translation, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2473–2482, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm096>.
- [143] M. Petz, N. Them, H. Huber, H. Beug, W. Mikulits, La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 290–302, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr717>.
- [144] M. Petz, N.C.C. Them, H. Huber, W. Mikulits, PDGF enhances IRES-mediated translation of laminin B1 by cytoplasmic accumulation of la during epithelial to mesenchymal transition, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 9738–9749, <https://doi.org/10.1093/nar/gks760>.
- [145] R. Lucá, M. Averna, F. Zalfa, M. Vecchi, F. Bianchi, G. La Fata, F. Del Nonno, R. Nardacci, M. Bianchi, P. Nuciforo, S. Munck, P. Parrella, R. Moura, E. Signori, R. Alston, A. Kuchnio, M.G. Farace, V.M. Fazio, M. Piacentini, B. De Strooper, T. Achsel, G. Neri, P. Neven, D.G. Evans, P. Carmeliet, M. Mazzone, C. Bagni, The fragile X protein binds mRNAs involved in cancer progression and modulates metastasis formation, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 1523, <https://doi.org/10.1002/EMMM.201302847>.
- [146] L. Wurth, P. Papasaikas, D. Olmeda, N. Bley, G.T. Calvo, S. Guerrero, D. Cerezo-Wallis, J. Martínez-Useros, M. García-Fernández, S. Hüttelmaier, M.S. Soengas, F. Gebauer, UMR/CSDE1 drives a post-transcriptional program to promote melanoma invasion and metastasis, *Cancer Cell.* 30 (2016) 694–707, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2016.10.004>.
- [147] D. Ruggero, Translational control in cancer etiology, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013), <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012336>.
- [148] V. Marcel, S.E. Ghayad, S. Belin, G. Therizols, A.-P. Morel, E. Solano-González, J. A. Vendrell, S. Hacot, H.C. Mertani, M.A. Albaret, J.-C. Bourdon, L. Jordan, A. Thompson, Y. Tafer, R. Cong, P. Bouvet, J.-C. Saurin, F. Catez, A.-C. Prats, A. Puisieux, J.-J. Diaz, p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillar and rRNA methylation in cancer, *Cancer Cell.* 24 (2013) 318, <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.08.013>.
- [149] V. Marcel, F. Catez, J.-J. Diaz, Ribosome heterogeneity in tumorigenesis: the rRNA point of view, *Mol. Cell. Oncol.* 2 (2015), <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.983755>.
- [150] X. Tang, L. Zha, H. Li, G. Liao, Z. Huang, X. Peng, Z. Wang, Upregulation of GNL3 expression promotes colon cancer cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Oncol. Rep.* 38 (2017) 2023, <https://doi.org/10.3892/OR.2017.5923>.
- [151] M. Cai, H. Li, R. Chen, X. Zhou, MRPL13 promotes tumor cell proliferation, migration and EMT process in breast cancer through the PI3K-AKT-mTOR pathway, *Cancer Manag. Res.* 13 (2021) 2009, <https://doi.org/10.2147/CMAR.S296038>.
- [152] Y. Wen, Z. An, B. Qiao, C. Zhang, Z. Zhang, RPS7 promotes cell migration through targeting epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 37 (297) (2019), <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2019.01.011> e1-297.e7.
- [153] N. Wu, J. Wei, Y. Wang, J. Yan, Y. Qin, D. Tong, B. Pang, D. Sun, H. Sun, Y. Yu, W. Sun, X. Meng, C. Zhang, J. Bai, F. Chen, J. Geng, K.-Y. Lee, S. Fu, Y. Jin, Ribosomal L22-like1 (RPL22L1) promotes ovarian cancer metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition, *PLoS One* 10 (2015), <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0143659>.
- [154] N. Ito, K. Katoh, H. Kushige, Y. Saito, T. Umemoto, Y. Matsuzaki, H. Kiyonari, D. Kobayashi, M. Soga, T. Era, N. Araki, Y. Furuta, T. Suda, Y. Kida, K. Ohta, Ribosome incorporation into somatic cells promotes lineage transdifferentiation towards multipotency, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1634, <https://doi.org/10.1038/S41598-018-20057-1>.
- [155] M. Kudo, M.B. Anam, A. Istiaq, S.A.I. Ahmad, N. Ito, K. Ohta, Ribosome incorporation induces EMT-like phenomenon with cell cycle arrest in human breast cancer cell, *Cells Tissues Organs* (2021) 1–10, <https://doi.org/10.1159/000513908>.

- [156] L. Fabbri, A. Chakraborty, C. Robert, S. Vagner, The plasticity of mRNA translation during cancer progression and therapy resistance, *Nat. Rev. Cancer* (2021) 1–20, <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00380-y>.
- [157] D.-J. Tang, S.-S. Dong, N.-F. Ma, D. Xie, L. Chen, L. Fu, S.H. Lau, Y. Li, Y. Li, X.-Y. Guan, Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 51 (2010) 1255–1263, <https://doi.org/10.1002/HEP.23451>.
- [158] L. Ning, L. Wang, H. Zhang, X. Jiao, D. Chen, Eukaryotic translation initiation factor 5A in the pathogenesis of cancers, *Oncol. Lett.* 20 (2020), <https://doi.org/10.3892/OL.2020.11942>.
- [159] W. Zhu, M.-Y. Cai, Z.-T. Tong, S.-S. Dong, S.-J. Mai, Y.-J. Liao, X.-W. Bian, M. C. Lin, H.-F. Kung, Y.-X. Zeng, X.-Y. Guan, D. Xie, Overexpression of EIF5A2 promotes colorectal carcinoma cell aggressiveness by upregulating MTA1 through C-myc to induce epithelial–mesenchymal transition, *Gut* 61 (2012) 562–575, <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2011-300207>.
- [160] Y. Liu, R. Liu, P. Fu, F. Du, Y. Hong, M. Yao, X. Zhang, S. Zheng, N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane sensitizes estrogen receptor negative breast cancer cells to doxorubicin by preventing epithelial–mesenchymal transition through inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2 activation, *Cell. Physiol. Biochem.* 36 (2015) 2494–2503, <https://doi.org/10.1159/000430209>.
- [161] J. Sun, Z. Xu, H. Lv, Y. Wang, L. Wang, Y. Ni, X. Wang, C. Hu, S. Chen, F. Teng, W. Chen, X. Cheng, eIF5A2 regulates the resistance of gastric cancer cells to cisplatin via induction of EMT, *Am. J. Transl. Res.* 10 (2018) 4269. <https://doi.org/10.3923/AJTR.2018.1004.4269>.
- [162] P. Gulhati, K.A. Bowen, J. Liu, P.D. Stevens, P.G. Rychahou, M. Chen, E.Y. Lee, H. L. Weiss, K.L. O'Connor, T. Gao, B.M. Evers, mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways, *Cancer Res.* 71 (2011) 3246, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4058>.
- [163] J. Qi, Y. Yu, Ö.A. Öztürk, J.D. Holland, D. Besser, J. Fritzmann, A. Wulf-Goldenberg, K. Eckert, I. Fichtner, W. Birchmeier, New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals, *Gut* 65 (2016) 1690–1701, <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2014-307900>.
- [164] W. Cai, Q. Ye, Q.-B. She, Loss of 4E-BP1 function induces EMT and promotes cancer cell migration and invasion via cap-dependent translational activation of snail, *Oncotarget* 5 (2014) 6015, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2109>.
- [165] K. Kumar, C.R. Chow, K. Ebine, A.D. Arslan, B. Kwok, D.J. Bentrem, F.D. Eckerdt, L.C. Platanius, H.G. Munshi, Differential regulation of ZEB1 and EMT by MAPK-interacting protein kinases (MNKs) and eIF4E in pancreatic cancer, *Mol. Cancer Res.* 14 (2016) 216, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0285>.
- [166] W. Luo, F. Wang, H. Luo, H. Liu, Arctigenin inhibits human breast cancer cell proliferation, migratory and invasive abilities and epithelial to mesenchymal transition by targeting 4EBP1, *Exp. Ther. Med.* 21 (2021), <https://doi.org/10.3892/ETM.2021.9979>.
- [167] A.C. Hsieh, Y. Liu, M.P. Edlind, N.T. Ingolia, M.R. Janes, A. Sher, E.Y. Shi, C. R. Stumpf, C. Christensen, M.J. Bonham, S. Wang, P. Ren, M. Martin, K. Jessen, M. E. Feldman, J.S. Weissman, K.M. Shokat, C. Rommel, D. Ruggero, The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis, *Nature* 485 (2012) 55, <https://doi.org/10.1038/NATURE10912>.
- [168] J. Deng, X. Bai, X. Feng, J. Ni, J. Beretov, P. Graham, Y. Li, Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial–mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression, *BMC Cancer* 19 (2019), <https://doi.org/10.1186/S12885-019-5824-9>.
- [169] O. Attar-Schneider, L. Drucker, M. Gottfried, Migration and epithelial-to-mesenchymal transition of lung cancer can be targeted via translation initiation factors eIF4E and eIF4G1, *Lab. Invest.* 96 (2016) 1004–1015, <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.2016.77>.
- [170] C. Rao, D.E. Frodyma, S. Southeikal, R.A. Svoboda, A.R. Black, C. Guda, T. Mizutani, H. Clevers, K.R. Johnson, K.W. Fisher, R.E. Lewis, KSR1- and ERK-dependent translational regulation of the epithelial-to-mesenchymal transition, *elife* 10 (2021), <https://doi.org/10.7554/ELIFE.66608>.
- [171] Y. Feng, E.S. Sokol, C.A. Del Vecchio, S. Sanduja, J.H.L. Claessen, T.A. Proia, D. X. Jin, F. Reinhardt, H.L. Ploegh, Q. Wang, P.B. Gupta, Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK–eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress, *Cancer Discov.* 4 (2014) 702–715, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0945>.
- [172] J. Berenguer, T. Celià-Terrassa, Cell memory of epithelial–mesenchymal plasticity in cancer, *Curr. Opin. Cell Biol.* 69 (2021) 103–110, <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2021.01.001>.
- [173] S. Liu, C. Cheng, Alternative RNA splicing and cancer, *RNA* 4 (2013) 547, <https://doi.org/10.1002/WRNA.1178>.
- [174] A.C. Pond, J.I. Herschkowitz, K.L. Schwertfeger, B. Welm, Y. Zhang, B. York, R. D. Cardiff, S. Hilsenbeck, C.M. Perou, C.J. Creighton, R.E. Lloyd, J.M. Rosen, Fibroblast growth factor receptor signaling dramatically accelerates tumorigenesis and enhances oncoprotein translation in the mouse mammary tumor Virus–Wnt-1 mouse model of breast cancer, *Cancer Res.* 70 (2010) 4868, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4404>.
- [175] P. Shigunov, L.T. Balvedi, M.D.M. Santos, R.H. Herai, A.M. de Aguiar, B. Dallagiovanna, Crosstalk between hedgehog pathway and energy pathways in human adipose-derived stem cells: a deep sequencing analysis of polysome-associated RNA, *Sci. Rep.* 8 (2018), <https://doi.org/10.1038/S41598-018-26533-Y>.
- [176] V. Marcel, F.N. Van Long, J.-J. Diaz, 40 years of research put p53 in translation, *Cancers (Basel)* 10 (2018), <https://doi.org/10.3390/CANCERS10050152>.
- [177] V. Marcel, F. Catez, J.-J. Diaz, p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity, *Oncogene* 34 (2015) 5513–5523, <https://doi.org/10.1038/ncr.2015.25>.
- [178] R.L. Kan, J. Chen, T. Sallam, Crosstalk between epitanscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation, *Trends Genet.* (2021), <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2021.06.014>.
- [179] S. Tahmasebi, A. Khoutorsky, M.B. Mathews, N. Sonenberg, Translation deregulation in human disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 791–807, <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0034-X>.
- [180] A. Aspesi, S.R. Ellis, Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer, *Nat. Rev. Cancer* 19 (2019) 228–238, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0105-0>.
- [181] F. Catez, N. Dalla Venezia, V. Marcel, C. Zorbas, D.L.J. Lafontaine, J.J. Diaz, Ribosome biogenesis: an emerging druggable pathway for cancer therapeutics, *Biochem. Pharmacol.* 159 (2019) 74–81, <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2018.11.014>.
- [182] M. Jaafar, H. Paraqindes, M. Gabut, J.-J. Diaz, V. Marcel, S. Durand, 2'O-ribose methylation of ribosomal RNAs: natural diversity in living organisms, biological processes, and diseases, *Cells* 10 (2021) 1948, <https://doi.org/10.3390/CELLS10081948>.
- [183] V. Marcel, J. Kielbassa, V. Marchand, K.S. Natchiar, H. Paraqindes, F. Nguyen Van Long, L. Ayadi, V. Bourguignon-Igel, P. Lo Monaco, D. Monchiet, V. Scott, L. Tonon, S.E. Bray, A. Diot, L.B. Jordan, A.M. Thompson, J.-C. Bourdon, T. Dubois, F. André, F. Catez, A. Puisieux, Y. Motorin, B.P. Klaholz, A. Viari, J.-J. Diaz, Ribosomal RNA 2'O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer, *NAR Cancer* 2 (2020), <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAA036>.
- [184] J. Erales, V. Marchand, B. Panthou, S. Gillot, S. Belin, S.E. Ghayad, M. Garcia, F. Laforêts, V. Marcel, A. Baudin-Baillieu, P. Bertin, Y. Couté, A. Adrait, M. Meyer, G. Therizols, M. Yusupov, O. Namy, T. Ohlmann, Y. Motorin, F. Catez, J.-J. Diaz, Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 12934, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1707674114>.
- [185] G. Xu, X. Shi, L. Sun, Q. Zhou, D. Zheng, H. Shi, Y. Che, Z. Wang, G. Shao, Down-regulation of eIF5A-2 prevents epithelial–mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer cells, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 14 (2013) 460, <https://doi.org/10.1631/JZUS.B1200200>.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Le ribosome a longtemps été considéré comme simple effecteur de la traduction. Or, de récentes études démontrent, ou tendent à démontrer, que le ribosome est également un régulateur traductionnel. Ainsi, plusieurs contextes physio-pathologiques ont permis de démontrer (i) l'existence d'une hétérogénéité de composition du ribosome *in vitro* et *in vivo*, (ii) que des variations de composition du ribosome sont associées à certains phénotypes et/ou (iii) que des variations de la composition du ribosome sont associées à la traduction préférentielle de certains ARN messagers. Cependant, le lien direct entre composition du ribosome, traduction et phénotype n'a été que peu démontré, et ne l'a jamais été dans des modèles biologiques dynamiques.

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un modèle d'intérêt pour aborder ces questionnements. En effet, l'EMT constitue à ce jour l'un des phénomènes biologiques dynamique et réversible les mieux décrits. Processus central du vivant, impliqué dans différentes étapes de la vie (*i.e.*, embryogenèse, âge adulte, pathologie), l'EMT est un processus étudié depuis une cinquantaine d'années. En particulier, les mécanismes de régulation épigénétiques et transcriptionnels impliqués dans l'établissement et le maintien de l'EMT représentent plusieurs milliers d'articles scientifiques. Ainsi, la TEMTIA (*i.e.*, association internationale de l'EMT) a défini en 2020 de nouvelles nomenclatures visant à uniformiser les critères de caractérisation et de classification de l'EMT (J. Yang *et al.*, 2020). Ce rapport consensus soulève, en tant que point central de réflexion pour la communauté, le manque crucial de nouveaux marqueurs de caractérisation et classification des différents états de l'EMT, mais également de sa dynamique globale.

Ainsi, je propose, à travers mes travaux de thèse, d'évaluer le potentiel apport de l'étude de la régulation traductionnelle et du ribosome dans la compréhension du processus physio-pathologique dynamique qu'est l'EMT. L'hypothèse sur laquelle sont basés mes travaux est que le ribosome, au travers de son hétérogénéité de composition, module la mise en place et/ou le maintien de l'EMT *via* la régulation traductionnelle. Pour cela, plusieurs objectifs ont été atteints dans cet ouvrage :

1. Identifier l'existence d'une hétérogénéité de composition en ARNs ribosomiques et en protéines du ribosome au cours de l'EMT ;

2. Evaluer l'importance relative des régulations transcriptionnelle et traductionnelle au cours de l'EMT ;
3. Démontrer que la modification de la composition du ribosome est un évènement majeur de l'initiation de l'EMT.

RESULTATS

I. Article 1 : “Dynamic modulation of ribosomal RNA 2'-O-ribose methylation during epithelial-mesenchymal transition”

Cet article scientifique dont je suis co-auteurice en 1^{ère} position est en cours de préparation. La version en cours du manuscrit est incluse à la suite de cette introduction.

1. Contexte

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus physiologique complexe et dynamique permettant aux cellules épithéliales d'acquérir, entre autres, des propriétés migratoires. L'EMT est caractérisée par une succession de modifications moléculaires aux niveaux épigénétique et transcriptomique. Ces changements moléculaires sont médiés principalement par l'expression de facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TF) dont l'expression permet l'activation de l'expression de gènes à caractère mésenchymateux (*e.g.*, *VIM*), la répression de gènes à caractère épithélial (*e.g.*, *CDHI*) et la régulation de facteurs épigénétiques (*e.g.*, DNMT1). Cependant, bien que le mécanisme d'action des différents EMT-TFs soit similaire, certains d'entre eux sont capables d'induire un EMT complète (*i.e.*, ZEB1) tandis que d'autres permettent la mise en place d'une EMT partielle (*i.e.*, familles Snail et Twist), caractérisée par des cellules exprimant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux.

Outre la régulation transcriptomique des EMT-TFs et marqueurs mésenchymateux, plusieurs études ont démontré le rôle de la régulation traductionnelle dans leur expression (*e.g.*, traduction cap-dépendante de *SNAIL*, utilisation de codons rares pour *ZEB2*). Cependant, le rôle du ribosome dans la régulation de ces marqueurs, et donc de l'EMT, n'a pas été étudié. Or, il a été montré que des altérations de 2'-O-ribose méthylation (2'Ome) des ARN ribosomiques (ARNr) a été démontré comme affectant l'activité traductionnelle dépendante des IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) du ribosome. Ainsi, de par son rôle central dans l'expression génique, le ribosome pourrait être un acteur majeur de la régulation de l'EMT.

2. Résultats principaux

Dans cet article, nous proposons d'étudier les modifications de 2'Ome du ribosome au cours de l'EMT à l'aide d'un modèle cellulaire épithélial humain mammaire (hMEC), surexprimant l'EMT-TF ZEB1 (hMEC-ZEB1) ou non (hMEC).

Tout d'abord, l'analyse par RiboMethSeq des 112 sites connus de 2'Ome de l'ARNr humain ont permis de mettre en évidence trois sites de méthylation variables entre cellules épithéliales hMEC et mésenchymateuses hMEC-ZEB1. Ce site (*i.e.*, 28S_Um2402) a été retrouvé significativement sous-méthylé dans les cellules mésenchymateuses, à la fois dans les ribosomes matures (cytoplasme) et les ribosomes en cours de traduction (polysomes). De plus, dans ce modèle cellulaire, l'expression des deux snoARNs guidant la méthylation au site 28S_Um2402 (*i.e.*, SNORD143 et SNORD144) est diminuée de 70% dans les cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales. Ces données nous ont permis de déterminer l'existence de ribosomes actifs possédant une altération spécifique de la 2'Ome au site 28S_Um2402 en fonction du contexte cellulaire.

En outre, l'altération de la 2'Ome au site 28S_Um2402 a pu être obtenue de façon dynamique en réponse à l'induction de l'EMT dans un modèle cellulaire hMEC inductible pour l'expression de l'EMT-TF ZEB1 (hMEC-i-ZEB1). Ce modèle inductible nous a ainsi permis de mettre en évidence une diminution progressive de la 2'Ome du site 28S_Um2402 et des snoARNs associés au cours de l'induction de l'EMT. Le retrait de l'induction et le retour progressif à un état cellulaire épithélial partiel permet une augmentation progressive de la 2'Ome et des snoARNs associés au site 28S_Um2402. Ces observations permettent de conforter nos précédentes observations, mais également de souligner la plasticité de la 2'Ome en accord avec la plasticité cellulaire conférée par l'EMT.

Enfin, nous avons étudié la possibilité d'une généralisation du taux de 2'Ome comme marqueur de l'EMT. Ainsi, nous avons pu montrer par regroupement hiérarchique que le taux de méthylation des 20 sites méthylés les plus variants permet la distinction des différents types d'EMT (*i.e.*, partielle ou complète). En revanche, l'expression de l'oncogène KRAS^{V12} ne semble pas affecter la 2'Ome. L'étude particulière du site 28S_Um2402 semble montrer que la diminution du taux de 2'Ome à ce site est spécifique des EMT complètes (*i.e.*, induite par ZEB1 ou ZEB2) et n'est pas retrouvée dans l'EMT partielle induite par l'expression de l'EMT-TF TWIST1.

En conclusion, bien que ces données ne démontrent pas clairement un lien moléculaire entre 2'Ome, régulation traductionnelle et EMT, elles permettent de démontrer pour la première fois l'aspect dynamique de la 2'Ome. De plus, ces résultats soulèvent l'importance de l'hétérogénéité de composition du ribosome au cours de l'EMT. En particulier, l'expression de l'EMT-TF ZEB1 semble jouer un rôle important dans la plasticité ribosomique.

3. Ma contribution

En tant que co-première autrice de ce manuscrit, j'ai réalisé les expériences de laboratoire, l'analyse de ces expériences ainsi que la centralisation des données et la construction des figures présentées. En collaboration avec mes co-auteurs, j'ai également participé à la réflexion scientifique et la rédaction de ce manuscrit.

4. Manuscrit (en préparation)

Dynamic modulation of ribosomal RNA 2’-O-ribose methylation during epithelial-mesenchymal transition

Chloé Morin^{1,8}, Hermes Paraqindes^{1,8}, Flora Nguyen Van Long¹, Caroline Isaac¹, Emilie Thomas¹, Anne-Pierre Morel¹, Virginie Marchand², Yuri Motorin^{2,3}, Marjorie Carrere⁴, Jessie Auclair⁴, Valéry Attignon⁴, Roxanne Pommier^{1,5}, Frédéric Catez¹, Anthony Ferrari⁵, Alain Viari^{5,6}, Alain Puisieux^{1,7}, Jean-Jacques Diaz¹, Caroline Moyret-Lalle¹, Virginie Marcel^{1,9,*}

¹ 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

² UMS2008 IBSLor CNRS-INSERM-Lorraine University, Biopôle, 9 avenue de la forêt de haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

³ IMoPA, UMR 7365 CNRS-UL, Biopole UL, Vandoeuvre-les-Nancy, France

⁴ Centre Léon Bérard, Lyon Cedex 08, France

⁵ Synergie Lyon Cancer, Centre Léon Bérard, Lyon Cedex 08, France

⁶ INRIA Grenoble Rhône-Alpes, Montbonnot-Saint-Martin 38334, France ¹⁵ Breast Cancer Biology

⁷ Institut Curie-PSL Research University, 26 rue d’Ulm, 75005 Paris, France

⁸ These authors contributed equally

⁹ Lead contact

*Correspondance: virginie.marcel@lyon.unicancer.fr (V.M.)

Keywords: EMT, EMP, MEP, ribosome heterogeneity, 2’Ome, rRNA, epitranscriptomics, breast cancer, melanocyte.

Abstract

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a dynamic transdifferentiation of epithelial into mesenchymal cells. However, it remains crucial to appreciate the full diversity of individual EMT programs in order to gain into a mechanistic understanding of EMT plasticity. Using RiboMethSeq, we analyzed ribosomal RNA (rRNA) epitranscriptomics and reported that rRNA 2'Ome profile is dynamically modulated during EMT. A decrease in 2'Ome at the 28S_Um2402 site was observed in translating ribosomes, in response to stable overexpression of ZEB1 and ZEB2 but not TWIST1. This decrease is also observed throughout the ZEB1-induced EMP/MEP process and in panels of breast cancer and melanocyte cell lines harboring mesenchymal features. Interestingly, change in rRNA 2'Ome correlates with expression of the C/D box small nucleolar RNAs (snoRNAs), which guide methyltransferase to the 28S_Um2402 rRNA site. Overall, we demonstrate that ribosome composition at the 2'Ome rRNA level is altered in EMT by modulation of snoRNAs, but differentially as a function of the EMT transcription factors.

1 Introduction

2 The transdifferentiation of epithelial cells into mesenchymal ones (EMT) contributes to tissue
3 and organ formation during embryogenesis, as well as organ homeostasis and function during
4 adulthood, including in the dynamic life of the mammary gland formation in female¹. In turn,
5 impaired, abnormal or excessive activation of EMT plays a role in several human pathologies,
6 including neuropathies, fibrosis and cancer. In the latter disease, aberrant reactivation of EMT
7 promotes invasion and metastatic dissemination of tumour cells, and the EMT-driven
8 adaptability to selective pressures also confers tumour resistance to therapy¹. It thus appeared
9 that EMT is associated with the most aggressive tumours, for instance the Claudin-low subtype
10 in breast cancer^{2,3}.

11 In response to environmental changes, EMT is triggered by a profound transcriptional
12 reprogramming⁴⁻⁶. Change in cell identity indeed relies on EMT transcription factors (EMT-
13 TFs); the core EMT-TFs being Twist, Snail and Zeb family members. They drive the
14 replacement of expression of epithelial markers (*e.g.*, E-cadherin/CDH1, EPCAM, OCLN) by
15 mesenchymal ones (*e.g.*, Vimentin/VIM). Activation of EMT-TFs expression is induced in
16 response to diverse signaling pathways including TGF β . EMT heterogeneity has been
17 observed as a function of activated EMT-TF⁵. The expression of some EMT-TFs, such as
18 ZEB1, indeed results in a “complete” transdifferentiation (*i.e.*, EMT), whereas other EMT-TFs,
19 including TWIST, induce only a “partial” EMT characterized by cells displaying a combination
20 of epithelial and mesenchymal properties (*i.e.*, EMP or epithelial-mesenchymal plasticity)^{5,7}. It
21 appears that cells are “locked” at different time points, reflecting these intermediate stable
22 states, through epigenetic events which prevent reversion and allow additional
23 transcriptionally-driven molecular changes to occur^{4,8}. This model reconciles the fact that EMT-
24 TFs not only directly affect transcription but also act as co-factors of epigenetic regulators,
25 such as the DNA methyltransferase 1 (DNMT1)⁹. At present, it remains crucial to appreciate
26 the full diversity of individual EMT programs in different physio-pathological contexts and to
27 identify novel molecular markers to distinguish them in order to gain a more precise
28 mechanistic understanding of EMT plasticity⁵.

29 It emerges that EMT plasticity might also rely on translational regulation. EMT is indeed
30 characterized by change in translation, however different translational mechanisms have been
31 reported depending on the context⁶. For instance, several studies reported that reactivation of
32 EMT-TFs expression at translational level is sufficient to promote EMT, the molecular
33 mechanism being distinct from one EMT-TF to another (*e.g.*, cap-independent translation of
34 *SNAI1* mRNA or rare codon usage for *ZEB2* mRNA)^{6,10,11}. Among the regulators of translation,
35 ribosome unexpectedly appeared to act as key regulator of translation^{12,13}. Ribosomes display

36 distinct compositions, at both ribosomal protein and ribosomal RNA (rRNA) levels, which are
37 assumed to regulate the translation of specific mRNAs. At rRNA level, variation in ribosome
38 composition mostly relies on chemical modifications, including the most abundant one, the 2'-
39 O-ribose methylations (2'Ome) present at 112 sites^{14,15}. Variations in rRNA 2'Ome levels have
40 been reported in living organisms, biological processes and diseases including cancer,
41 supporting the importance of rRNA chemical modifications in physio-pathological processes<sup>16-
42 18</sup>. Moreover, some studies reported its role in regulating translation of specific mRNAs and
43 key cellular functions leading to the emerging notion of rRNA epitranscriptomics. Firstly,
44 alteration of rRNA 2'Ome has been shown to affect translation of mRNAs containing the IRES
45 (Internal Ribosome Entry Site) *cis*-regulatory element, such as *IGF1R*^{19,20}. Secondly, alteration
46 of 2'Ome level at a single rRNA site is sufficient to either affect cell proliferation or support
47 leukemic stem cell functions by modulating translation of specific mRNAs through differential
48 codon usage^{21,22}. Here, we investigated whether rRNA 2'Ome is modulated during mammary
49 EMT and decipher whether rRNA epitranscriptomics contributes in identifying EMT diversity.

50 Results

51 ZEB1 overexpression decreases rRNA 2'Ome level at the 28S_Um2402 site

52 To investigate whether rRNA 2'Ome level is modulated during EMT, we first focused on a
53 cellular model mimicking complete EMT to minimize cellular heterogeneity. Knowing that ZEB1
54 remains the most potent EMT-TF driver, we used our previously established pair of human
55 mammary epithelial cell lines (hMEC) overexpressing ZEB1 (hMEC-ZEB1) or not (hMEC)²³.
56 Compared to their epithelial counterparts, hMEC-ZEB1 cells display a mesenchymal
57 morphology and the expected shift in decreased CDH1 and increased VIM expression at both
58 mRNA and protein levels (Figure S1).

59 Using RiboMethSeq approach, we compared the 2'Ome level in hMEC epithelial and hMEC-
60 ZEB1 mesenchymal cells at the 112 known rRNA sites. Comparison was first performed in the
61 cytoplasmic lysate, where mature ribosomes are located, after western blot validation of
62 cellular fractionation^{24,25} (Figure S2A). Only 2 out of the 112 rRNA 2'Ome sites (28S_Um2402,
63 28S_Am2388) were identified as significantly different in the cytoplasm of ZEB1-
64 overexpressing hMEC cells compared to that of hMEC (Figure 1A). Both are located in the
65 28S rRNA and display a decrease in rRNA 2'Ome level, the strongest one being observed for
66 the 28S_Um2402 rRNA site with about 10% decrease (from median C-score of 0.72 to 0.60)
67 (Figure 1A, Figure S2B). To determine whether such modulation in rRNA 2'Ome level was

68 conserved in actively translating ribosomes, we purified and pooled the polysomal fractions of
69 each cell lines²⁶ (Figure S2C). Similar significant decreases of 10% in rRNA 2'Ome level at the
70 28S_Um2402 site was observed in polysomes from hMEC-ZEB1 compared to those of hMEC
71 cells (from median C-score of 0.72 to 0.60), indicating that mature and active ribosomes exhibit
72 modulation of rRNA 2'Ome level at 28S_Um2402 site (Figure 1B, Figure S2D). Such trend in
73 decrease of rRNA 2'Ome level at 28S_Um2402 site in ZEB1-overexpressing hMEC compared
74 to hMEC cells was also observed in total RNA (Figure S2E-F). It has to be noted that among
75 the 112 known rRNA sites, 3 sites were identified as unmethylated in all the conditions,
76 indicating that, at least in our cellular models, no methylation is present at the sites
77 18S_Cm621, 18S_Um1760 and 28S_Um1760. In addition to 28S_Um2402, significant change
78 in 2'Ome level at 3 additional sites of 28S rRNA was identified (28S_Am2774, 28S_Um4590
79 and 28S_Am2388) (Figure 1A-B). However, they were not found as significant in all the three
80 different fractions (*i.e.*, cytoplasm, polysomes, total) unlike 28S_Um2402 and they display a
81 smaller range of modulation compared to 28S_Um2402. Such a discrepancy between
82 identification of rRNA 2'Ome sites of interest in the different subcellular extracts might result
83 from either technical bias (*e.g.*, difference in read depth or usage of non-adjusted p-values) or
84 biological features. Compared to these 3 sites, the decrease in 2'Ome level at 28S_Um2404
85 is reproducible among the different conditions in mesenchymal *versus* epithelial cells and
86 reinforces its association with ZEB1 overexpression (Figure 1A-B and Figure S2B, S2D-F).
87 The 28S_Um2402 site is located in the large 60S subunit of the ribosome, more particularly at
88 the surface of the ribosome closed to the exit peptide tunnel (EPT) where neo-synthesized
89 peptides are released (Figure 1C). This location suggests a role for 28S_Um2402 2'Ome site
90 in translation. In particular in the regulation of co-translational protein folding, since some
91 studies recently demonstrated the key role of ribosomal proteins located at the vicinity of the
92 ribosome exit tunnel, like 28S_Um2402, in the folding of nascent proteins²⁷⁻²⁹.
93 Our data indicate that compared to epithelial cells, mesenchymal cells overexpressing the
94 EMT-TF ZEB1 display a decrease in 2'Ome level at the rRNA 28S_Um2402 site in mature and
95 actively translating ribosomes. Overall, it appears that EMT is associated with a heterogeneity
96 in ribosome composition at rRNA 2'Ome level.

97 **ZEB1 overexpression is associated with a decreased expression of SNORD143 and**
98 **SNORD144**

99 To determine by which mechanism the overexpression of ZEB1 is associated with a change
100 in rRNA 2'Ome profile, we first investigated whether ZEB1 expression affects ribosome
101 biogenesis. Indeed, since addition of 2'Ome occurs co-transcriptionally during the rRNA

102 synthesis, which is the first step of ribosome biogenesis occurring in the nucleolus, modulation
103 of ribosome production might directly affect rRNA 2’Ome^{16,17,30}. Compared to the hMEC
104 epithelial cells, no change in the shape of nucleoli, which is a cellular trait commonly used to
105 identify defects in ribosome biogenesis³¹, was observed in hMEC-ZEB1 cells, nor in the level
106 of 18S or 28S rRNAs (Figure S3). It suggests that change in rRNA 2’Ome profile was not
107 associated with a change in ribosome quantity.

108 rRNA 2’Ome is catalysed in the nucleolus by a rRNA 2’Ome complex composed of four
109 proteins, NOP56, NOP58, NHP2L1 as well as FBL the rRNA methyl-transferase, and one C/D
110 box small nucleolar RNA (snoRNA), which hybridizes rRNA in a sequence specific manner to
111 guide FBL on the rRNA site to be methylated^{16,32}. We and others reported a strong correlation
112 between change in *FBL* expression levels and change in rRNA 2’Ome levels^{19,20,22}. To
113 determine whether change in rRNA 2’Ome level in ZEB1-induced EMT relies on FBL
114 modulation, we compared its subcellular location and expression in hMEC and hMEC-ZEB1
115 cell lines. No change in FBL staining, subcellular location or levels was observed, nor in both
116 mRNA or protein levels of the three other protein components of the rRNA 2’Ome complex
117 (Figure S4).

118 We thus focused on expression of the two C/D box snoRNAs known to specifically guide FBL
119 on the 28S_Um2402 site: SNORD143 and SNORD144 (snoDB v2.0:
120 <http://scottgroup.med.usherbrooke.ca/snoDB/>)³². A significant 70% decrease in both
121 SNORD143 and SNORD144 levels was observed in the ZEB1-overexpressing hMEC cells
122 compared to the hMEC ones (Figure 1D-E). It paralleled the decrease in rRNA 2’Ome levels
123 at 28S_Um2402 in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells. Interestingly, no change in RNA
124 levels of a panel of 6 additional C/D box snoRNAs was observed, suggesting a specific
125 modulation of SNORD143 and SNORD144 in response to ZEB1 overexpression (Figure S5).
126 Since SNORD143 and SNORD144 are expressed from the same intronic sequence of the
127 *SEC31A* locus, we analysed expression of their common host gene. No change in *SEC31A*
128 mRNA levels was observed in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells (Figure 1F), suggesting
129 that decrease of rRNA 2’Ome level at 28S_Um2402 mainly relies on expression of SNORD143
130 and SNORD144 themselves in response to ZEB1 overexpression rather than on the *SEC31A*
131 locus.

132 These data demonstrate that change in 2’Ome level at rRNA 28S_Um2402 site arise from
133 variation in specific SNORD143 and SNORD144 expression. Overall, change in rRNA 2’Ome
134 profile in ZEB1-induced EMT occurs at a single particular site in mature and actively translating
135 ribosomes that is dependent upon expression levels of its related C/D box snoRNAs.

136 **rRNA 2'Ome level at the 28S_Um2402 site is dynamically modulated during ZEB1-**
137 **induced EMP/MEP**

138 Usage of ZEB1-overexpressing stable hMEC cells identified difference in rRNA 2'Ome level
139 between two homogeneous populations of either epithelial or mesenchymal cells. However,
140 EMT is a dynamic and reversible process associated with intermediate stages characterized
141 by heterogeneous cellular and molecular profiles (*i.e.*, Epithelial-Mesenchymal Plasticity or
142 EMP)⁴⁻⁶. We thus deciphered whether modulation in rRNA 2'Ome occurs dynamically during
143 both the induction and reversion phases of EMT.

144 To do so, we took advantage of an inducible hMEC-i-ZEB1 cell line. In response to doxycycline
145 and compared to untreated hMEC-i-ZEB1 cell line, *ZEB1* mRNA level increases in a time
146 dependent manner from day 0 to day 7 and reached a maximum of 8-fold-change (Figure 2A,
147 “Gene” panel). *ZEB1* induction is paralleled with a time dependent increase in the mRNA levels
148 of the *VIM* mesenchymal marker and decrease of the *CDH1* and *EpCAM* epithelial markers,
149 indicating that *ZEB1* overexpression promotes progressive shift in mesenchymal-related
150 molecular traits (*i.e.*, EMP induction phase). Removal of the doxycycline at day 7, gradually
151 reduces *ZEB1* mRNA levels from day 10 to day 22 when it reaches a level equivalent to the
152 one observed at early induction stage of day 2. During this MEP reversion phase, time
153 dependent increase in *EpCAM* mRNA levels, and in a lesser extent in *CDH1*, is observed. It
154 has to be noted that while decrease in *VIM* mRNA levels was observed from day 7 to day 14,
155 *VIM* mRNA levels increased from day 14 to 22. Such observation might result from the
156 establishment of a regulatory loop involving additional EMT-TFs in response to decrease in
157 *ZEB1* overexpression that avoid complete MEP reversion (ref). Thus, the inducible hMEC-i-
158 *ZEB1* cell line recapitulates a progressive EMP induction and, in a lesser extent, an incomplete
159 MEP reversion.

160 rRNA 2'Ome level issued from total RNA samples was analysed using RiboMethSeq. We first
161 identified rRNA sites, whose difference in methylation level between hMEC-i-ZEB1 cells
162 treated or not with doxycycline is modified from more than |0.05| between at least two time
163 points (Figure S6). Among these 19 rRNA sites, only few sites display a biphasic variation in
164 2'Ome level during the EMP induction and MEP reversion, including the 28S_Um2402 (Figure
165 S6 and Figure2A-B). It has to be noted that the two other sites previously identified in
166 cytoplasmic and polysomal fractions, 28S_Um4590 and 28S_Am2388, are not identified as
167 variant in this kinetic, reinforcing the specific association between modulation of 2'Ome at
168 rRNA 28S_Um2402 site and *ZEB1*-induced EMT (Figure S6).

169 During the EMP induction driven by *ZEB1* overexpression, the 2'Ome level at the
170 28S_Um2402 site slightly increases concomitantly to increased expression of *ZEB1* from day

171 0 to day 3 before decreasing until day 7 (Figure 2A-B). This decreased in rRNA 2'Ome level is
172 delayed compared to that of *CDH1* mRNA, which starts to decrease as soon as day 1 (Figure
173 2A). It is also paralleled with an increased then decreased RNA expression levels of the guides
174 SNORD143 and SNORD144 (Figure 2A). The MEP reversion phase resulting from reduction
175 of ZEB1 expression however with remaining expression of mesenchymal markers, is
176 characterized with a continuum of decrease in 2'Ome level at the site 28S_Um2402 from day
177 7 to day 14 while at day 22, 2'Ome level at the site 28S_Um2402 is closed to the one observed
178 at 6 hrs (Figure 2A-B). Once again, this trend paralleled the trends of the guides SNORD143
179 and SNORD144 (Figure 2A).

180 Our data reinforce the observation that 2'Ome levels at rRNA 28S_Um2402 site, as well as
181 expression of its associated C/D snoRNAs, are decreased in ZEB1-induced mesenchymal
182 cells compared to epithelial ones. Moreover, it suggests that variation in 2'Ome level at this
183 rRNA site occurs dynamically and progressively through both the induction and reversion of
184 ZEB1 expression, concomitantly with its associated C/D snoRNAs. Overall, it indicates that
185 decrease in rRNA 2'Ome level at the 28S_Um2402 is a dynamic and reversible marker of
186 change in expression of the EMT-TF ZEB1.

187 **rRNA 2'Ome profiles distinguish mesenchymal cell lines resulting from overexpression** 188 **of distinct EMT-TFs**

189 Since rRNA 2'Ome level dynamically evolves during ZEB1-induced EMP/MEP transition, we
190 assessed whether rRNA 2'Ome profiles differ in EMT program induced by different EMT-TFs
191 (Figure 3A). rRNA 2'Ome levels was thus analysed using RiboMethSeq in a previously
192 established panel of epithelial hMEC overexpressing either ZEB1 or ZEB2 that induced
193 complete EMT, or TWIST1, which induces partial EMT^{5,23,33,34}. This panel also contains hMEC
194 cell overexpressing or not the constitutive activation of the oncogene mutant *Kras*^{V12}, either in
195 presence or absence of the individual EMT-TFs.

196 First, we identified the 20 most variable sites out of the 112 rRNA 2'Ome sites based on the
197 C-score variability among the whole cellular panel as already described³⁰. Second,
198 unsupervised clustering based on these 20 most variable sites was performed (Figure 3A).
199 Two clusters were identified based on the rRNA 2'Ome profile. The cluster 1 comprises the
200 hMEC-ZEB1 and -ZEB2 cellular models overexpressing or not *Kras*^{V12}, while the cluster 2
201 contains the hMEC-TWIST1 cell lines as well as the *Kras*^{V12} overexpressing hMEC. These
202 data suggest that rRNA 2'Ome profile can distinguish cell lines displaying either partial or
203 complete EMT. Interestingly, 2'Ome level at 28S_Um2402 rRNA site decreases in both ZEB1-
204 and ZEB2-overexpressing hMEC cell lines while it is not altered in the hMEC-TWIST1 cells,

205 suggesting that reduction of 2'Ome level at 28S_Um2402 site is specific of complete EMT
206 (Figure 3B). It has to be noted that Kras^{V12} overexpressing hMEC cell lines, either alone or in
207 presence of TWIST1, display a slight decrease in 2'Ome level at the 20 most variable rRNA
208 sites (Figure 3A-B). In addition, rRNA 2'Ome profiles were similar in ZEB1 or ZEB2 hMEC cell
209 lines overexpressing or not Kras^{V12}, suggesting that the EMT-TFs ZEB1 and ZEB2 induce
210 more change in rRNA 2'Ome profiles than Kras^{V12} alone.
211 Overall, these data support a strong correlation between complete EMT induced by the EMT-
212 TFs ZEB1 and ZEB2 and rRNA 2'Ome profiles, in particular at the 28S_Um2402 site.

213 **rRNA 2'Ome profiles distinguish epithelial from mesenchymal cell lines**

214 Two panels of cell lines with different epithelial and mesenchymal characteristics were used to
215 evaluate whether rRNA 2'Ome profile distinguish epithelial from mesenchymal cell lines
216 independently of EMT-TF overexpression. First, we analysed a panel of 11 breast cancer cell
217 lines showing distinct Claudin-low status. Indeed, Claudin-low is an aggressive breast cancer
218 subtype displaying EMT features and identified using transcriptomic profiling^{2,3,35}.
219 Unsupervised analysis of rRNA 2'Ome composed of the 112 sites shows that rRNA 2'Ome
220 profiles distinguish the non Claudin-low from Claudin-low cell lines (Figure 3C). In addition, a
221 significant decrease in 2'Ome level at the 28S_Um2402 rRNA sites was observed in Claudin-
222 low compared to non Claudin-low breast cancer cell lines, as observed in ZEB1- and ZEB2-
223 overexpressing hMEC cell lines (Figure 3D). Second, we analysed 2'Ome level of
224 28S_Um2402 site in a panel of 6 melanocyte cell lines showing either proliferative and
225 differentiated status (*i.e.*, epithelial features) or undifferentiated and mesenchymal-like
226 phenotypes (*i.e.*, mesenchymal features). Like in breast, mesenchymal-like melanocytes
227 display lower levels of 2'Ome at 28S_Um2402 than proliferative melanocytes, indicating that
228 this trait is independent of the tissue type (Figure 3E). Interestingly, undifferentiated
229 melanocytes express high level of ZEB1 while differentiated melanocytes express high level
230 of ZEB2^{36,38}, indicating that rRNA 2'Ome level of 28S_Um2402 is either dependent upon ZEB1
231 or of undifferentiated state of mesenchymal-like phenotypes. Overall, these data indicate that
232 rRNA 2'Ome profiles can distinguish epithelial from mesenchymal features in a tissue type-
233 dependent manner.

234 **Discussion**

235 In contrast to what expected, it appears that the ribosome is a plastic entity, whose composition
236 varies depending on the physio-pathological context^{12,13}. While modulation in ribosome

237 composition has been largely described at ribosomal protein level, the last 7 years revealed a
238 heterogeneity in ribosome composition that arises from the rRNA itself, through modulation of
239 chemical modifications, in particular of the most abundant one, the rRNA 2'Ome¹⁶. However,
240 although heterogeneity in rRNA 2'Ome has been reported during animal development or in
241 cancer, few studies reported modulation of rRNA 2'Ome profile in adulthood-related
242 physiological process. Due to the high diversity in the individual EMT programs and the role of
243 EMT in the cyclic life of female organs⁴⁻⁶, heterogeneity in EMT programs can be associated
244 with heterogeneity in ribosome composition in adult human-beings. Here, we demonstrated
245 that rRNA 2'Ome profile dynamically evolves during EMT in a C/D box snoRNA-dependent
246 manner, however differentially depending on the EMT-TF driving this transdifferentiation.
247 Using different EMT-related cellular models, we report that rRNA 2'Ome profile distinguishes
248 epithelial from mesenchymal cells. In particular, we identified a single rRNA 2'Ome site,
249 28S_Um2402, whose level is decreased in the actively translating ribosomes of mesenchymal
250 cells compared to epithelial ones. The specificity of 28S_Um2402 change in EMT is supported
251 by three observations. First, the lack of change in both ribosome biogenesis and expression
252 of the protein components of the rRNA 2'Ome complex is coherent with the observation that
253 no drastic change occurs in the global rRNA 2'Ome profile during EMT. Indeed, several studies
254 demonstrated that alteration in the protein components of the rRNA 2'Ome complex more likely
255 associates with alteration of 2'Ome at several rRNA sites rather than a single one^{16,19,20,22,37}.
256 Second, overexpression of the mutant *Kras*^{V12} does not alter level of 2'Ome at 28S_Um2402
257 either alone or in association with to the EMT-TF ZEB1. The oncogenic *Kras*^{V12} only slightly
258 affects the rRNA 2'Ome profile. This is coherent with the observation that overexpression of
259 the oncogene *c-Myc* significantly affects only three of the 112 rRNA 2'Ome sites²¹. However,
260 it has been shown that 2'Ome level at 28S_Um2402 is altered in response to *c-Myc*
261 overexpression in contrast to what observed with *Kras*^{V12}, suggesting that modulation of 2'Ome
262 at rRNA 28S_Um2402 might be dependent upon the oncogenic driver²¹. Finally, the
263 concomitant decreased expression of the guide C/D box snoRNAs, *SNORD143* and
264 *SNORD144*, compared to a panel of non-altered C/D box snoRNAs reinforces the specificity
265 of 28S_Um2402 in EMT. However, the mechanism by which *SNORD143* and *SNORD144*
266 expression is modulated during EMT remains to be deciphered. The disconnection between
267 these two C/D box snoRNAs and their common host gene *SEC31A* suggests that decrease in
268 *SNORD143* and *SNORD144* levels occurs post-transcriptionally and independently from their
269 gene host. This hypothesis is supported by the fact that no E-box has been identified through
270 bioinformatics prediction, suggesting that transcription of *SEC31A* is not dependent upon EMT-
271 TFs^{4,5,39,40}.

272 We can hypothesize that alternative splicing might regulate negatively the expression of
273 SNORD143 and SNORD144. Indeed, alternative splicing is key in EMT commitment, a specific
274 EMT alternative splicing reprogramming has been shown in hMEC expressing TWIST1⁴¹.
275 Interestingly, an important splicing factor involved in the acquisition of mesenchymal traits is
276 RBFOX2, and this factor was also shown to target *SEC31A* pre-mRNA for inclusion of new
277 exons^{42,45}. Today, only two C/D box snoRNAs have been involved in EMT. In lung cancer cell
278 lines, SNORD78 and SNORD46 overexpression promote EMT although their associations with
279 change in rRNA 2'Ome levels have not been addressed^{43,44,46,48}. In our study, the 2'Ome levels
280 at their associated rRNA sites, 28S_Gm4593 and 28S_Am3739 respectively, do not change,
281 reinforcing the specificity of SNORD143/144 and 28S_Um2402 in EMT.

282 To our knowledge, no study ever determines the role of 28S_Um2402. Since change in 2'Ome
283 level was observed in polysomes, it suggests a role of this particular rRNA 2'Ome in regulating
284 intrinsic translational activity of ribosome. The 28S_Um2402 site is located at the surface of
285 the large 60S ribosomal subunit closed to the exit peptide tunnel and we may hypothesise that
286 change in ribosome composition might contribute regulate to co-translational protein folding,
287 an emerging function of ribosome²⁷⁻²⁹. This 2'Ome site can also affect additional functions of
288 ribosome, including regulation of specific mRNA translation. This notion is supported by our
289 observation that ZEB1 overexpression induces a translational reprogramming as important as
290 a transcriptional reprogramming (Morin et al, back paper, submitted). Moreover, it appears that
291 the change in rRNA 2'Ome observed in EMT co-occurs with change in ribosomal protein
292 composition. Indeed, we showed that the proportion of RPL36A-containing ribosomes are
293 increased in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells (Morin et al, back paper, submitted).
294 Whether RPL36A-containing ribosomes are the ones lacking 2'Ome at 28S_Um2402 remain
295 an on-going challenge. Overall, our data demonstrate that composition of the translational
296 machinery is changed during EMT. It has to be kept in mind that heterogeneity in ribosome
297 composition involved at least four molecular layers (*i.e.*, 80 ribosomal proteins, 112 rRNA
298 2'Ome, 95 rRNA pseudouridylation and 12 rRNA base modifications) that might result in a
299 huge number of combinatory and thus represent a reservoir of specific molecular traits
300 underexploited.

301 Heterogeneity in the EMT programs has been reported. Indeed, EMT is involved in numerous
302 physiological processes, including organ formation and homeostasis, but also in human
303 diseases, such as developmental defects, fibrosis and cancer⁴⁻⁶. In addition, it is driven by
304 several signalling pathways resulting in distinct repertoires of EMT-TF expression pattern.
305 Finally, EMT is a dynamic and reversible process associated with intermediate states that
306 result in co-existence of different subcellular populations. Thus, depicting the full diversity in

307 EMT programs is key to improve our mechanistic understanding of change in EMT-related cell
308 identity. Although we observed that 2'Ome level is decreased at rRNA 28S_Um2402 site by
309 comparing stable epithelial or mesenchymal related stages in different tissue types, it
310 nevertheless appears that this decrease is not observed in partial EMT induced by the EMT-
311 TF TWIST1 nor at early time of EMP induction by ZEB1 overexpression where transition
312 already started but being not completed. These observations suggest that decrease in 2'Ome
313 level at 28S_Um2402 might be a novel molecular mark of complete EMT.
314 Altogether, our data showed for the first time that epithelial and mesenchymal ribosomes
315 exhibit distinct composition at rRNA epitranscriptomics level. Such changes in ribosome
316 composition might thus finely optimize the ribosome activities to translate with efficiency and
317 specificity the epithelial and mesenchymal transcriptomes during EMT transition. The fine-
318 tuning of ribosome composition can be a novel source of molecular trait to depict the diversity
319 in EMT programs.

Materials and methods

Cell lines

The primary human mammary epithelial cells (hMEC) were used to derive all isogenic EMT-related cellular models as previously reported²³. Briefly, commercial hMEC (Lonza) were first immortalized through stable hTERT overexpression (hMEC throughout the manuscript) prior lentiviral transduction to allow stable or inducible overexpression of distinct EMT-TFs (murine ZEB1, human ZEB2 and TWIST1), alone or in combination to an active mutant form of the oncogene Kras (Kras^{V12}). hMEC cellular models were maintained in DMEM-F12 (Gibco) supplemented with 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10 ng/mL EGF, 0.3 U/mL insulin, 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL streptomycin and 100 units/mL of penicillin. Selective pressure was maintained with the corresponding antibiotic: hMEC-EMT-TFs, puromycin; hMEC-Kras^{V12}, neomycin. Inducible expression of ZEB1 was promoted using 1 µg/mL doxycycline. Culture conditions of additional cell lines are provided in the Supplementary Information section.

Subcellular fractionation

hMEC-derived cell lines were seeded at 10⁷ cells in 15 cm dish for 24 hrs prior incubation for 15 min with 100 µg/ml cycloheximide (CHX). Cytosolic fractions were prepared in lysis buffer (20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 4.5% sucrose, 0.5 mM DTE and 100 µg/ml CHX) by mechanical lysis using the PreCellys device (Ozyme) and two successive 10 min

centrifugation at 1,000 and 12,000 g to pellet nucleus then mitochondria. Two mg of cytosolic fraction quantified by Bradford dosage were loaded onto a 10-40% sucrose gradient and sedimented by ultra-centrifugation at 40,000 rpm for 2 hrs at 4°C using SW41 rotor on L7-55 ultracentrifuge (Beckman). Gradient collection and absorbance profiles were generated at 254 nm using an ISCO UA-6 detector. Polysomal fractions were pooled for further RNA extraction.

RNA extraction and RT-qPCR

Polysomal, cytosolic and total RNA was purified using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) and RNA pellet resuspended in RNase-free water. Reverse transcription was performed on 200 ng of purified RNA using the PrimeScript RT kit (Takara), which allows reverse transcription of poly-A containing RNAs (2.5 μ M oligo dT primers) and non-poly-A containing RNAs, such as snoRNAs (5 μ M random 6-mer primers). Gene expression levels were quantified by real-time qPCR using either LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) on LC96 device or Master Mix 2X EvaGreen (BioRad) using BioMarkHD device (StarLab) as previously described⁴⁷. Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method⁴⁹, 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.

RiboMethSeq

rRNA 2'Ome was profiled at the 112 sites using 100 ng of RNA by RiboMethSeq. Briefly, presence of 2'Ome protects the phosphodiester bond located at the 3' of the methylated site from alkaline hydrolysis. Thus, presence of 2'Ome 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 , allowing to calculate 2'Ome level at the corresponding site (or C-score). RiboMethSeq was performed as previously described using Illumina technology at either the EpiRNA-Seq platform of Lorraine University or NGS platform of CRCL^{30,51}. After sequencing, adapter sequences were trimmed off raw reads using Trimmomatic, the extracted reads were aligned on a human rRNA sequence (NR_046235) using Bowtie 3, and 5' and/or 3' end reads were counted at each rRNA nucleotide position (<https://github.com/RibosomeCRCL/ribomethseq-nf>). Using the rRMSAnalyzer package (<https://github.com/RibosomeCRCL/rRMSAnalyzer>), quality-control was performed to identify putative outlier, adjustment of end read counts was applied using CombatSeq algorithm when required, C-scores were computed (flanking window of +/- 6 nucleotides), identification of the

most variable rRNA 2’Ome sites was performed using C-scores interquartile range (IQR) and data visualisation was drawn.

Statistical analyses

Statistical analyses and graphical representation were performed using either GraphPad Prism v9.4.3 software (GraphPad Software, Inc) or R studio v4.0 with the rRMSAnalyzer package³⁰. To determine significant difference in two biological conditions, Mann-Whitney t tests were performed on independent biological replicates. Unsupervised data analysis was performed using hierarchical clustering (Manhattan distance and Ward’s linkage method) or principal component analysis (PCA). A p-value < 0.05 was considered to be statistically significant. Regarding the rRNA 2’Ome, in addition to a significant p-value, a Δ C-score greater than |0.05| was considered for identifying differentially methylated rRNA 2’Ome sites, the Δ C-score corresponding to the difference between two groups.

Availability of datasets

The generated RiboMethSeq data are available in the GEO profile (GSEXXX, token for reviewer access: XXX). The datasets include the fastq of each sample, a C-score matrix for each cohort after batch effect adjustment using ComBat-seq and a matrix summarizing the biological data.

Supplemental Information

Supplemental information is provided.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Thierry Dubois (Institut Curie, France) for generously providing panel of breast cancer cell lines; and platforms’ staffs that have not been referred as co-authors: NGS EpiRNA-Platform (Vandoeuvre-les-Nancy, France), Cancer genomic NGS Platform (CRCL, Lyon, France), Gilles Thomas Bioinformatics Platform (Lyon, France), CIQLE (Lyon, France), Cell imaging Platform (CRCL, Lyon, France).

Author contributions

CM, HP, FNVL, CI, APM, VMarchand, MC, JA, VA and FC performed and analysed experiments. HP, ET, HP, ET, YM, RP, AF and AV performed bioinformatics analyses. CM, HP, FNVL and VM analysed and interpreted the data. APM and AP provided hMEC-derived cellular models. VM shaped the research question and coordinated the project. JJD, CML and VM supervised the daily experiments. CM and VM wrote the first draft of the manuscript. All authors contribute to the final version of the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare that there have no competing interests.

Funding

This study was funded by PAIR Sein program (RiboTEM, ARC_INCa_LNCC_7625), INCa (PRT-K EMT-CoNCEPT, K17_2018-024; PLBio MARACAS, PLBIO19-178), SIRIC program (INCa-DGOS-Inserm_12563, LyRICAN), LabEx program (DEVweCAN). HP, CM and FNVL were recipients of PhD fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer. FNVL was 4th year PhD fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.

References

1. 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. 10.1038/s41580-018-0080-4.
2. Pommier, R.M., Sanlaville, A., Tonon, L., Kielbassa, J., Thomas, E., Ferrari, A., Sertier, A.S., Hollande, F., Martinez, P., Tissier, A., *et al.* (2020). Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution. *Nat. Commun.* *11*, 1–12. 10.1038/s41467-020-17249-7.
3. Fougner, C., Bergholtz, H., Norum, J.H., and Sørlie, T. (2020). Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat. Commun.* *11*, 1787. 10.1038/s41467-020-15574-5.
4. Nieto, M.A., Huang, R.Y.Y.J., Jackson, R.A.A., and Thiery, J.P.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* *166*, 21–45. 10.1016/j.cell.2016.06.028.
5. Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., *et al.* (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 341–352. 10.1038/s41580-020-0237-9.
6. Morin, C., Moyret-Lalle, C., Mertani, H.C., Diaz, J.-J., and Marcel, V. (2022). Heterogeneity and dynamic of EMT through the plasticity of ribosome and mRNA translation. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* *1877*, 188718. 10.1016/J.BBCAN.2022.188718.
7. Akhmetkaliyev, A., Alibrahim, N., Shafiee, D., and Tulchinsky, E. (2023). EMT/MET plasticity in cancer and Go-or-Grow decisions in quiescence: the two sides of the same coin? *Mol. Cancer* *22*, 90. 10.1186/S12943-023-01793-Z.
8. Pastushenko, I., and Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* *29*, 212–226. 10.1016/J.TCB.2018.12.001.
9. Espada, J., Peinado, H., Lopez-Serra, L., Setién, F., Lopez-Serra, P., Portela, A., Renart, J., Carrasco, E., Calvo, M., Juarranz, A., *et al.* (2011). Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context. *Nucleic Acids Res.* *39*, 9194–9205. 10.1093/nar/gkr658.
10. 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.
10.1016/j.ccr.2009.03.017.
11. Makhtar, W.R.W., Browne, G., Karountzos, A., Stevens, C., Alghamdi, Y., Bottrill, A.R., Mistry, S., Smith, E., Bushel, M., Pringle, J.H., *et al.* (2017). Short stretches of rare codons regulate translation of the transcription factor ZEB2 in cancer cells. *Oncogene* 36, 6640. 10.1038/ONC.2017.273.
 12. Genuth, N.R., and Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: From genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* 19, 431–452. 10.1038/s41576-018-0008-z.
 13. Venezia, N.D., 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. 10.3390/ijms20051226.
 14. Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* 27, 344–351. 10.1016/S0968-0004(02)02109-6.
 15. Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Yamauchi, Y., Hirota, K., Nakayama, H., Takahashi, N., *et al.* (2018). Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res.* 46, 9289. 10.1093/NAR/GKY811.
 16. Jaafar, M., Paraqindes, H., Gabut, M., Diaz, J.-J., Marcel, V., and Durand, S. (2021). 2’O-Ribose Methylation of Ribosomal RNAs: Natural Diversity in Living Organisms, Biological Processes, and Diseases. *Cells* 10, 1948. 10.3390/CELLS10081948.
 17. Marcel, V., Kielbassa, J., Marchand, V., Natchiar, K.S., Paraqindes, H., Nguyen Van Long, F., Ayadi, L., Bourguignon-Igel, V., Lo Monaco, P., Monchiet, D., *et al.* (2020). Ribosomal RNA 2’O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer* 2. 10.1093/NARCAN/ZCAA036.
 18. Krogh, N., Asmar, F., Côme, C., Munch-Petersen, H.F., Grønbæk, K., and Nielsen, H. (2020). Profiling of ribose methylations in ribosomal RNA from diffuse large B-cell lymphoma patients for evaluation of ribosomes as drug targets. *NAR Cancer* 2. 10.1093/NARCAN/ZCAA035.
 19. 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. 10.1016/J.CCR.2013.08.013.
 20. 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. U. S. A.* *114*, 12934. 10.1073/PNAS.1707674114.
21. Jansson, M.D., Häfner, S.J., Altinel, K., Tehler, D., Krogh, N., Jakobsen, E., Andersen, J. V., Andersen, K.L., Schoof, E.M., Ménard, P., *et al.* (2021). Regulation of translation by site-specific ribosomal RNA methylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *28*, 889–899. 10.1038/s41594-021-00669-4.
 22. Zhou, F., Aroua, N., Liu, Y., Rohde, C., Cheng, J., Wirth, A.K., Fijalkowska, D., Göllner, S., Lotze, M., Yun, H., *et al.* (2022). A Dynamic rRNA Ribomethylome Drives Stemness in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* *13*, 332. 10.1158/2159-8290.CD-22-0210.
 23. 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*, 1002723. 10.1371/JOURNAL.PGEN.1002723.
 24. Klinge, S., and Woolford, J.L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 116. 10.1038/S41580-018-0078-Y.
 25. Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., and Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* *126*, 4815–4821. 10.1242/jcs.111948.
 26. Belin, S., Hacot, S., Daudignon, L., Therizols, G., Pourpe, S., Mertani, H.C., Rosa-Calatrava, M., and Diaz, J.-J. (2010). Purification of Ribosomes from Human Cell Lines. *Curr. Protoc. Cell Biol.* *49*, 3.40.1–3.40.11. 10.1002/0471143030.cb0340s49.
 27. Ahn, M., Włodarski, T., Mitropoulou, A., Chan, S.H.S., Sidhu, H., Plessa, E., Becker, T.A., Budisa, N., Waudby, C.A., Beckmann, R., *et al.* (2022). Author Correction: Modulating co-translational protein folding by rational design and ribosome engineering. *Nat. Commun.* *13*, 1–1. 10.1038/s41467-022-33270-4.
 28. Guzman-Luna, V., Fuchs, A.M., Allen, A.J., Staikos, A., and Cavagnero, S. (2021). An intrinsically disordered nascent protein interacts with specific regions of the ribosomal surface near the exit tunnel. *Commun. Biol.* *4*, 1–17. 10.1038/s42003-021-02752-4.
 29. Liutkute, M., Samatova, E., and Rodnina, M. V. (2020). Cotranslational Folding of Proteins on the Ribosome. *Biomolecules* *10*, 97. 10.3390/BIOM10010097.
 30. Paraqindes, H., Mourksi, N.-E.-H., Ballesta, S., Hedjam, J., Bourdelais, F., Fenouil, T., Picart, T., Catez, F., Combe, T., Ferrari, A., *et al.* (2023). IDHwt and IDHmut adult-type diffuse gliomas display distinct alterations in ribosome biogenesis and 2’O-methylation of ribosomal RNA. *Neuro. Oncol.* 10.1093/NEUONC/NOAD140.

31. Boisvert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585. 10.1038/nrm2184.
32. Bergeron, D., Paraqindes, H., Fafard-Couture, É., Deschamps-Francoeur, G., Faucher-Giguère, L., Bouchard-Bourelle, P., Elela, S.A., Catez, F., Marcel, V., and Scott, M.S. (2023). snoDB 2.0: an enhanced interactive database, specializing in human snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* **51**, D291–D296. 10.1093/NAR/GKAC835.
33. Brabletz, S., Schuhwerk, H., Brabletz, T., and Stemmler, M.P. (2021). “Cancer Reviews 2021” series: Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *EMBO J.* **40**. 10.15252/EMBJ.2021108647.
34. Ye, X., Tam, W.L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Ng Eaton, E., and Weinberg, R.A. (2015). Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **525**, 256–260. 10.1038/nature14897.
35. 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. 10.1186/bcr2635.
36. Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., sborne, 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. 10.1016/J.CCR.2013.08.018.
37. Zhou, F., Liu, Y., Rohde, C., Pauli, C., Gerloff, D., Köhn, M., Misiak, D., Bäumer, N., Cui, C., Göllner, S., *et al.* (2017). AML1-ETO requires enhanced C/D box snoRNA/RNP formation to induce self-renewal and leukaemia. *Nat. Cell Biol.* **19**, 844–855. 10.1038/ncb3563.
38. Tang, Y., Durand, S., Dalle, S., and Caramel, J. (2020). EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers (Basel)*. **12**, 2154. 10.3390/CANCERS12082154.
39. Broos, S., Soete, A., Hooghe, B., Moran, R., van Roy, F., and De Bleser, P. (2013). PhysBinder: improving the prediction of transcription factor binding sites by flexible inclusion of biophysical properties. *Nucleic Acids Res.* **41**, W531–W534. 10.1093/NAR/GKT288.
40. Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933–2942. 10.1093/BIOINFORMATICS/BTI473.
41. Shapiro, I.M., Cheng, A.W., Flytzanis, N.C., Balsamo, M., Condeelis, J.S., Oktay,

-
- M.H., Burge, C.B., and Gertler, F.B. (2011). An EMT–Driven Alternative Splicing Program Occurs in Human Breast Cancer and Modulates Cellular Phenotype. *PLoS Genet.* 7, 1002218. 10.1371/JOURNAL.PGEN.1002218.
42. Paterson, H.A.B., Yu, S., Artigas, N., Prado, M.A., Haberman, N., Wang, Y.F., Jobbins, A.M., Pahita, E., Mokochinski, J., Hall, Z., *et al.* (2022). Liver RBFOX2 regulates cholesterol homeostasis via *Scarb1* alternative splicing in mice. *Nat. Metab.* 4, 1812–1829. 10.1038/s42255-022-00681-y.
43. Mourksi, N.-E.-H., Morin, C., Fenouil, T., Diaz, J.-J., and Marcel, V. (2020). snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management. *Cells* 9, 541. 10.3390/cells9030541.
44. Puppo, M., Jaafar, M., Diaz, J.J., Marcel, V., and Clézardin, P. (2022). MiRNAs and snoRNAs in Bone Metastasis: Functional Roles and Clinical Potential. *Cancers (Basel)*. 15, 242. 10.3390/CANCERS15010242.
45. Roy Burman, D., Das, S., Das, C., and Bhattacharya, R. (2021). Alternative splicing modulates cancer aggressiveness: role in EMT/metastasis and chemoresistance. *Mol. Biol. Rep.* 48, 897–914. 10.1007/S11033-020-06094-Y.
46. Zheng, D., Zhang, J., Ni, J., Luo, J., Wang, J., Tang, L., Zhang, L., Wang, L., Xu, J., Su, B., *et al.* (2015). Small nucleolar RNA 78 promotes the tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34. 10.1186/S13046-015-0170-5.
47. Nguyen Van Long, F., Lardy-Cleaud, A., Carène, D., Rossoni, C., Catez, F., Rollet, P., Pion, N., Monchiet, D., Dolbeau, A., Martin, M., *et al.* (2022). Low level of Fibrillarin, a ribosome biogenesis factor, is a new independent marker of poor outcome in breast cancer. *BMC Cancer* 22, 1–12. 10.1186/S12885-022-09552-X/FIGURES/3.
48. Gong, J., Li, Y., Liu, C. jie, Xiang, Y., Li, C., Ye, Y., Zhang, Z., Hawke, D.H., Park, P.K., Diao, L., *et al.* (2017). A Pan-cancer Analysis of the Expression and Clinical Relevance of Small Nucleolar RNAs in Human Cancer. *Cell Rep.* 21, 1968–1981. 10.1016/J.CELREP.2017.10.070.
49. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. 10.1006/METH.2001.1262.
50. Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645. 10.1038/nature14427.
51. Marchand, V., Ayadi, L., El Hajj, A., Blanloeil-Oillo, F., Helm, M., and Motorin, Y. (2017). High-throughput mapping of 2'-O-Me residues in RNA using next-generation sequencing (Illumina ribomethseq protocol). *Methods Mol. Biol.* 1562, 171–187.

10.1007/978-1-4939-6807-7_12/COVER.

For review only

Figure legends

Figure 1. Translationally active ribosomes display different rRNA 2'Ome profiles between epithelial cells and ZEB1-induced mesenchymal ones. (A-B) rRNA 2'Ome profiling. Comparison of rRNA 2'Ome levels between hMEC epithelial cells and hMEC-ZEB1 mesenchymal ones was performed using RiboMethSeq in cytoplasm (*i.e.*, mature ribosomes) (A) and polysomes (*i.e.*, translationally active ribosomes) (B). Volcano plots show the difference in the median C-score (*i.e.*, 2'Ome level) for the 112 known rRNA 2'Ome sites. Statistical difference has been set at 95% confidence (p -value < 0.05) and biological one at 5% difference in median C-score (Δ C-score > |0.05|). **(C)** Localization of the rRNA 28S_Um2402 site on human ribosome. The rRNA 28S_Um2402 site is located on the large 60S ribosomal subunit at the surface of the exit peptide tunnel (EPT) (PDB 4UG0 structure; ⁵⁰). Blue: ribosomal proteins; orange: rRNAs; pink: initiator methionine tRNA (Met-itRNA); red: 28S_Um2402 site. **(D-F)** RNA levels in hMEC-ZEB1 mesenchymal cells compared to hMEC epithelial ones. Relative RNA levels of snoRD guides of 28S_Um2402, SNORD143 (D) and SNORD144 (E), and their common host gene SEC31A (F) were quantified by RTqPCR. Each dot represents a biological replicate (n=4). ****: p -value < 0.0001; ***: p -value < 0.001.

Figure 2. Levels of 2'Ome at rRNA 28S_Um2402 site and expression of its associated guide snoRNAs co-evolve during the dynamic of ZEB1-induced EMP/MEP. (A) Summary of RNA and 2'Ome level evolution during the course of EMP/MEP. In the hMEC epithelial cells, expression of the EMT-TF ZEB1 was controlled by doxycycline to mimic EMP induction followed by MEP reversion. Expression of RNA and 2'Ome levels was monitored by RTqPCR and RiboMethSeq, respectively. **(B)** Dynamic of the 28S_Um2402 C-score during ZEB1-induced EMP/MEP. Difference in C-score between untreated and doxycycline-treated hMEC-i-ZEB1 cells is shown during the course of EMP induction and MEP reversion.

Figure 3. rRNA 2'Ome profile distinguish epithelial from mesenchymal cell lines. (A) Clustering of EMT-TF-overexpressing hMEC cell lines based on their most variable rRNA 2'Ome sites. A panel of hMEC-derived cell lines overexpressing different EMT-TFs and/or the mutant oncogene Kras^{V12} was analysed by RiboMethSeq. The 20 most variable rRNA 2'Ome sites were identified using C-score interquartile range (IQR) prior performing an unsupervised analysis (*i.e.*, hierarchical clustering). **(B)** Comparison of the 28S_Um2402 C-score in the hMEC cell lines overexpressing different EMT-TFs and/or Kras^{V12}. Absolute C-score between the different conditions is detailed. **(C)** Clustering of a panel of breast cancer cell lines based

on the profiles of the 20 most variant rRNA 2'Ome sites. A panel of breast cancer cell lines for which Claudin-low status was previously deciphered² was analysed by RiboMethSeq and unsupervised analysis (*i.e.*, principal component analysis or PCA). **(D-E)** Comparison of the 28S_Um2402 C-score in a panel of breast cancer cell lines displaying distinct Claudin-low status (D) and in a panel of differentiated and undifferentiated melanocyte cell lines (E). A boxplot summarized the difference in absolute C-score of 28S_Um2402 site between the two conditions.

For review only

Supplementary Informations

Supplementary Materials and Methods

Panel of breast and melanocyte cell lines

All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Immortalized mammary MCF10A (ATCC CRL-10317™) cells were cultured in DMEM F12 media (Gibco, 21331020) supplemented with 5 % horse serum (Gibco, 16050-122), 1 % penicillin-streptomycin, 1 X GlutaMax, 0.02 µg/mL hEGF, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 300 mU/mL insulin and 100 ng/mL cholera toxin. EMT was induced using 5 ng/mL TGFβ for 10 days.

A panel of 11 breast cancer cell lines displaying distinct Claudin-low status was used. MDA-MB-468 and BT474 were maintained in RPMI1640 Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% streptomycin/penicillin. HCC1937, HCC70 and BT549 were cultured in similar media supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino-acids and 1 mM sodium pyruvate. CAL51, MDA-MB-157 and HS578T were maintained in DMEM Glutamax supplemented with 10% FBS and 1% streptomycin/penicillin. MDA-MB-231 was cultured in DMEM/F12 Glutamax supplemented with 10% FBS and 1% streptomycin/penicillin. MCF7 was maintained in MEM(Eagle)-L-glutamine (-) supplemented with 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin, 1% Glutamax, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino-acids and 1 mM sodium pyruvate. SUM149PT was cultured in Ham’s-F12-glutamine supplemented with 5% FBS, 10 mM Hepes, 1 µg/mL hydrocortisone and 5 µg/mL insulin. Claudin-low, PAM50 and AIMS statuses were assigned to breast cancer cell lines using the CCLE breast cancer cell lines dataset and the nine-cell-line predictor via the R package *genefu* as previously described².

A panel of 6 melanocyte cell lines displaying distinct differentiated states were used. MM001, MM0011 and MM034 correspond to proliferative melanocyte with epithelial features, while MM047, MM099 and MM165 display invasive, undifferentiated and mesenchymal-like phenotype. These cell lines were maintained in

rRNA quantification

hMEC-derived cells were seeded at $4 \cdot 10^6$ cells in 10 cm dishes for 24 hrs. Extraction of total RNA was performed on increasing cell amount (2.5, 5.0 and $7.5 \cdot 10^5$ cells) using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) and resuspended in 20 µl RNase-free water. Three different

constant volumes of the purified total RNA (2.5, 5.0 and 10.0 μ l) were then loaded on 2% agarose gel supplemented with ethidium bromide. 28S and 18S bands were revealed using UV light (Quantum ST5 V16.08G instrument, Vilber), quantified using the Image J software and normalized to the hMEC epithelial cells.

Western blotting

Cells were lysed in buffer (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 1X TBS solution containing 0.05% Tween 20 and 5% non-fat milk and incubated with primary antibodies (Table S2). Horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used for the detection of immunoreactive proteins by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare).

Electronic microscopy

Cells were seeded at $1 \cdot 10^6$ cells in 6-well plates for 24 hrs prior fixation with 2% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M sodium cacodylate buffer at room temperature for 30 min. Cells were washed three times in 0.2 M sodium cacodylate buffer, post-fixed with 2% aqueous osmium tetroxide (Sigma), dehydrated in a graded series of ethanol at room temperature, and embedded in Epon (Polysciences). After polymerization, ultrathin sections were collected on 300-mesh grids coated with Formvar (SPI Supplies) and stained with aqueous 1% uranyl acetate (SPI Supplies) and citrate (Leica Ultrastainer) before being observed on a Philips CM 120 transmission electron microscope at an acceleration voltage of 80 kV. About 25 pictures per cell lines have been analysed.

Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips and fixed in 4% of paraformaldehyde in 1X PBS before permeabilization with 0.5% Triton X-100 in 1X PBS. Primary antibodies were applied before secondary antibodies labelled with AlexaFluor488 or 555 (Molecular Probes) (Table S2). Coverslips were mounted using the Fluoromount G mounting medium (EMS). Images were acquired on a Zeiss confocal microscope (Zeiss LSM780 NLO).

Supplementary Tables

Table S1. Primer sequences.

Gene	Sequence Forward (5' to 3')	Sequence Reverse (5' to 3')
<i>CDH1</i>	CCC-GGG-ACA-ACG-TTT-ATT-AC	GCT-GCC-TCA-AGT-CAA-AGT-CC
<i>FBL</i>	CCT-GGG-GAA-TCA-GTT-TAT-GG	CCA-GGC-TCG-GTA-CTC-AAT-TTT
<i>GAPDH</i>	AGC-CAC-ATC-GCT-CAG-ACA-C	GCC-CAA-TAC-GAC-CAA-ATC-C
<i>NHP2L1</i>	GCT-ACT-GGA-CCT-CGT-TCA-GC	ACT-CAG-AGA-TGC-CCC-TGT-TG
<i>NOP56</i>	GAG-GTG-CCC-ACG-AGT-GTA-TT	TGC-TTC-CTT-CAT-GAC-ATC-CA
<i>NOP58</i>	TGA-TGG-AGG-GCA-AAA-TCA-AT	CGG-TTC-ATG-GGC-TTC-TTT-TA
<i>SEC31A</i>	GCA-AAA-TTA-CCA-GGC-TCA-TCA	CCG-GCT-TTG-CAT-AAG-TCA-AT
<i>SNAI1</i>	CAC-TAT-GCC-GCG-CTC-TTT-C	GCT-GGA-AGG-TAA-ACT-CTG-GAT-TAG-A
<i>SNAI2</i>	TGG-TTG-CTT-CAA-GGA-CAC-AT	TGA-CCT-GTC-TGC-AAA-TGC-TC
<i>SNORD35A</i>	TGA-TGT-CCT-TAT-CTC-ACG-ATG-G	TGG-CAT-CAG-CTA-AGC-CAT-T
<i>SNORD35B</i>	TGA-TGT-TTG-TTT-TCA-CGA-TGG	CCG-GCA-TCA-GTT-TTA-CCA-AG
<i>SNORD38A</i>	TCG-TGA-TGA-AAA-CTC-TGT-CCA	CCT-CAG-CCT-AAA-AGG-CTC-TC
<i>SNORD65</i>	AAA-TCA-CCC-AAA-ATA-GCT-GGA-A	TCA-GAA-AAC-CAT-AGG-TTC-ACC-A
<i>SNORD91B</i>	AGA-GCC-AAT-GAT-GTT-TTT-ATT-CAA	ACA-CAG-AAG-TTG-CAT-CAC-TGG
<i>SNORD119</i>	AAC-CTT-GAC-TGA-AGC-TGA-TGA	CTG-GAT-CTC-AGA-GTA-ATC-CTG-CT
<i>SNORD143</i>	TTT-TTC-CAC-TGC-TGT-TCA-CAT	TGT-CCT-CAT-CCA-CAT-ACA-TTA-ATC-A
<i>SNORD144</i>	TTC-ATA-TCC-AGT-GAT-TAA-ACC-TTT-TC	ATT-CAA-TAA-TCA-CAA-CGG-TTC-A
<i>TWIST1</i>	GCA-GGG-CCG-GAG-ACC-TAG	TGT-CCA-TTT-TCT-CCT-TCT-CTG
<i>VIM</i>	GAC-CAG-CTA-ACC-AAC-GAC-AAA	GAA-GCA-TCT-CCT-CCT-GCA-AT
<i>ZEB1</i>	GTG-ACG-CAG-TCT-GGG-TGT-AA	TTG-CAG-TTT-GGG-CAT-TCA-TA
<i>ZEB2</i>	GCA-AAC-AAG-CCA-ATC-CCA-G	GTT-GGG-CAC-ACT-AGC-TGG-AC

Table S2. Antibody references.

Protein	Brand, Reference	Dilution (WB)	Dilution (IF)
CDH1	BD Biosciences, 610181	1/3000	1/100
FBL	Abcam, ab1666630	1/2000	1/500
Histone H3	Abcam, ab1791	1/3000	na
KU80	Abcam, ab3715	1/2000	na
NHP2L1	Proteintech, 15802-1-AP	1/1000	na
NOP56	Bethyl, A302-720A-M	1/1000	na
NOP58	Abcam, ab155969	1/1000	na
OCLN	Abcam, ab31721	1/500	na
SNAIL-SLUG	Abcam, ab85936	1/500	na
TUBA1A	Calbiochem, CP06	1/500	na
VIM	Abcam, ab92547	1/500	na
VIM	DAKO, M0725	1/500	1/100
ZEB1	Sigma, HPA027524	1/500	na
Horse anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, 7076S	1/10000	na
Goat anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, 7074S	1/10000	na
Secondary rabbit anti-mouse StarBright Blue 700	BIO-RAD, 12004158	1/5000	na
Secondary rabbit anti-rabbit StarBright Blue 700	BIO-RAD, 12004161	1/5000	na
Alexa Fluor 555 Goat anti-Mouse	Life Technologies, A21428	na	1/1000
Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit	Life Technologies, A11008	na	1/1000

Supplementary Figure Legends

Figure S1. The hMEC epithelial cell line acquires mesenchymal traits in response to stable overexpression of ZEB1. (A) Cellular morphology in normal culture conditions. hMEC cells exhibit cell-to-cell adhesiveness whereas hMEC-ZEB1 cells display an isolated fibroblast-like morphology. (B-D) mRNA levels of EMT-related markers. Relative mRNA levels of ZEB1 (B), CDH1 (C) and VIM (D) were analyzed by RTqPCR. Compared to hMEC cells, hMEC cells overexpressing the EMT-TF ZEB1 express higher levels of both *ZEB1* and *VIM* and lower *CDH1* mRNA levels. Each dot represents a biological replicate (n=4). (E) Protein levels of EMT-related markers. Western blot shows that E-cadherin (CDH1) is detected only in hMEC cells, in contrast to vimentin (VIM) protein which is detected only in hMEC-ZEB1 cells. Biological replicates have been performed (n=2). Mean and standard deviation (in parentheses) of protein quantification are given. ****: p-value < 0.0001; **: p-value < 0.01; KU80: loading control.

Figure S2. 2'Ome level of the 28S rRNA at U2402 position decreases in the ZEB1-induced mesenchymal cells. (A) Validation of subcellular fractionation. Purity of cytoplasmic (C) and nuclear (N) fractions was assessed by Western blot and a representative image is shown. As expected in both hMEC and hMEC-ZEB1 cells, detection of histone H3 and α -tubulin is restricted to the nuclear or cytoplasmic fractions, respectively. (B, D, F) rRNA 2'Ome levels at 28S_Um2402 site. Comparison of rRNA 2'Ome levels at the 28S_Um2402 site between hMEC and hMEC-ZEB1 cells was performed using RiboMethSeq in cytoplasmic (B), polysomal (D) and total (F) RNA fractions. In the three fractions, 2'Ome levels at the site 28S_Um2402 is decreased in hMEC-ZEB1 cells compared to hMEC ones. (C) Polysome profiles. Cytoplasmic components were separated on sucrose gradient to purify polysomes (*i.e.*, mRNAs bound by mature ribosomes). A representative polysome profile out of 4 is given for hMEC (orange) and hMEC-ZEB1 (green) cells. (E) rRNA 2'Ome profiling of total RNA. Comparison of rRNA 2'Ome levels between hMEC epithelial cells and hMEC-ZEB1 mesenchymal ones was performed using RiboMethSeq in total RNA. Volcano plot shows the difference in the median C-score (*i.e.*, 2'Ome level) for the 112 known rRNA 2'Ome sites. Statistical difference has been set at 95% confidence (p-value < 0.05) and biological one at 5% difference in median C-score (Δ C-score > |0.05|).

Figure S3. Nucleolus organization and rRNA levels are similar in hMEC and hMEC-ZEB1 cell lines. (A) Nucleolus organization. Electron microscopy reveals no difference in the

nucleolus organization between the hMEC epithelial and hMEC-ZEB1 mesenchymal cells. GC: granular center; FC: fibrillar center; DFC: dense fibrillar component. **(B-D)** rRNA levels. Comparison of rRNA levels between hMEC and hMEC-ZEB1 cells was performed by loading total RNA at cell constant number on agarose gel (B) prior quantification of 28S (C) and 18S (D) bands. Similar levels of 28S and 18S rRNA levels was observed in the two cell lines. Each dot represents a biological replicate (n=4). Ns: non-significant.

Figure S4. Expression of ribosome biogenesis factors is similar in hMEC and hMEC-ZEB1 cell lines. **(A)** Cellular localization of FBL. Immunofluorescence reveals no difference in the staining of FBL between the hMEC epithelial and hMEC-ZEB1 mesenchymal cells. Green: fibrillarin; red: E-cadherin (hMEC) or vimentin (hMEC-ZEB1); blue: Hoechst. Magnification x100. **(B-H)** Expression levels of ribosome biogenesis factors. mRNA (B, D, F, H) and protein (C, E, G, I) levels were compared in hMEC and hMEC-ZEB1 cells by RTqPCR and western blot, respectively, for the four protein components of the rRNA 2'Ome complex: FBL (B-C), NHP2L1 (D-E), NOP56 (F-G) and NOP58 (H-I). No difference was observed. Each dot represents a biological replicate (n=4). A representative western blot is given (n=2). Ns: non-significant; KU80: loading control.

Figure S5. Expression levels of a panel of C/D box snoRNAs are similar in hMEC and hMEC-ZEB1 cell lines. Comparison of SNORD expression levels by RTqPCR reveals no difference in their relative expression levels between hMEC and hMEC-ZEB1 cells. Ns: non-significant.

Figure S6. 28S_Um2402 is one of the most variable rRNA 2'Ome sites during the dynamic of ZEB1-induced EMP/MEP process. The 19 most variable 2'Ome sites during the ZEB1-induced EMP/MEP process have been identified. rRNA 2'Ome sites whose difference in methylation level between hMEC-i-ZEB1 cells treated or not with doxycycline is altered from more than |0.05| between at least two time points of the kinetic were considered as “variable”. Among these 19 rRNA sites, some sites showed fluctuating variation in 2'Ome levels without consistent trend during the two phases of ZEB1-induced EMP/MEP processes and could reflect only technical noise, such as 28S_Gm3723. Others exhibit a constant but slight decrease in 2'Ome level during the two phases, including the previously identified 28S_Am2774 in polysomal fraction. Finally, some sites display a biphasic variation in 2'Ome level, including the 28S_Um2402 site.

Figure 1

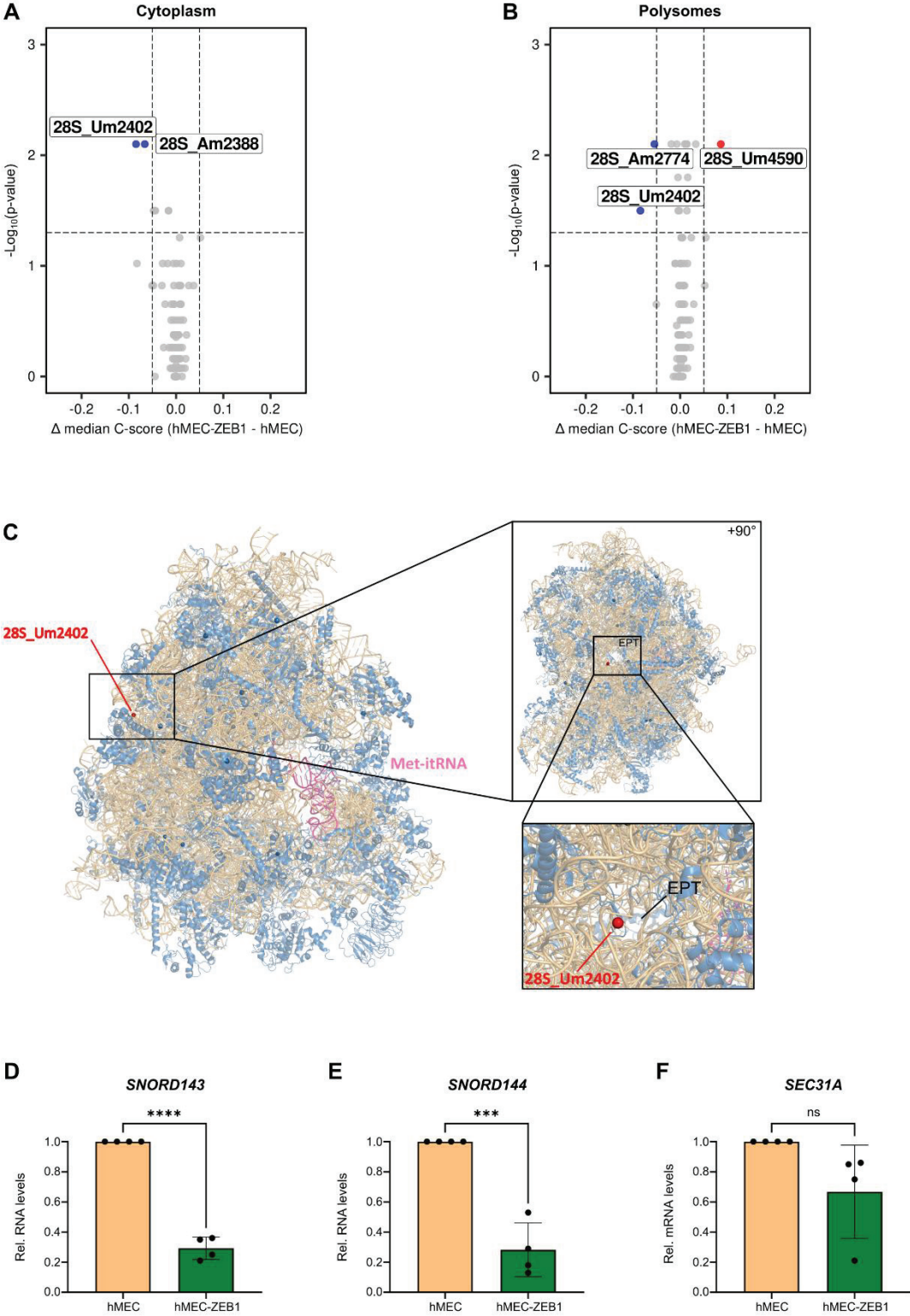


Figure 2

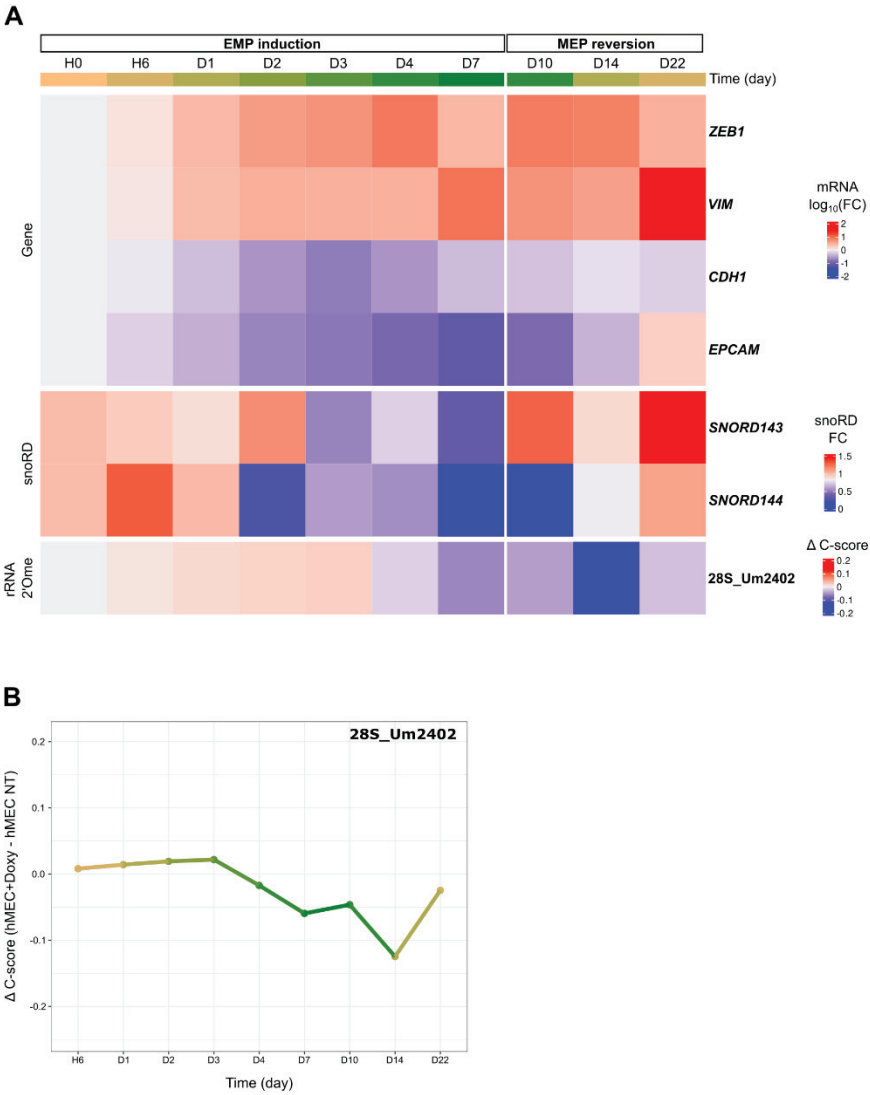


Figure 3

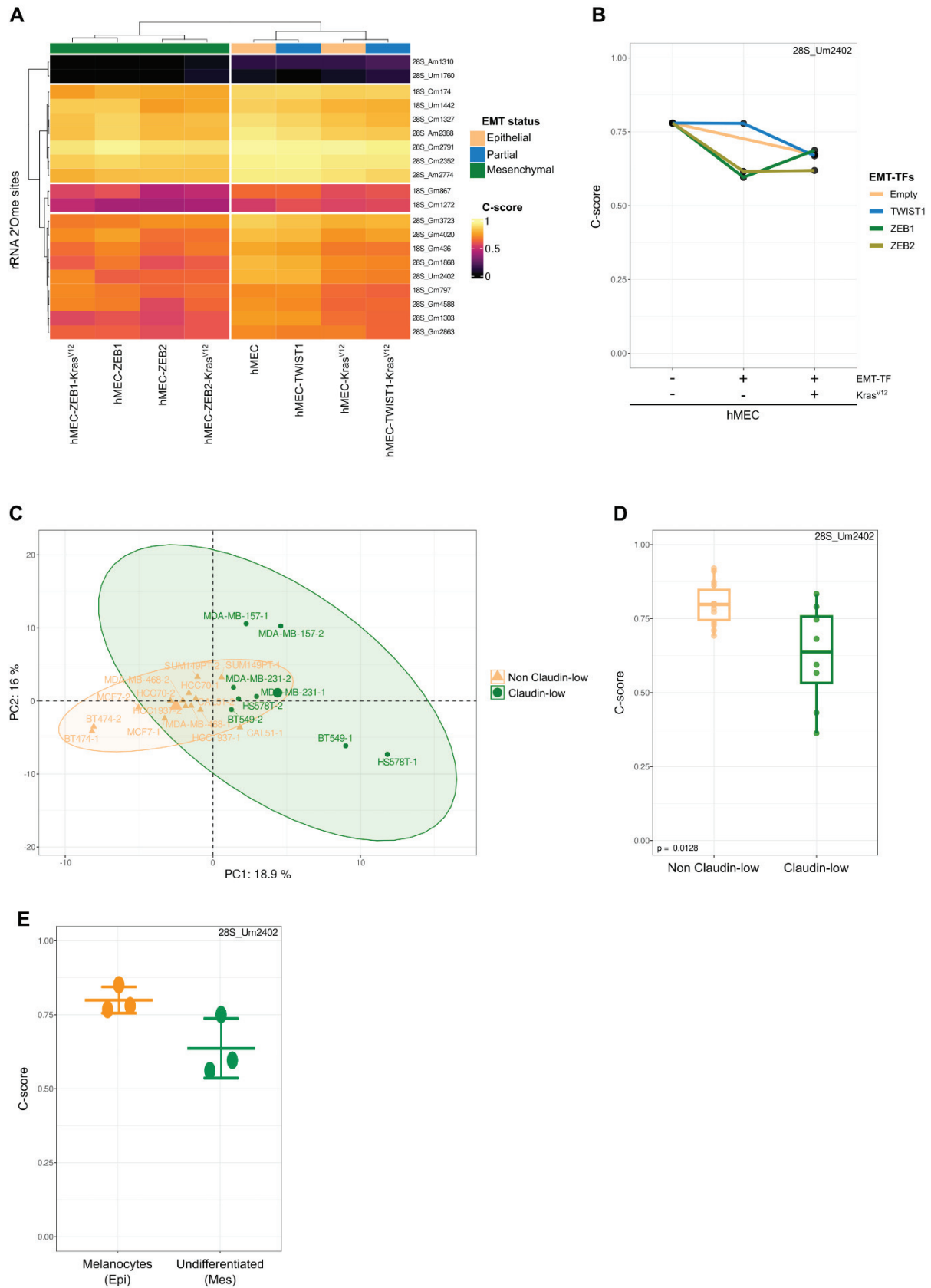


Figure S2

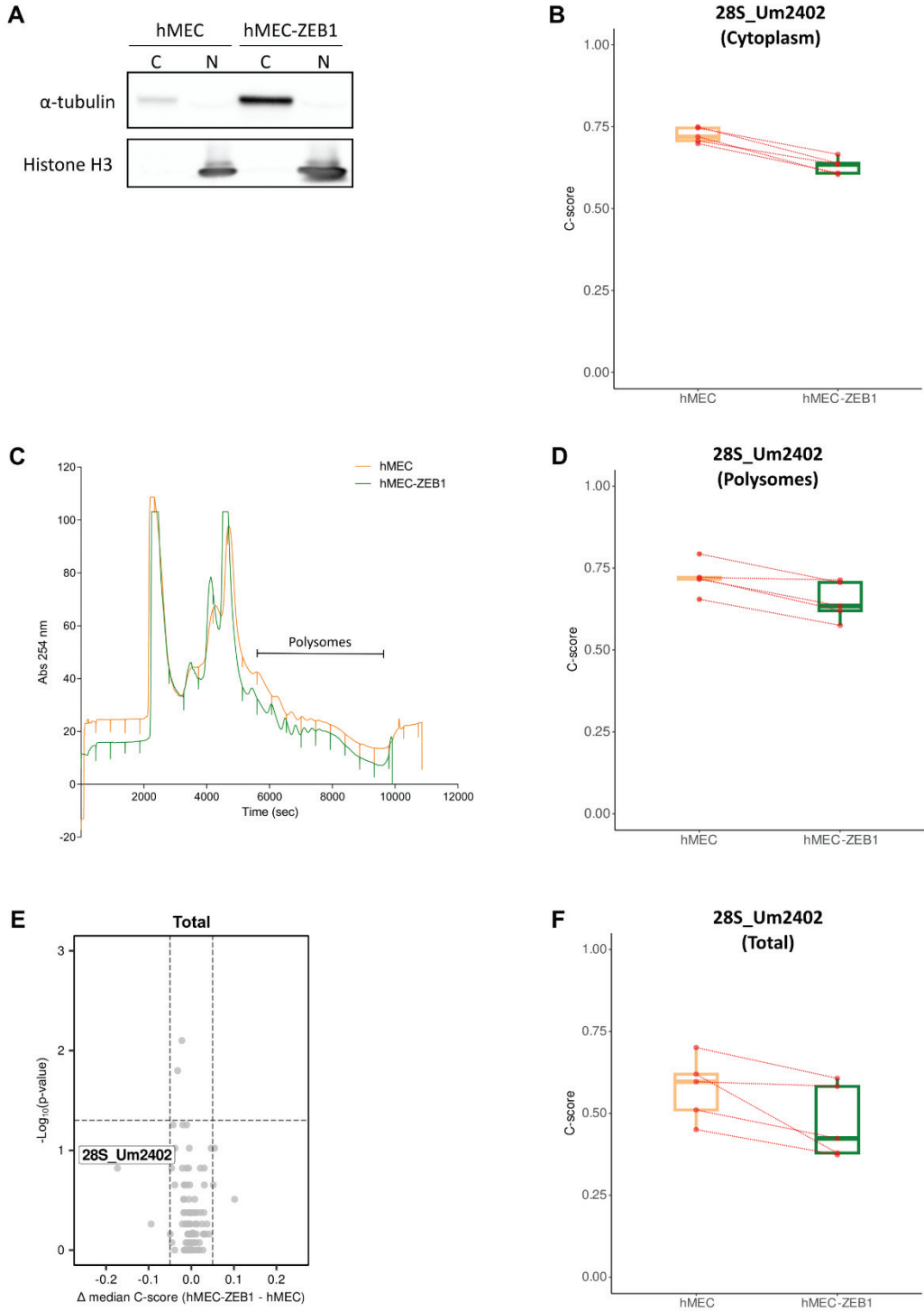


Figure S4

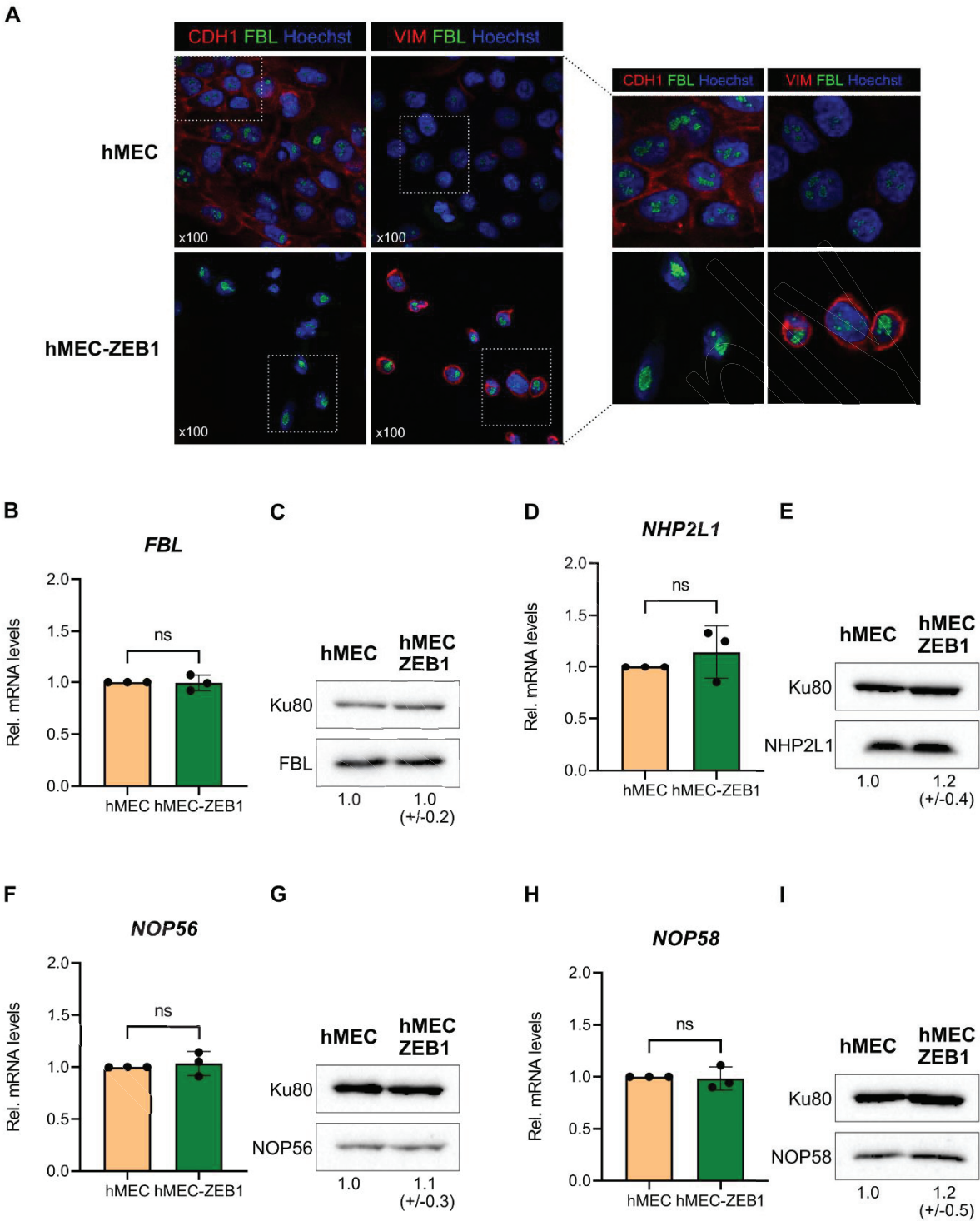


Figure S5

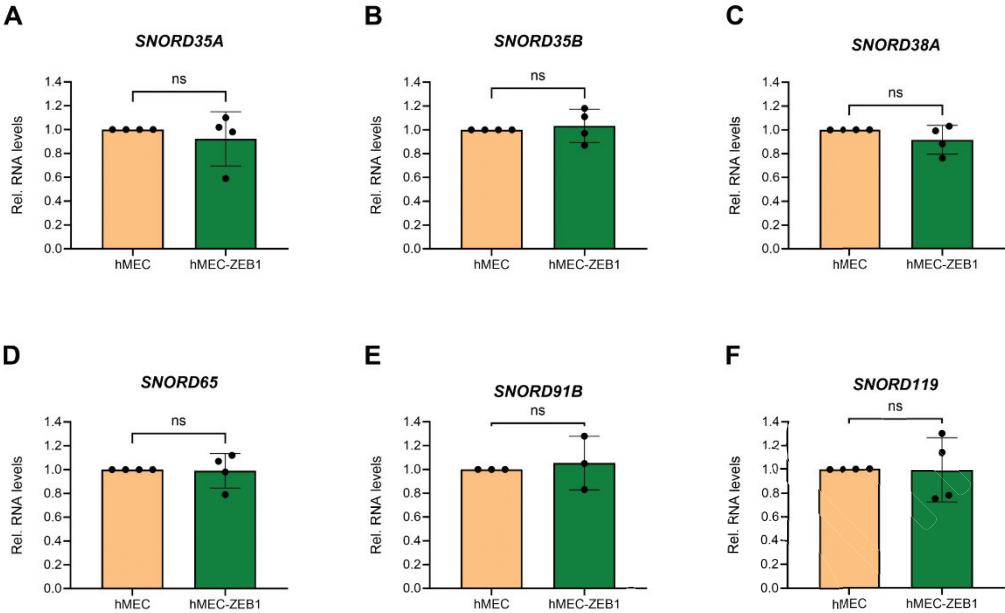
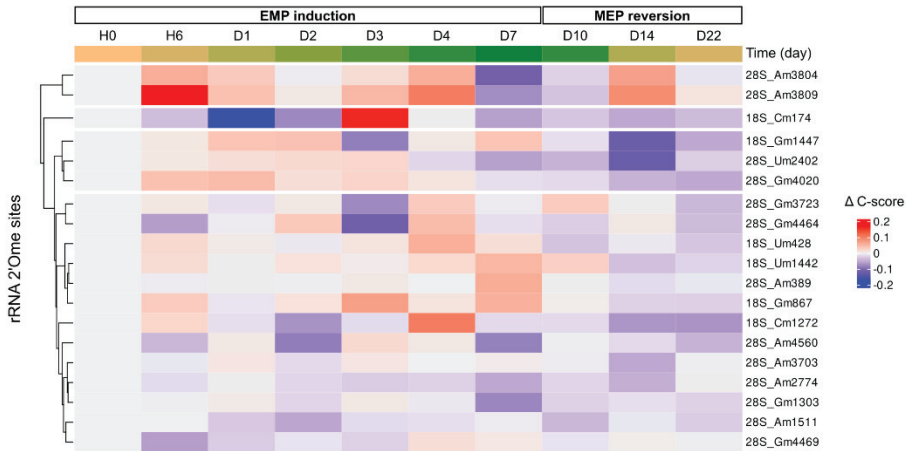


Figure S6



II. Article 2 : “Translational reprogramming during epithelial-mesenchymal transition is associated with fine-tuning of ribosome composition”

Cet article scientifique dont je suis autrice en 1^{ère} position est en cours de préparation. La version en cours du manuscrit est incluse à la suite de cette introduction.

1. Contexte

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus cellulaire dynamique et complexe dont la compréhension est principalement basée, à l’heure actuelle, sur des études épigénétiques et transcriptomiques. Or, en raison de la complexité de cette transdifférenciation cellulaire, ces approches actuelles ne permettent pas une compréhension fine et totale de mécanismes d’initiation et de maintenance de l’EMT.

L’un des aspects régulateurs les moins documentés dans l’EMT est la traduction. En effet, bien que certains articles indiquent une implication de différents mécanismes de régulation traductionnelle dans l’induction et/ou la maintenance de l’EMT, aucune donnée quantitative ne permet d’évaluer son importance. De plus, le rôle du ribosome, acteur et régulateur majeur de la traduction, n’a jamais été investigué dans ce contexte biologique.

Après avoir étudié la composition en 2’-O-ribose méthylation des ARN ribosomiques au cours de l’EMT dans le précédent manuscrit (cf. Article 1), nous proposons ici d’évaluer (i) l’apport relatif de la régulation traductionnelle par rapport à la régulation transcriptionnelle et (ii) le rôle de la composition protéique du ribosome au cours de l’EMT.

2. Résultats principaux

Dans ce manuscrit, nous présentons des données obtenues dans deux modèles cellulaires. Le premier est un modèle cellulaire épithélial humain mammaire (hMEC), surexprimant l’EMT-TF ZEB1 (hMEC-ZEB1) ou non (hMEC). Le second est le modèle cellulaire humain mammaire MCF10A, fréquemment utilisé pour l’étude de l’induction de l’EMT physiologique de type II en réponse au TGF β .

Les données de *Ribosome profiling* (*i.e.*, séquençage des ARN messagers totaux et/ou en cours de traduction dans les polysomes) obtenues dans le modèle stable hMEC/hMEC-ZEB1 nous ont permis de comparer le nombre de gène régulés transcriptionnellement et/ou traductionnellement au cours de l'EMT induite par ZEB1. Cette étude nous a ainsi permis de définir que la régulation traductionnelle est au moins aussi importante que la régulation transcriptionnelle dans ce modèle. La majorité des gènes régulés au niveau traductionnel appartiennent aux voies classiques de l'EMT (*e.g.*, migration, sécrétion, etc.) mais font également ressortir de nouvelles voies de signalisation moins documentées (*e.g.*, métabolisme, développement neuronal, etc.).

La comparaison de l'activité traductionnelle du ribosome entre les cellules hMEC et hMEC-ZEB1 montre une altération de la capacité de reconnaissance du codon STOP dans les cellules mésenchymateuses. Cette observation est corrélée à l'augmentation de la quantité de ribosomes contenant la protéine RPL36A dans les cellules mésenchymateuses hMEC-ZEB1 comparé aux cellules épithéliales hMEC. De plus, la surexpression seule de RPL36A dans les cellules épithéliales MCF10A est suffisante pour induire l'EMT (*i.e.*, changements morphologiques, modification de l'expression génique des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux). Cette démonstration de l'induction de l'EMT dépendante de RPL36A a été obtenue dans différents clones cellulaires MCF10A permettant de déterminer que ce processus est indépendant des méthylations post-traductionnelles connues de la protéine RPL36A, mais également de l'antibiotique utilisé pour la sélection clonale.

En conclusion, ce manuscrit permet de démontrer que la régulation traductionnelle au cours de l'EMT est au moins aussi importante quantitativement à la régulation transcriptionnelle. Cette observation permet aussi de mettre en évidence des voies de signalisation jusqu'alors peu documentées dans l'EMT et pourrait permettre l'émergence de nouvelles approches dans ce domaine. De plus, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la composition protéique du ribosome au cours de l'EMT : la seule altération de l'expression de la protéine RPL36A permettant l'induction de l'EMT dans le modèle cellulaire MCF10A.

3. Ma contribution

En tant que première autrice de ce manuscrit, j'ai réalisé les expériences de laboratoire, l'analyse de ces expériences ainsi que la centralisation des données et la construction des figures

présentées. En collaboration avec mes co-auteurs, j'ai également participé à la réflexion scientifique et la rédaction de ce manuscrit.

4. Manuscrit (en préparation)

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

Chloé Morin¹, Agnès Baudin-Baillieu², Flora Nguyen Van Long¹, Caroline Isaac¹, Laure Bidou², Hugo Arbes², Pauline François², Roxanne Pommier³, Annie Adrait⁴, Akari Saku¹, Stephanie Gran-Ruaz¹, Camélia Machkouri¹, Frédéric Catez¹, Anne-Pierre Morel⁵, Yohann Couté⁴, Sophie Chat⁶, Reynalt Gillet⁶, Alain Puisieux^{5,7}, Caroline Moyret-Lalle¹, Jean-Jacques Diaz¹, Olivier Namy^{2,8}, Virginie Marcel^{1,8,9,*}

¹Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Ribosome, Translation and Cancer team, Lyon, France

²Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Université Paris Saclay, Paris, France

³Synergie Lyon Cancer, Bio-Informatics Platform, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴Large scale laboratory of biology, UMR_S 1038 Inserm/CEA/Université de Grenoble Alpes, EDyP Laboratory, Grenoble, France

⁵Centre Léon Bérard

⁶Univ Rennes

⁷Institut Curie

⁸These authors contributed equally

⁹Lead contact

*Correspondance : virginie.marcel@lyon.unicancer.fr (V.M.)

Keywords

EMT, ribosome heterogeneity, translation, riboproteome, ribosome profiling, RPL36A, ZEB1, SNAIL

Abstract

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is driven by transcriptional and epigenetic reprogramming. However, it is now well established that the final step of gene expression, translation, is also key to the establishment of physiopathological phenotypes, and one of its regulators is the ribosomes themselves. Using genome-wide analyses, we report on how the translational landscape evolves and how the translational machinery rearranges itself during EMT. Ribosome profiling revealed that translation was as profoundly modulated as transcription during EMT. In addition, riboproteomics revealed an increased proportion of RPL36A-containing ribosomal particles in mesenchymal cells, indicating that ribosome composition is finely tuned during EMT. Finally, RPL36A, but not RPL19, is sufficient to induce the acquisition of mesenchymal features. Taken together, these data demonstrate that EMT is associated with both a profound translational reprogramming and changes in ribosome composition, and that a single change in ribosomal protein is sufficient to drive EMT.

1 Introduction

2 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a dynamic and often reversible process of
3 transdifferentiation that enables to generate mesenchymal cells from epithelial ones¹⁻³. Its
4 cellular hallmarks include loss of adhesiveness and polarity properties, and the acquisition of
5 a particular cytoskeletal architecture to enhance migratory properties. EMT contributes to the
6 normal organ physiology during embryogenesis and adulthood, and aberrant EMT reactivation
7 has been involved in different human diseases⁴.

8 EMT is driven by deep transcriptional reprogramming coupled to epigenetic events to maintain
9 the progression of EMT commitment during transition¹⁻³. It is dependent upon an intricate
10 network of EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs) that include different families, such
11 as the ones of ZEB (ZEB1, ZEB2), TWIST (TWIST1, TWIST2) or SNAIL (SNAIL, SLUG,
12 SNAI3). Primarily, EMT-TFs have been shown to repress *CDH1* (*i.e.*, E-cadherin) transcription
13 and activate *VIM* one (*i.e.*, Vimentin) inducing the loss of cell-cell contact of epithelial cells and
14 acquisition of motility properties^{5,6}. This transcriptional regulation is associated with an
15 epigenetic reprogramming that has been suggest to govern the stability of EMT by helping in
16 defining the residency of cells in a given phenotypic state during the transition⁷. Although
17 change in gene expression is the driving force of EMT-induced cell plasticity, only few studies
18 assessed the role of translation in EMT, one of the last steps in gene expression³. It has been
19 reported that reactivation of EMT-TFs and mesenchymal markers at translational level is
20 sufficient to promote EMT. For instance, IRES (Internal Ribosome Entry Site)-dependent
21 translation of *LAMB1* or *SNAI1* mRNAs as well as specific translation of *Dab2* or *ILEI* mRNAs
22 trigger EMT^{3,8-12}. However, comparison of transcriptional and translational reprogramming
23 occurring in EMT remains to be characterized.

24 Today, increasing amount of data support the notion that the components of the translational
25 apparatus can directly specify the translation of some mRNAs to contribute to the
26 establishment of different physio-pathological phenotypes. For example, the eukaryotic
27 initiation factor eIF3d, which stabilizes the complex including the initiator tRNA and the small
28 40S ribosomal particle, has been shown to directly regulate the translation of *c-JUN* and *BTG1*
29 mRNAs to modulate cell growth^{13,14}. Moreover, the tRNA-GluUUC promotes translation of
30 mRNAs enriched in its cognate codons, such as *EXOSC2* and *GRIPAP1*, and in turn,
31 contributes to the invasion of cancer cells¹⁵. Emerging concept also indicates that modulation
32 of ribosome composition regulates mRNA translation and acquisition of particular cellular
33 phenotype^{16,17}. Heterogeneity in ribosome composition has been reported at both ribosomal
34 RNA (rRNA) and protein levels, the latter being one of the most investigated mechanisms. In
35 mice, it has been shown that depletion of RPL38 decreases IRES-dependent translation of

36 *Hoxa9* mRNA and results in loss of tissue patterning^{18,19}. In addition, RPL28 knockdown
37 concomitantly reduces the proportion of RPL28-containing ribosomes and the translation of
38 antigenic peptides encoded by influenza virus²⁰. Interestingly, it has been reported that
39 components of the translational apparatus promote EMT although their role in shaping a
40 particular translational reprogramming remains elusive. For example, the acquisition of EMT
41 features has been shown to be driven by changes in the tRNA repertoire, which regulates
42 translation of *COL1* mRNA, and by changes in the expression of some eIFs^{21–23}.

43 To date, no study ever compared the modulation of transcriptional and translational
44 landscapes in stable epithelial and mesenchymal cells, nor the associated changes in
45 ribosome composition. Here, we used genome-wide approaches to depict the translational
46 landscape in light of the profound transcriptional reprogramming and the translational
47 machinery rearrangements that occur during EMT in adult human mammary cells, as well as
48 the role of ribosomal proteins in EMT commitment.

49 **Results**

50 **Translational reprogramming is as important as transcriptional reprogramming in** 51 **ZEB1-induced mesenchymal cells**

52 To assess the relative importance of changes in translation and transcription occurring in
53 mesenchymal cells compared to epithelial ones, we performed ribosome profiling in an
54 isogenic model of human mammary epithelial cell (hMEC) overexpressing or not the EMT-TF
55 ZEB1²⁴. As previously described, ZEB1 overexpression is associated with switch in cellular
56 morphology and EMT-related molecular features (Figure S1). By ribosome profiling, we
57 compared the change in cytoplasmic mRNAs steady-state levels using RNAseq (*i.e.*, including
58 changes in transcription level, nuclear-cytoplasmic export and mRNA stability) and in
59 cytoplasmic mRNAs protected by ribosomes arising from polysomes using RIBOseq (*i.e.*,
60 actively translated mRNAs). The two cell lines show similar cytoplasmic fraction purity and
61 polysome profiles, the latter observation indicating no drastic change in global protein
62 synthesis in mesenchymal cells compared to epithelial ones (Figure S2A-B). Using the
63 biological replicates, we calculated log₂ fold-changes (FC) and adjusted p-values for both
64 RNAseq and RIBOseq data by comparing hMEC-ZEB1 to hMEC. Robustness of RNAseq and
65 RIBOseq log₂(FC) values was validated by additional polysome profiling coupled to medium
66 through-put RTqPCR on 90 randomly chosen genes using 5 independent experiments
67 (Spearman correlation: RNAseq, $p < 0.0001$ and $r^2 = 0.75$; RIBOseq, $p < 0.0001$ and $r^2 = 0.78$)
68 (Figure S2C-D). We then applied different thresholds as detailed in the decision tree to

69 compare change in levels of cytoplasmic mRNAs or ribosome-protected mRNAs (Figure S2E).
70 Using our approach, three main classes of significantly dysregulated mRNAs were identified
71 (Figure 1A-B, Figure S2E-F and Table S1).

72 We first identified 1,065 mRNAs significantly differentially regulated in hMEC-ZEB1 compared
73 to hMEC using both RNAseq and RIBOseq (Figure 1A-B, “BOTH”, black). These mRNAs
74 correspond to a concomitant change in levels of steady-state and ribosome-protected mRNAs,
75 suggesting a strong coupling in transcription/translation for these mRNAs in ZEB1-induced
76 EMT. Such effect has already been described as a passive buffer effect, where change in
77 mRNA steady-state levels mechanically affect the ones of mRNA translation²⁵. To determine
78 whether mRNAs whose expression was concomitantly modified at steady-state and ribosome-
79 protected levels was consistent with what known about EMT, gene enrichment was performed.
80 As expected, the up-regulated mRNAs at steady-state levels were enriched in genes involved
81 in EMT, extracellular matrix organisation and development, while down-regulated mRNAs
82 rather correspond to genes involved in cell junction, differentiation and development (Figure
83 S3A and Table S2). Overall, these observations were coherent with the profound
84 transcriptional reprogramming described in the literature to drive EMT, and validated the data
85 obtained using the ribosome profiling approach^{1,2}.

86 In parallel, up to 2,212 mRNAs show a decoupling between their steady-state and ribosome-
87 protected levels in hMEC-ZEB1 compared to hMEC. These data suggest that these mRNAs
88 are regulated at translational level in ZEB1-induced EMT. The “RNAseq” class encompasses
89 179 significantly differentially regulated mRNAs at steady-state level (RNAseq) but not at
90 ribosome-associated level (Figure 1A-B and Figure S2C-D, green). In contrast, 2,033 mRNAs
91 are significantly modified at ribosome-protected level only (Figure 1A-B and Figure S2C-D,
92 “RIBOseq”, pink). Thus, a translational reprogramming occurs in the ZEB1 overexpressing
93 mesenchymal cells compared to the epithelial hMEC ones. Due to the small number of
94 differentially regulated mRNAs in the “RNAseq” class (n=179), interpretation of the gene
95 enrichment analyses was limited (Figure S3B and Table S2). In contrast, in the “RIBOseq”
96 class, the top 4 enrichment terms of the significantly up-regulated mRNAs correspond to EMT-
97 related terms already identified in the “BOTH” class (Figure 1C). It has to be noted that the
98 *EMT hallmark signature* established on transcriptionally regulated well-identified EMT-related
99 molecular features, also contains mRNAs regulated at ribosome-protected levels (RIBOseq)
100 in the hMEC-ZEB1 model (Figure 1D). Since some of these mRNAs might be regulated either
101 at transcriptional or translational levels, these data suggest that the EMT hallmark signature is
102 underestimated when analysing only the transcriptome. Finally, some enrichment terms were
103 specifically identified in the “RIBOseq” class, such as metabolism of bile acid in translationally

104 down-regulated mRNAs or neuronal development and inflammation in translationally up-
105 regulated mRNAs (Figure 1C). It suggests that translationally regulated mRNAs in ZEB1-
106 induced mesenchymal cells are enriched in additional biological processes compared to the
107 mRNAs regulated at coupled transcription/translation level, and might provide a novel source
108 of cellular functions to characterize EMT.

109 To determine whether translational reprogramming is not restricted to the EMT-TF ZEB1, we
110 performed ribosome profiling in SNAIL-overexpressing hMEC. As ZEB1, SNAIL
111 overexpression is associated with both coupling and uncoupling in transcription/translation.
112 Comparison of the differentially regulated mRNAs between hMEC cells overexpressing or not
113 the EMT-TFs in each of the three main classes (*i.e.*, BOTH, RNAseq, RIBOseq), shows that
114 some mRNAs regulated by ZEB1 are also regulated by SNAIL at the same steady-state or
115 ribosome-protected levels (Figure S4). In addition, ZEB1 and SNAIL also specifically regulate
116 some mRNAs at each steady-state and ribosome-protected levels.

117 Altogether, our data show that translational reprogramming occurs similarly in response to
118 overexpression of different EMT-TFs, including common mRNA targets. In addition,
119 translational reprogramming was not an anecdotal change in gene expression as the
120 proportion of genes modulated at translational levels is at least as important as the ones
121 modulated at both transcriptional and translational levels in ZEB1-induced mesenchymal cells.

122 **Ribosomes display increased intrinsic translational defects in ZEB1-induced** 123 **mesenchymal cells**

124 Having shown that a translational reprogramming occurs in ZEB1-overexpressing
125 mesenchymal cells, we attempted to identify any changes in translational fidelity. Due to
126 important proportion of phasing errors in ribosome profiling data, we could not address this
127 question using ribosome profiling. Thus, we performed readthrough reporter assays allowing
128 to analyse the recognition of stop codon by ribosome. Using plasmid with a galactosidase gene
129 where the stop codon is fused to a luciferase gene, we compared readthrough activity of hMEC
130 overexpressing or not ZEB1. We observed that hMEC cells exhibited lower percentage of
131 readthrough (around 2%) compared to hMEC-ZEB1 (around 4%) (Figure 2A). These data
132 indicated that hMEC epithelial cells displayed a higher termination efficiency (*i.e.*, less errors)
133 than ZEB1-overexpressing mesenchymal hMEC cells.

134 Readthrough is directly dependent upon the ribosome activity. Indeed, when ribosomes arrive
135 at a stop codon, no corresponding tRNA exists and a release factor enters in the assembly site
136 of the ribosomes to terminate the translation that is a highly efficient process²⁶. However,
137 occasionally, stop codon can be recognized by tRNA, reflecting a defect in one of the main

138 functions of the ribosome, the decoding. As change in tRNA repertoire has been described,
139 we verified that defects in readthrough in ZEB1-overexpressing mesenchymal cells is not
140 associated with change in tRNA profile¹⁵. Using total RNA, tRNAome was compared between
141 hMEC overexpressing or not ZEB1 (Figure 2B). No significant change in the repertoire of
142 tRNAome was identify, suggesting that readthrough defects is mainly dependent upon
143 ribosome activity in our isogenic hMEC cellular models.

144 Overall, these data demonstrate that ZEB1-induced mesenchymal cells show change in
145 readthrough independently of modulation in tRNA repertoire. They indicate that ZEB1-induced
146 mesenchymal cells display remodelling in the intrinsic activity of ribosomes. In particular, the
147 global activity of mesenchymal ribosomes is less efficient and less prone to recognize stop
148 codons than epithelial ones.

149 **Composition of ribosome is modified in ZEB1-induced mesenchymal cells at ribosomal** 150 **protein level**

151 Since we observed a decrease in fidelity activity of ribosomes in ZEB1-overexpressing
152 mesenchymal cells, we compared ribosome composition at protein level between hMEC
153 overexpressing or not ZEB1 using riboproteome approach. It consists in the analysis of purified
154 ribosomes issued from the cytoplasm by mass spectrometry and give the relative change in
155 proportion of ribosomal protein within two conditions^{20,27}. Prior mass spectrometry, similarity of
156 ribosomal protein profiles issued from the five biological replicates of ribosomes purified from
157 hMEC and hMEC-ZEB1 cytoplasm was verified using 1D SDS-Page electrophoresis, as well
158 as the consistency of 80S ribosomal particle structure using CryoEM (Figure S5A-C). The high
159 resolution at 3.8Å of the human epithelial 80S ribosome reveals a structure similar to human
160 ribosomes already described in cancer cell lines, such as HeLa cells, indicating that structure
161 of the 80S ribosomes is similar in immortalized and cancer cell lines²⁸.

162 Peptide counts issued from mass spectrometry were used to measure the relative change in
163 protein level between ribosomes purified from hMEC or hMEC-ZEB1 cells (Figure 3A and
164 Table S3). About 1,000 proteins were identified in the purified ribosomes, including the
165 canonical factors of translation, although the quantity of their related peptide counts was low
166 (< 5% of total peptides). It appears that 12 out of the 13 subunits of the eIF3 complex showed
167 a significant decrease in ZEB1 overexpressing hMEC cells compared to hMEC (Figure 3A and
168 Figure S5D). As expected, peptides related to the eIF3J subunit were not found in our mass
169 spectrometry data, since eIF3J is described as a labile and non-essential subunit in the
170 mammalian eIF3 complex²⁹. Interestingly, it has been shown that depletion of the eIF3E
171 subunit promotes EMT commitment, supporting our observations^{22,30}.

172 In our dataset, more than 95% of the total peptides corresponded to the 80 cytoplasmic
173 ribosomal proteins, once again comforting the preparation enrichment in ribosomes. Among
174 them, only one ribosomal protein showed a significant change in hMEC-ZEB1 compared to
175 hMEC cells. It corresponds to the large subunit ribosomal protein RPL36A (Figure 3A and
176 Figure S5E). Indeed, a 3-fold increase in the proportion of RPL36A-containing ribosomes was
177 observed in hMEC-ZEB1 cells compared to hMEC ones. To validate the mass spectrometry
178 data, we analysed RPL36A protein levels in both purified ribosomes and ribosome-free
179 fractions using western blot (Figure 3B). As expected, ribosomal proteins were detected in
180 purified ribosomes but not in purified ribosome-free fractions, the latter being mainly enriched
181 in the canonical eIF3E factor of translation. Of note, eIF3E levels in the purified ribosome
182 fractions is lower in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells, validating our mass spectrometry
183 data. Moreover, as determined by mass spectrometry, no change in the small subunit RPS6
184 nor in the large subunit RPL19 ribosomal proteins was observed between hMEC and hMEC-
185 ZEB1 cells. In contrast, increase in RPL36A levels was observed in ribosomes purified from
186 ZEB1-overexpressing mesenchymal cells compared to the ones purified from epithelial hMEC
187 cells. It has to be noted that neither mass spectrometry nor the antibody used in western blot
188 allows to discriminate RPL36A from its paralog RPL36AL, which differs from RPL36A from the
189 single amino acid K38R modification (NCBI reference sequences: NP_066357.3;
190 NP_000992.1). Overall, these data suggested that ribosomes of hMEC overexpressing or not
191 ZEB1 exhibited different composition, the proportion of RPL36A-containing ribosomes being
192 increased in hMEC-ZEB1.

193 Change in ribosome composition at ribosomal protein level might reflect change in total levels
194 of ribosomal protein occurring in response to ZEB1 overexpression. However, similar levels of
195 total RPL36A mRNA and protein were observed in hMEC-ZEB1 and hMEC cell lines (Figure
196 3C-D). Similarly, no change or only a slight increase in total protein levels of the 12 subunits
197 of the eIF3 complex was observed in hMEC-ZEB1 cells compared to hMEC ones (Figure S6).
198 These data suggest that both change in proportion of eIF3-riboproteome and RPL36A-
199 associated ribosomes in ZEB1-overexpressing mesenchymal cells was not a side effect of
200 variation in their protein levels. Altogether, these data reinforce the existence of remodelling in
201 ribosome composition at protein level in ZEB1-induced mesenchymal cells, which display, at
202 least in part, higher proportion of RPL36A-containing ribosomes compared to hMEC epithelial
203 cells.

204 **The ribosomal protein RPL36A specifically triggers epithelial-mesenchymal transition**

205 To determine whether RPL36A contributes to EMT, we overexpressed RPL36A using lentiviral
206 approach in the immortalized mammary epithelial MCF10A cell line, the prototypic model of

207 EMT induction³¹ First, we aimed at monitoring morphology changes occurring in response to
208 RPL36A overexpression over establishment of Clone 1 (Figure 4). Compared to the MCF10A-
209 empty clone, overexpression of RPL36A was observed in MCF10A-RPL36A clone at protein
210 levels by western blot at 7 days post-infection and at mRNA levels throughout the kinetic of
211 clone establishment (Figure 4A-B). To ensure that RPL36A overexpression is associated with
212 integration of RPL36A within the ribosome, we established an inducible HEK293T cell lines
213 expressing flagged RPL36A and purified the cytoplasmic ribosomes. While no flagged protein
214 was detected in HEK293T-empty ribosomes in response to doxycycline nor in the ribosomal-
215 free fractions, HEK293T-RPL36A ribosomes contain a flagged protein, indicating that RPL36A
216 overexpressed protein incorporates within the ribosome (Figure 4C). Using contrast phase
217 imaging to monitor cellular morphology, we observed that compared to MCF10A-empty, the
218 MCF10A-RPL36A clone lacks cell-cell contact and display a fibroblastic-like morphology from
219 day 11, this morphology being maintained until day 21 (Figure 4D). These changes in cell
220 morphology were also observed using immunofluorescence and are associated with lack of
221 CDH1 signals and acquisition of VIM signals in MCF10A-RPL36A clone compared to MCF10A-
222 empty clone (Figure 4E). In addition, decreased mRNA levels of epithelial markers (*CDH1*,
223 *OCN*) was observed over the MCF10A-RPL36A clone establishment compared to MCF10A-
224 empty one, associated with an increase in both mesenchymal markers (*ZO-1*, *VIM*, *CDH2*) and
225 EMT-TFs (*ZEB1/2*, *SNAI1/2*, *TWIST1*) (Figure 4F-G). These data indicate that exogenous
226 overexpressed RPL36A protein integrates within ribosomes and promotes expression of EMT-
227 related molecular markers from the early days.

228 To determine whether RPL36A overexpressing cell lines maintain EMT features over days,
229 three additional pairs of stable MCF10A-empty and -RPL36A clones were independently
230 established and analyzed > 25 days post-infection (clones C2 to C4, Figure 5). As previously
231 observed, stable RPL36A overexpression in MCF10A induces change in cellular morphology,
232 as well as a switch in the immunofluorescent staining of CDH1 and VIM markers (Figure 5A-
233 C). In addition, compared to their paired MCF10A-empty clones, stable MCF10A-RPL36A
234 clones expressed lower levels of CDH1 and OCLN epithelial markers and higher levels of VIM
235 and ZEB1 mesenchymal at both mRNA and protein levels (Figure 5D-H). Furthermore,
236 miR200c was barely detected in MCF10A-RPL36A clones compared to MCF10A-empty ones
237 (Figure 5I).

238 At this stage, firm demonstration that RPL36A promotes EMT required additional
239 investigations. Indeed, MCF10A has first been shown to easily trigger EMT in response to
240 stress such as protein overexpression. Second, it has to be demonstrated that induction of
241 EMT is specific of the ribosomal protein RPL36A. Finally, it has been shown that RPL36A

242 affects cell sensitivity to antibiotic, a single point mutation being sufficient to promote
243 cycloheximide resistance in a panel of different organisms^{32,33}. To address these points, we
244 took advantages of five additional inducible MCF10A clones (Figure S7). Indeed, we observed
245 a leak in exogenous protein expression in these clones, even without doxycycline induction,
246 allowing to mimic a low RPL36A overexpression. Second, one MCF10A clone overexpressing
247 the ribosomal protein RPL19 was developed as a control in these conditions. Finally, all the
248 new clones were established using either blasticidin or puromycin, the previous ones having
249 been established using hygromycin. As previously observed and whatever the selective
250 antibiotic condition, overexpression of RPL36A, but not of RPL19, induces change in cellular
251 morphology and a switch in CDH1 and VIM expression levels (Figure S7). These data
252 demonstrate that RPL36A-dependant EMT induction in MCF10A is specific and does not rely
253 on a particular antibiotic selection mechanism.

254 Finally, since methylation of RPL36A at lysine has been shown to affect ribosome function, we
255 studied four mutant forms of RPL36A³⁴. As in MCF10A overexpressing a wild-type form of
256 RPL36A, overexpression of RPL36A-K53A, -K53R, -K38/53/58R and -K38/53/58A induce
257 changes in cell morphology and a switch in CDH1, OCLN, VIM and ZEB1 expression at both
258 mRNA and protein levels (Figure S8).

259 Altogether, these data indicate that RPL36A specifically triggers EMT, independently of the
260 nature of the selective antibiotic or RPL36A methylation status.

261 Discussion

262 EMT-related cell plasticity is driven by multi-layered regulation of gene expression, in particular
263 transcriptional and epigenetic events¹⁻³. To date, some studies reported a role for translation
264 in reactivating EMT-TFs expression and promoting EMT, although no study ever determines
265 whether translation is differentially modulated at genome-wide level in epithelial and
266 mesenchymal cells³. Here, we demonstrated that fine-tuning of translational landscape and
267 translational apparatus occurs in mesenchymal mammary cells, the single ribosomal protein
268 RPL36A being sufficient to trigger mammary EMT.

269 Few years ago, a pioneer study has drawn the translational landscape occurring in the early
270 phase of a physiologically induced EMT in human heart cells using ribosome profiling³⁵. In
271 response to 45min of TGF β treatment, about 67 mRNAs were significantly differentially
272 regulated at translational level, supporting the notion that translational regulation occurs during
273 EMT commitment. However, compared to the numerous data reporting a huge amount of

274 transcriptional and epigenetic changes, this pioneer study suggests only a limited change in
275 translation. Since EMT is a transient and reversible process associated with different
276 metastable stages (*i.e.*, epithelial-mesenchymal plasticity, EMP)^{2,36}, we aimed to limit the intra-
277 EMT heterogeneity within the analysed cell line by first, comparing initial epithelial and final
278 mesenchymal stages and second, using an isogenic model of complete EMT, induced by
279 overexpression of the EMT-TF ZEB1 in hMEC cells. Although this ZEB1-induced EMT might
280 be considered as non-physiological, it has the advantage of being stable compared to MCF10A
281 cell line, which displays a high plasticity potential and therefore, a high intra-EMT
282 heterogeneity^{37,38}. As expected, more than 1,000 mRNAs were regulated in our ribosome
283 profiling at steady-state levels, recapitulating the deep transcriptional reprogramming reported
284 in EMT^{1,2}. Unexpectedly, our data revealed a change in translational reprogramming as
285 important as transcriptional reprogramming, the proportion of mRNAs regulated at these two
286 levels being closed to each other. This notion was supported by two observations. First,
287 similarity and differences in the translational reprogramming induced by the two EMT-TFs,
288 ZEB1 and SNAIL, reflects what observed at transcriptional level and reinforces the fact that
289 these two EMT-TFs induced different EMT programs^{1,2}. Second, gene enrichment analysis
290 identified well-known biological functions in the translationally differentially regulated mRNAs,
291 suggesting that translation contributes in the profound phenotypic changes observed during
292 EMT. Interestingly, the translationally deregulated mRNAs were involved in biological functions
293 only recently related to EMT, such as bile acid metabolism³⁹. In addition, it reinforces the strong
294 relationship between EMT and inflammation, which might be maintained by EMT-induced
295 translational regulation as suggested by our data^{40,41}. Thus, translational reprogramming in the
296 EMT field might uncover novel biological functions associated to EMT and be a useful
297 additional molecular layer to identified inter-EMT heterogeneity³. Altogether, these data
298 reiterate the importance of translational regulation in numerous physiological processes,
299 including in EMT, but also in human diseases, where EMT-induced resistance to anti-cancer
300 therapies have also been shown to involve translational events^{3,42,43}.

301 The observed translational reprogramming can result from accumulation of distinct molecular
302 mechanisms, which have been previously reported in EMT³. It includes change in mRNA
303 translation induced by the core eukaryotic initiation factors (eIFs), such as eIF3e, which
304 stabilizes the complex including the initiator tRNA and the small 40S ribosomal particle and
305 specifies translational regulation of particular mRNA subsets^{13,14}. Previous study indeed
306 showed that knocking-down eIF3e expression promotes EMT through increase in cap-
307 independent translation of the mesenchymal *ZEB2*, *SNAIL* or *VIM* mRNAs³⁰. In ZEB1-induced
308 EMT, we observed a decreased in association of eIF3e, as well as the 11 other subunits of the
309 eIF3 complex, probably with the initiator tRNA:40S complex, that is not dependent upon

310 changes at protein level. Altogether these data suggest that eIF3 complex specifies
311 translational program and contributes to EMT through ribosome-dependent mechanism.

312 Today, several studies reported that heterogeneity in ribosome composition is altered in
313 different physio-pathological contexts, in particular at ribosomal protein levels, while it has
314 never been investigating in EMT so far^{16,17}. The discovery that mesenchymal cells displaying
315 the highest rate in readthrough, a defect directly resulting from ribosome, supports a
316 modulation of ribosome composition during EMT²⁶. In eukaryotes, it was suggested that
317 similarly to alternative splicing, translational readthrough events rewire cellular interaction
318 networks in a temporally and spatially controlled manner. For instance, readthrough event over
319 the *LDH-B* (lactate dehydrogenase B) mRNA promotes the synthesis of a LDH-B protein with
320 a particular C-terminal sequence addressing LDH-B to peroxisomes and thus regulating
321 metabolic changes, an emerging hallmark in EMT also observed in our gene ontology
322 analyses^{44,46,48}. Interestingly, it was shown that deletion of the non-essential eIF3-associated
323 factor eIF3J resulted in significantly increased readthrough, although from our results, eIF3J
324 was not detectable in mass spectrometry data in both epithelial and mesenchymal purified
325 ribosomes⁴⁵. In contrast, we identified a change in composition of the ribosome itself, the
326 proportion of RPL36A-containing ribosomes between the mammary epithelial hMEC and
327 mesenchymal hMEC-ZEB1 cells being increased, that is not dependent upon change in protein
328 level, as observed for eIF3 complex. Although being considered as essential in yeast,
329 systematic studies focused on RPs revealed particular activities of RPL36A in humans.
330 RPL36A is one of the few RPs displaying the ability to incorporate into pre-existing cytoplasmic
331 ribosome independently of the canonical ribosome biogenesis⁴⁷. Indeed, in neurons, RPL36A
332 not only shows a short-half-life but also exists at sub-stoichiometric level within the ribosome,
333 its recruitment within the ribosome being subcellular location-specific. These data indicate that
334 RPL36A-containing ribosome exist in different proportions, in particular within neurons whose
335 embryonic formation relies on EMT. Interestingly, we observed additional changes in ribosome
336 composition in ZEB1-induced EMT, at rRNA chemical modification levels, in particular at rRNA
337 2'Ome levels (see back-to-back manuscript Morin et al, submitted). Overall, these data support
338 the notion that heterogeneity in ribosome composition, and in ribosome intrinsic activity, is a
339 novel molecular feature of EMT.

340 Only few evidence so far suggest that ribosomal protein could contribute in EMT. While
341 ribosomal proteins RPLS7 and RPL22L1 have been shown to promote CDH1/VIM switch in
342 prostate and ovarian cancer cell lines, respectively, RPS5 has been shown to inhibit fibrosis in
343 hepatic stellate cells^{49,51,53}. Interestingly, in mouse embryonic stem cells (mESCs), two
344 populations of ribosomes co-exist, RPL10A- and RPS25-containing ribosomes that actively

345 translate distinct pools of mRNAs, respectively encoding extracellular matrix (ECM) proteins
346 and B12 vitamin signalling proteins⁵⁰. Another study reported that purifying RPL10A-
347 associated mRNAs as a surrogate of polysome purification (*i.e.*, actively translated mRNAs),
348 revealed significant enrichment in translation of pro-fibrotic mRNAs, such as *TIMP1* and *CD90*
349 mRNAs⁵². Moreover, it has recently been reported that RPL10A-containing ribosome
350 decreases during mesoderm differentiation, resulting in a decreased translation of mesoderm
351 regulators⁵⁴. These data identified RPL10A as a specific translational regulator of ECM and
352 mesoderm regulator, which are key markers of epithelial-to-mesenchymal transition. Here,
353 using different immortalized mammary MCF10A clones, we revealed that RPL36A specifically
354 triggers EMT through ribosome integration. Indeed, overexpressed flagged RPL36A was
355 detected in the ribosome fractions but not in the ribosome-free ones, although it remains to be
356 demonstrated that RPL36A overexpression increase the proportion of RPL36A-containing
357 ribosome in MCF10A. It has to be noted that the biological function of RPL36A in human
358 remains poorly investigated. A single study in a panel of cancer cell lines showed that RPL36A
359 knock-down mostly affects translation compared to transcription, the translationally
360 dysregulated mRNAs being involved in cell cycle, organelle organization and nucleotide
361 metabolism, key cellular function for EMT commitment⁵⁷.

362 Altogether, our data demonstrate that a profound translational reprogramming co-occurs with
363 the well-known transcriptional reprogramming in mesenchymal cells. Moreover, it appears that,
364 in additional to translation, heterogeneity in ribosome composition is a novel molecular feature
365 of EMT as well as a novel determining factor triggering EMT commitment.

Materials and methods

Cellular models and viral infection

The primary human mammary epithelial cells (hMECs, Lonza) were immortalized by hTERT overexpression using neomycin selection²⁴. Additional hMEC cellular models were previously derived using puromycin selection to stably over-express EMT-TFs to promote EMT, either the murine ZEB1 (hMEC-ZEB1) or the human SNAIL (hMEC-SNAIL)²⁴. hMEC cell lines were cultured in DMEM F12 media (Gibco, 21331020) supplemented with 10% fetal bovine serum (Capricorn Scientific, FBS-12A), 1% penicillin-streptomycin, 1X GlutaMax, 0.01µg/mL hEGF, 0.5µg/mL hydrocortisone and 280mU/mL insulin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

MCF10A (ATCC CRL-10317™) cells were cultured in DMEM F12 media (Gibco, 21331020) supplemented with 5% horse serum (Gibco, 16050-122), 1% penicillin-streptomycin, 1X GlutaMax, 0.02µg/mL hEGF, 0.5µg/mL hydrocortisone, 300mU/mL insulin and 100ng/mL cholera toxin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. They were transduced with different lentiviral particles produced as previously described using HEK293T, cultured in DMEM high glucose GlutaMAX (Gibco, 61965026), supplemented with 10% fetal bovine serum (Capricorn Scientific, FBS-12A), 1% penicillin-streptomycin, 1X NEAA, 1mM Sodium pyruvate. Several different clones were generated overexpressing either control (empty) and wild-type or mutant RPLs in a constitutive (pWPIR) or inducible (pTRIPZ) manner. MCF10A derived cellular models were selected and maintained with distinct antibiotics (30µg/mL hygromycin, 1µg/mL puromycin or 5µg/mL blasticidin).

Ribosome profiling

Ribosome profiling was performed as previously described⁵⁵. Briefly, 15.10⁶ hMEC-derived 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 RIBOseq, the polysomal fractions were then digested with 15U RNase I AMBION/OD260 for 1hr at 25°C. Ribosome protected fragments (RPF) were purified by phenol-chloroform extraction, and suspended in Superase-IN AMBION solution (1U/µL). 28- to 34-nt RNA fragments were then purified from 16% (vol/vol) acrylamide-bisacrylamide (19:1) / 7M 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.

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 RNAseq and RIBOseq profiles, we used the cross-graphic representation where we display log₂ fold-changes (FC) 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 enrichment analysis was performed using Hallmark and Gene Ontology annotation. Bioinformatic analyses were performed using R. Dataset are available on GeoProfile (GSE).

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, 24hrs before transfection with the reporter plasmid in the presence of JetPei reagent (Ozyme). Cells were harvested 24hrs 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.

tRNAome

Total RNA was purified using Trizol reagent (ThermoFisher). tRNAome was performed using tRNAseq (Arraystar, USA).

Ribosome purification

Cytoplasmic fractions were obtained by mechanical lysis of cells using the PreCellys device (Ozyme) and centrifugation at 750g for 10min to pellet nuclei then 12,000g for 10min to pellet mitochondria²⁷. Cytoplasmic fractions were loaded onto a 1M sucrose cushion in buffer (50mM

Tris-HCl pH 7.4, 5mM MgCl₂, 500mM KCl, 2mM DTT) and centrifugate for 2hrs at 250,000g. Ribosome pellet were resuspended in buffer (50mM Tris-HCL pH 7.4, 5mM MgCl₂, 25mM KCl).

Riboproteome

Five replicates of ribosomes were purified from hMEC and hMEC-ZEB1 cell lines before characterization by mass spectrometry-based proteomic analysis as described⁵⁵. 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 analysed 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 MaxQuant version 1.5.8.3 and the SwissProt database (Homo sapiens taxonomy, June 2017 version)⁵⁶. Intensity-based absolute quantification (iBAQ) values were calculated from MS intensities of unique+razor peptides and used for statistical analyses using ProStaR^{58,59}. 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 coming 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.

Western blotting

Proteins were purified using Laemmli (125mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 200mM DTE, 20% glycerol) supplemented with inhibitors of proteases (PhosSTOP EASYpack, Roche, 04 906 837 001) and phosphatases (Pierce™ Phosphatase inhibitor, Thermo Scientific, #88667) before denaturation at 95°C for 5min and centrifugation 5min at 7,000g at 4°C. Protein lysates were quantified with TCA, subjected to SDS-PAGE with the appropriate percentage of acrylamide/bis-acrylamide and blotted onto 0.45µm nitrocellulose membranes (Amersham™ Protran™, 10600009). Membranes were blocked in TBS solution containing 0.05% Tween 20 and 5% non-fat milk and incubated with primary antibodies overnight (Table S4). Fluorescent secondary antibodies (StarBright Blue 700 Fluorescent Secondary Antibodies, Bio-rad) were used and signals were revealed using Chemidoc MP and quantified with Image Lab Software (BioRad).

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using Direct-ZOL RNA purification kit (Ozyme, ZR2073) and quantified with the spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). cDNA was synthesized from 200 ng of purified total RNA using the PrimeScript RT kit (Takara). Real-time qPCR was performed using LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) using in-house designed primers (Table S5). Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method⁶⁰, 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.

Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips and fixed in 4% of paraformaldehyde in 1X PBS before permeabilization with 0.5% Triton X-100 in 1X PBS. Primary antibodies were applied before secondary antibodies labelled with AlexaFluor488 or 555 (Molecular Probes) (Table S4). Coverslips were mounted using the Fluoromount G mounting medium (EMS). Images were acquired on a Zeiss confocal microscope (Zeiss LSM780 NLO).

Availability of datasets

The generated ribosome profiling data are available in the GEO profile (GSEXXX, token for reviewer access: XXX). The datasets include the fastq of each sample, a read count matrix for each sample and a matrix summarizing the biological data.

Supplemental Information

Supplemental information is provided.

Acknowledgements

We thank platforms' staffs that have not been referred as co-authors: EDyP Laboratory (Grenoble, France), Bioinformatics and Imaging Platforms (CRCL, Lyon, France).

Author contributions

CM, ABB, FNVL, CI, LB, AA, AS, SGR, CM, FC, APM and SC performed and analysed experiments. CM, ABB, FNVL, LB, YC, RG, CML, JJD, ON and VM analysed and interpreted the data. HA, PF, RP, YC and ON performed bioinformatics analyses. APM and AP provided cellular models. JJD, ON and VM shaped the research question and coordinated the project. CM, FNVL, ON and VM supervised the daily experiments. CM and VM wrote the first draft of the manuscript. All authors contribute to the final version of the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare that there have no competing interests.

Funding

This study was funded by PAIR Sein program (ARC_INCa_LNCC_7625), INCa (PRT-K EMT-CoNCEPT, K17_2018-024; PLBio MARACAS, PLBIO19-178), SIRIC program (INCa-DGOS-INSERM-ITMO cancer_128003, LyRICAN+), LabEx program (DEVweCAN). CM and FNVL were recipients of PhD fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer. FNVL was 4th year PhD fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.

References

1. Nieto, M.A., Huang, R.Y.Y.J., Jackson, R.A.A., and Thiery, J.P.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45. 10.1016/j.cell.2016.06.028.
2. Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., *et al.* (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 341–352. 10.1038/s41580-020-0237-9.
3. Morin, C., Moyret-Lalle, C., Mertani, H.C., Diaz, J.-J., and Marcel, V. (2022). Heterogeneity and dynamic of EMT through the plasticity of ribosome and mRNA translation. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1877, 188718. 10.1016/J.BBCAN.2022.188718.
4. 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. 10.1038/s41580-018-0080-4.
5. 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. 10.1038/35000025.
6. Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and De Herreros, A.G. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89. 10.1038/35000034.
7. Lambert, A.W., and Weinberg, R.A. (2021). Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 21, 325–338. 10.1038/s41568-021-00332-6.
8. 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. 10.1016/j.ccr.2009.03.017.
9. Petz, M., Kozina, D., Huber, H., Siwiec, T., Seipelt, J., Sommergruber, W., and Mikulits, W. (2007). The leader region of Laminin B1 mRNA confers cap-independent

-
- translation. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2473–2482. 10.1093/nar/gkm096.
10. Petz, M., Them, N.C.C., Huber, H., and Mikulits, W. (2012). PDGF enhances IRES-mediated translation of Laminin B1 by cytoplasmic accumulation of Ia during epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9738–9749. 10.1093/nar/gks760.
 11. Petz, M., Them, N., Huber, H., Beug, H., and Mikulits, W. (2012). La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* **40**, 290–302. 10.1093/nar/gkr717.
 12. 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**. 10.1038/NCOMMS13362.
 13. 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. 10.1038/nature14267.
 14. Lee, A.S.Y., 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. 10.1038/nature18954.
 15. Goodarzi, H., Nguyen, H.C.B., Zhang, S., Dill, B.D., Molina, H., and Tavazoie, S.F. (2016). Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression. *Cell* **165**, 1416. 10.1016/J.CELL.2016.05.046.
 16. Genuth, N.R., and Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: From genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 431–452. 10.1038/s41576-018-0008-z.
 17. Venezia, N.D., 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. 10.3390/ijms20051226.
 18. Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**, 383–397. 10.1016/j.cell.2011.03.028.
 19. Xue, S., Tian, S., Fujii, K., Kladwang, W., Das, R., and Barna, M. (2015). RNA

-
- regulons in Hox 59 UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* 517, 33–38. 10.1038/nature14010.
20. Wei, J., Kishton, R.J., Angel, M., Conn, C.S., Dalla-Venezia, N., Marcel, V., Vincent, A., Catez, F., Ferré, S., Ayadi, L., *et al.* (2019). Ribosomal Proteins Regulate MHC Class I Peptide Generation for Immunosurveillance. *Mol. Cell* 73, 1162–1173.e5. 10.1016/j.molcel.2018.12.020.
 21. Wu, J., Subbaiah, K.C.V., Xie, L.H., Jiang, F., Khor, E.S., Mickelsen, D., Myers, J.R., Tang, W.H.W., and Yao, P. (2020). Glutamyl-Prolyl-tRNA synthetase regulates proline-rich pro-fibrotic protein synthesis during cardiac fibrosis. *Circ. Res.*, 827–846. 10.1161/CIRCRESAHA.119.315999.
 22. 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. 10.1038/onc.2012.371.
 23. Robichaud, N., Del Rincon, S. V., Huor, B., Alain, T., Petruccioli, L.A., Hearnden, J., Goncalves, C., Grotegut, S., Spruck, C.H., Furic, L., *et al.* (2014). Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene* 34, 2032–2042. 10.1038/onc.2014.146.
 24. 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, 1002723. 10.1371/JOURNAL.PGEN.1002723.
 25. Kusanadi, E.P., Timpone, C., Topisirovic, I., Larsson, O., and Furic, L. (2022). Regulation of gene expression via translational buffering. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1869, 119140. 10.1016/J.BBAMCR.2021.119140.
 26. Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.P., and Namy, O. (2012). Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol. Med.* 18, 679–688. 10.1016/J.MOLMED.2012.09.008.
 27. Belin, S., Hacot, S., Daudignon, L., Therizols, G., Pourpe, S., Mertani, H.C., Rosa-Calatrava, M., and Diaz, J.-J. (2010). Purification of Ribosomes from Human Cell Lines. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 49, 3.40.1–3.40.11. 10.1002/0471143030.cb0340s49.

28. Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645. 10.1038/nature14427.
29. Des Georges, A., Dhote, V., Kuhn, L., Hellen, C.U.T., Pestova, T. V., Frank, J., and Hashem, Y. (2015). Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex. *Nature* 525, 491. 10.1038/NATURE14891.
30. 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 β signaling pathway. *Mol. Cancer Res.* 13, 1421–1430. 10.1158/1541-7786.MCR-14-0645.
31. Paine, T.M., Soule, H.D., Pauley, R.J., and Dawson, P.J. (1992). Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int. J. Cancer* 50, 463–473. 10.1002/IJC.2910500323.
32. Qiao, Y., Cheng, T., Zhang, J., Alfarraj, S.A., Tian, M., Liu, Y., and Gao, S. (2022). Identification and utilization of a mutated 60S ribosomal subunit coding gene as an effective and cost-efficient selection marker for *Tetrahymena* genetic manipulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 204, 1–8. 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.01.188.
33. Zgadzay, Y., Kolosova, O., Stetsenko, A., Wu, C., Bruchlen, D., Usachev, K., Validov, S., Jenner, L., Rogachev, A., Yusupova, G., *et al.* (2022). E-site drug specificity of the human pathogen *Candida albicans* ribosome. *Sci. Adv.* 8, 1062. 10.1126/SCIADV.ABN1062.
34. Mahesh, A., Khan, M.I.K., Govindaraju, G., Verma, M., Awasthi, S., Chavali, P.L., Chavali, S., Rajavelu, A., and Dhayalan, A. (2020). SET7/9 interacts and methylates the ribosomal protein, eL42 and regulates protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1867, 118611. 10.1016/j.bbamcr.2019.118611.
35. Chothani, S., Schäfer, S., Adami, E., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Langley, S.R., Tan, J., Wang, M., Quaife, N.M., Jian Pua, C., *et al.* (2019). Widespread Translational Control of Fibrosis in the Human Heart by RNA-Binding Proteins. *Circulation* 140, 937–951. 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039596.
36. Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. 10.1172/JCI39104.
37. Chen, F., Ding, K., Priedigkeit, N., Elangovan, A., Levine, K.M., Carleton, N., Savariau,

-
- L., Atkinson, J.M., Oesterreich, S., and Lee, A. V. (2021). Single-cell transcriptomic heterogeneity in invasive ductal and lobular breast cancer cells. *Cancer Res.* *81*, 268. 10.1158/0008-5472.CAN-20-0696.
38. Haynes, B., Sarma, A., Nangia-Makker, P., and Shekhar, M.P. (2017). Breast cancer complexity: Implications of intratumoral heterogeneity in clinical management. *Cancer Metastasis Rev.* *36*, 547. 10.1007/S10555-017-9684-Y.
39. Bhattacharya, D., Basta, B., Mato, J.M., Craig, A., Fernández-Ramos, D., Lopitz-Otsoa, F., Tsvirkun, D., Hayardeny, L., Chandar, V., Schwartz, R.E., *et al.* (2021). Aramchol downregulates stearyl CoA-desaturase 1 in hepatic stellate cells to attenuate cellular fibrogenesis. *JHEP Reports* *3*. 10.1016/J.JHEPR.2021.100237.
40. Marconi, G.D., Fonticoli, L., Rajan, T.S., Pierdomenico, S.D., Trubiani, O., Pizzicannella, J., and Diomedede, F. (2021). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells* *10*, 1587. 10.3390/CELLS10071587.
41. Suarez-Carmona, M., Lesage, J., Cataldo, D., and Gilles, C. (2017). EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol. Oncol.* *11*, 805. 10.1002/1878-0261.12095.
42. Truitt, M.L., and Ruggero, D. (2016). New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 288–304. 10.1038/nrc.2016.27.
43. Fabbri, L., Chakraborty, A., Robert, C., and Vagner, S. (2021). The plasticity of mRNA translation during cancer progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer*, 1–20. 10.1038/s41568-021-00380-y.
44. Fedele, M., Sgarra, R., Battista, S., Cerchia, L., and Manfioletti, G. (2022). The Epithelial–Mesenchymal Transition at the Crossroads between Metabolism and Tumor Progression. *Int. J. Mol. Sci.* *23*, 800. 10.3390/IJMS23020800.
45. Valášek, L.S., Zeman, J., Wagner, S., Beznosková, P., Pavlíková, Z., Mohammad, M.P., Hronová, V., Herrmannová, A., Hashem, Y., and Gunišová, S. (2017). Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle. *Nucleic Acids Res.* *45*, 10948. 10.1093/NAR/GKX805.
46. Katz, M.J., Gándara, L., De Lella Ezcurra, A.L., and Wappner, P. (2016). Hydroxylation and translational adaptation to stress: some answers lie beyond the

-
- STOP codon. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1881–1893. 10.1007/S00018-016-2160-Y.
47. Fusco, C.M., Desch, K., Dörrbaum, A.R., Wang, M., Staab, A., Chan, I.C.W., Vail, E., Villeri, V., Langer, J.D., and Schuman, E.M. (2021). Neuronal ribosomes exhibit dynamic and context-dependent exchange of ribosomal proteins. *Nat. Commun.* 12, 1–14. 10.1038/s41467-021-26365-x.
 48. Schueren, F., and Thoms, S. (2016). Functional Translational Readthrough: A Systems Biology Perspective. *PLOS Genet.* 12, e1006196. 10.1371/JOURNAL.PGEN.1006196.
 49. Xu, W.-H., Hu, H.-G., Tian, Y., Wang, S.-Z., Li, J., Li, J.-Z., Deng, X., Qian, H., Qiu, L., Hu, Z.-L., *et al.* (2014). Bioactive compound reveals a novel function for ribosomal protein S5 in hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis. *Hepatology* 60, 648–660. 10.1002/hep.27138.
 50. 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. 10.1016/j.molcel.2017.05.021.
 51. Wen, Y., An, Z., Qiao, B., Zhang, C., and Zhang, Z. (2019). RPS7 promotes cell migration through targeting epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 37, 297.e1-297.e7. 10.1016/J.UROLONC.2019.01.011.
 52. Grgic, I., Krautzberger, A.M., Hofmeister, A., Lalli, M., DiRocco, D.P., Fleig, S. V., Liu, J., Duffield, J.S., McMahon, A.P., Aronow, B., *et al.* (2014). Translational profiles of medullary myofibroblasts during kidney fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 1979–1990. 10.1681/ASN.2013101143.
 53. Wu, N., Wei, J., Wang, Y., Yan, J., Qin, Y., Tong, D., Pang, B., Sun, D., Sun, H., Yu, Y., *et al.* (2015). Ribosomal L22-like1 (RPL22L1) Promotes Ovarian Cancer Metastasis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One* 10. 10.1371/JOURNAL.PONE.0143659.
 54. Genuth, N.R., Shi, Z., Kunimoto, K., Hung, V., Xu, A.F., Kerr, C.H., Tiu, G.C., Oses-Prieto, J.A., Salomon-Shulman, R.E.A., Axelrod, J.D., *et al.* (2022). A stem cell roadmap of ribosome heterogeneity reveals a function for RPL10A in mesoderm production. *Nat. Commun.* 13, 1–19. 10.1038/s41467-022-33263-3.
 55. 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. U. S. A.* 114, 12934. 10.1073/PNAS.1707674114.
56. Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. 10.1038/nbt.1511.
57. Luan, Y., Tang, N., Yang, J., Liu, S., Cheng, C., Wang, Y., Chen, C., Guo, Y.N., Wang, H., Zhao, W., *et al.* (2022). Deficiency of ribosomal proteins reshapes the transcriptional and translational landscape in human cells. *Nucleic Acids Res.* 50, 6601–6617. 10.1093/NAR/GKAC053.
58. Schwanhüsser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. 10.1038/nature10098.
59. Wieczorek, S., Combes, F., Lazar, C., Gianetto, Q.G., Gatto, L., Dorffer, A., Hesse, A.M., Couté, Y., Ferro, M., Bruley, C., *et al.* (2017). DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 33, 135. 10.1093/BIOINFORMATICS/BTW580.
60. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. 10.1006/METH.2001.1262.
61. Nguyen Van Long, F., Lardy-Cleaud, A., Carène, D., Rossoni, C., Catez, F., Rollet, P., Pion, N., Monchiet, D., Dolbeau, A., Martin, M., *et al.* (2022). Low level of Fibrillarin, a ribosome biogenesis factor, is a new independent marker of poor outcome in breast cancer. *BMC Cancer* 22, 1–12. 10.1186/S12885-022-09552-X/FIGURES/3.

Figure legends

Figure 1. The translational landscape of ZEB1-induced mesenchymal cells is distinct from the one of epithelial cells. (A-B) Ribosome profiling. Cytoplasmic lysates were divided in two fractions to quantify RNA steady-state levels by RNAseq and ribosome-protected mRNAs issued from polysomes by RIBOseq. Using decision tree based on log₂ fold-changes (FC) between hMEC and hMEC-ZEB1, and adjusted p-values (Figure S2E), three main classes were identified for which log₂(FC) RIBOseq and RNAseq data are plotted (A). Compared to epithelial hMEC cells, hMEC-Zeb1 cells display mRNAs, whose cytoplasmic and ribosome-associated levels vary concomitantly (“BOTH”, black); mRNAs whose cytoplasmic levels vary independently of ribosome-associated ones (“RNAseq”, green); and mRNAs whose ribosome-associated levels vary without change in their cytoplasmic levels (“RIBOseq”, pink). mRNA number in each class is given (B). Mesenchymal hMEC-ZEB1 cells display a higher proportion of mRNAs regulated at translational level than transcriptional one compared to epithelial hMEC cells. **(C) Analysis of gene enrichment.** Gene enrichment was performed using the “RIBOseq” mRNA lists compared to either hallmark or gene ontology (GO) annotations. The top 10 of each list is shown in descending order of adjusted p-values. The RIBO_UP class is enriched in signature related to epithelial-mesenchymal transition. **(D) Deregulated mRNAs of the *Hallmark_EMT signature*.** Individual log₂(FC) of RNAseq or RIBOseq data are shown for the mRNAs belonging to the *Hallmark_EMT signature* and increased in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells either concomitantly at transcriptional/translational levels (“BOTH_UP”) or at translational levels only (“RIBOseq_UP”).

Figure 2. Translational readthrough is increased in ZEB1-induced mesenchymal cells compared to the mammary epithelial hMEC cells independently of any alteration in the tRNAome. (A) *In cellulo* translational readthrough. Transient transfection of readthrough reporter assay was performed to compare translational fidelity of hMEC overexpressing or not ZEB1. A significant increase in the percentage of readthrough was observed in hMEC-ZEB1 compared to hMEC. **(B) tRNAome.** The repertoire of tRNAs was profiled by tRNAseq in epithelial and ZEB1-overexpressing cells. No difference was observed between the two cell lines.

Figure 3. ZEB1-induced mesenchymal hMEC cells display more ribosomes containing RPL36A than epithelial hMEC cells. (A) Riboproteome. Purified ribosomal particles from hMEC and hMEC-ZEB1 cells were analysed by mass spectrometry. Differential ratio between hMEC-ZEB1 and hMEC is represented as $\log_2(\text{FC})$ and $-\log_{10}(\text{adj.p-value})$. Compared to epithelial hMEC cells, ZEB1-overexpressing mesenchymal cells display lower proportion of ribosomes associated with 12 subunits of the eIF3 complex and higher proportion of ribosomes associated with RPL36A. (B) Validation of riboproteome. A representative western blot performed on purified ribosomal particles and ribosome-free fraction from hMEC-ZEB1 and hMEC cells is shown. RPS6 and RPL19 are used as loading control proteins from small and large ribosomal subunits, respectively. RPL36A detection level is higher in purified ribosomes of mesenchymal hMEC-ZEB1 than epithelial hMEC cells, while eIF3E subunit is decreased in hMEC-ZEB1 ribosome fraction. (C-D) Expression of *RPL36A*. Compared to hMEC cells, hMEC-ZEB1 cells display similar levels of RPL36A at mRNA levels (RTqPCR, C) and protein levels (Western blot, D). A representative Western blot is shown in (D). Each dot represents a biological replicate (n = 3). Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant.

Figure 4. RPL36A overexpression gradually promotes EMT in MCF10A cells. (A-B) *RPL36A* overexpression. Overexpression of *RPL36A* was analysed in constitutive *RPL36A*-overexpressing MCF10A clone at protein levels by Western blot 7 days post-lentiviral infection (A) and at mRNA levels by RTqPCR during the first days post-lentiviral infection (B). Increase in both *RPL36A* protein and exogenous *RPL36A* mRNA levels was detected. (C) Incorporation of overexpressed *RPL36A* in ribosomal particles Using HEK293T expressing inducible *RPL36A*-Flag protein, composition of purified ribosome was assessed using Western blot. RPS6 and RPL19 are used as loading control proteins from small and large ribosomal subunits, respectively. *RPL36A*-Flag protein was detected only in the doxycycline induced cell line. (D) Monitoring of cell morphology. Pictures in phase contrast show morphology of both MCF10A-empty and -*RPL36A* clones over time. While the MCF10A-empty clone conserves an epithelial morphology, the MCF10A overexpressing *RPL36A* display a switch to a fibroblast-like morphology from day 11. White bar = 200 μm (magnification x10). (E) Immunofluorescence staining. Representative immunofluorescence pictures of MCF10A-empty and -*RPL36A* clones from day 11 to day 21 post-lentiviral infection show the staining of epithelial CDH1 (red) and mesenchymal VIM (green) markers. Compared to MCF10A-empty, MCF10A-*RPL36A* shows a complete loss of CDH1 protein expression and a higher level of VIM protein from day 18. White bar = 100 μm (magnification x40). (F-G) Kinetic of EMT-related mRNA levels. Levels of EMT markers (D) and EMT-TFs (E) were compared between MCF10A-empty and -*RPL36A*

clones during the first days post-lentiviral infection by RTqPCR. Compared to MCF10A-empty, constitutive overexpression of RPL36A decreases mRNA levels of epithelial markers while it increases mRNA levels of mesenchymal markers and all the EMT-TFs.

Figure 5. Constitutive RPL36A overexpression triggers EMT in MCF10A cells. (A) Exogenous *RPL36A* mRNA levels. Overexpression of exogenous *RPL36A* was validated by RTqPCR in a pair of three stable MCF10A-empty and -RPL36A clones (C2 to C4). Exogenous level of *RPL36A* mRNA was detected compared to empty MCF10A cells. **(B)** Cell morphology. Pictures in phase contrast show morphology of pairs of constitutive MCF10A-empty and -RPL36A clones. While the MCF10A-empty clones conserve an epithelial morphology, the MCF10A overexpressing RPL36A clones display a fibroblast-like morphology. White bar = 200µm (magnification x10). **(C)** Immunofluorescence staining. Representative immunofluorescence pictures of pairs of constitutive MCF10A-empty and -RPL36A clones show the staining of epithelial CDH1 and mesenchymal VIM markers. Compared to the representative MCF10A-empty clone C2, the three MCF10A-RPL36A clones show a loss of CDH1 protein level and a higher level of VIM protein. White bar = 100µm (magnification x40). **(D-G)** EMT-related mRNA levels. Levels of EMT markers (D-F) and EMT-TF ZEB1 (G) were compared between the three pairs of MCF10A-empty and -RPL36A clones by RTqPCR. Compared to MCF10A-empty, constitutive overexpression of RPL36A decreases mRNA levels of epithelial markers while it increases mRNA levels of the mesenchymal markers. **(H)** EMT-related protein levels. Levels of EMT markers and ZEB1 were compared between the three pairs of MCF10A-empty and -RPL36A clones by Western blot. Like mRNA levels, decrease in epithelial markers and increase in mesenchymal ones was observed in MCF10A-RPL36 clones compared to MCF10A-empty ones. **(I)** EMT-related miRNA levels. Levels of miR-200c were compared between MCF10A-empty and -RPL36A clones by RTqPCR. Compared to MCF10A-empty, constitutive overexpression of RPL36A decreases miR-200c levels.

Supplementary Information

Supplementary Materials and Methods

Polysome

10⁷ hMEC cells were seeded in 15cm dish and 24hrs latter, either snap frozen (ribosome profiling) or incubated for 15min with 100µg/ml cycloheximide (CHX) (polysome-coupled to medium through-put RTqPCR). Cytoplasm was purified in lysis buffer (20mM KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 4.5% sucrose, 0.5mM DTE and 100µg/ml CHX) by mechanical lysis using the PreCellys device (Ozyme) and two rounds of 10min centrifugation at 1,000g and 12,000g to pellet nucleus then mitochondria. Equivalent of 2 mg of cytoplasmic protein was loaded onto a 10-40% sucrose gradient and sedimented by ultra-centrifugation at 40,000rpm for 2hrs at 4°C using SW41 rotor on L7-55 ultracentrifuge (Beckman). Absorbance profiles and collection of polysomes were performed using an ISCO UA-6 detector at 254 nm. Polysomal fractions were pooled prior RNase digestion (ribosome profiling) or RNA extraction (polysome-coupled to medium through-put RTqPCR).

Medium through-put RT-qPCR

mRNA levels in cytoplasm and polysome were quantified by medium through-put real-time qPCR using Master Mix 2X EvaGreen (BioRad) on the BioMarkHD device (StarLab) as previously described⁶¹ (Table S5). Relative fold-changes (FC) were calculated using the 2- $\Delta\Delta$ CT method⁶⁰, using Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen) as control sample for inter-run normalization and the median of 5 housekeeping genes. Each sample was quantified in triplicate.

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).

Cryo Electron Microscopy

Purified ribosomes resuspended in buffer (50mM Tris-HCL pH 7.4, 5mM MgCl₂, 25mM KCl, 1mM DTT) were frozen on Quantifoil grids at 180nM of 80S final concentration. The quality of

the preparations was controlled by performing density maps at around 15Å on Tecnai G2 Sphera FEI device. High resolution of ribosome preparations was assessed using Titan Krios equipped with direct electron detector. Image processing was performed using 4 Gpu for cryo-EM reconstruction (Linux Vision®, Spain) on 206,854 80S particles to reach 3.8Å resolution.

For review only

Supplementary Tables

Table S1. Complete datasets of dysregulated mRNA identified by ribosome profiling between hMEC-ZEB1 and hMEC.

Table S2. Complete analysis of gene enrichment of dysregulated mRNA identified by ribosome profiling between hMEC-ZEB1 and hMEC.

Table S3. Complete identified by mass spectrometry using purified ribosomes from hMEC-ZEB1 and hMEC.

Table S4. List of antibodies.

Gene	Reference, Brand	Dilution western blot	Dilution immunofluorescence
α -tubuline	CP06, Calbiochem	1/500	N/A
CDH1	810181, BD Biosciences	1/3,000	1/100
eIF3A	NBP1-18891, Novusbio	1/1,000	N/A
eIF3B	A301-761A, Bethyl	1/2,000	N/A
eIF3C	A300-377A, Bethyl	1/1,000	N/A
eIF3D	pab73778, Covalab	1/1,000	N/A
eIF3E	ab36766, Abcam	1/500	N/A
eIF3F	pab70099, Covalab	1/1,000	N/A
eIF3G	pab75515, Covalab	1/2,000	N/A
eIF3H	A301-754A, Bethyl	1/1,000	N/A
eIF3I	646701, Ozyme	1/1,000	N/A
eIF3K	NB100-93304, Novusbio	1/2,000	N/A
eIF3L	pab0859-P, Covalab	1/1,000	N/A
eIF3M	NBP1-56654, Novusbio	1/1,000	N/A
Flag	Sigma, F7425	1/1,000	N/A
Histone H3	ab1791, Abcam	1/3,000	N/A
Ku80	ab3715, Abcam	1/2,000	N/A
OCLN	ab31721, Abcam	1/500	N/A
RPS6	A300-557A, Bethyl	1/1,000	N/A
RPL19	ab224592, Abcam	1/500	N/A
RPL36A	Custom, Biotem	1/2,000	N/A
SNAIL/SLUG	ab85936, Abcam	1/1,000	N/A
VIM	ab92547, Abcam	1/500	1/100
ZEB1	HPA027524, Sigma	1/500	N/A

Table S5. Primer sequences.

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>ACOT2</i>	TGC-TCA-GTC-ATC-CCG-AGG-TA	CCG-TGA-TGC-CCT-TCA-GGA-AA
<i>ACTA2</i>	CTA-TGC-CTC-TGG-ACG-CAC-AAC-T	CAG-ATC-CAG-ACG-CAT-GAT-GGC-A
<i>Actin</i>	TCC-ATC-ACG-ATG-CCA-GTG	CCA-ACC-GCG-AGA-AGA TGA
<i>ADAM12</i>	TCA-GAC-AAT-CCC-CTT-GGT-GC	CCT-CCT-TTC-TCA-ACC-GCC-AT
<i>ADAM23</i>	GCC-TTC-GGC-TCC-AAA-TTC-AT	ACA-GTG-CTC-TCC-ACC-CTT-AG
<i>ADAMTS4</i>	CAG-ATG-TGG-TAC-TGC-CTG-GG	TTG-CCA-GCC-ACT-AGG-ACT-TG
<i>ADGRD1</i>	CGT-GGT-CAA-CAT-TGG-CAT-CC	TGG-CTG-TCA-ACT-TGA-AGG-CA
<i>ANOS1</i>	ATC-ATG-TGC-GGT-GGT-TTC-CT	TTT-TCG-TGG-GTC-ATG-CCA-GA
<i>ATP2C2</i>	GTC-GTG-ATT-GGA-ACA-GGG-GA	GGT-GTC-TCT-TCA-GCC-TGC-AT
<i>C3AR1</i>	GGA-ATT-CTG-GAG-GCA-GCC-TT	TGT-TTG-AGG-GAC-AGT-GGG-TG
<i>CCDC102B</i>	TGG-AAG-AAC-TAA-AGC-AGG-GAC-T	AGA-CCT-CTG-GAG-CTT-ACG-GA
<i>CCL28</i>	ATG-TGT-CGC-ATC-CAG-AGA-GC	TCT-GCG-CTT-GAC-ATG-AAG-GA
<i>CD74</i>	ACA-GTC-ACC-TCC-CAG-AAC-CT	GCA-TCT-TGC-TCA-CAG-GCT-TG
<i>CD93</i>	CGG-CAG-ACA-GTT-ACT-CCT-GG	CAG-GTG-TCG-GAC-TGT-ACT-GG
<i>CDH1</i>	CCC-GGG-ACA-ACG-TTT-ATT-AC	GCT-GCC-TCA-AGT-CAA-AGT-CC
<i>CDH2</i>	CCT-CCA-GAG-TTT-ACT-GCC-ATG-AC	GTA-GGA-TCT-CCG-CCA-CTG-ATT-C
<i>CEACAM5</i>	CTG-CTC-ACA-GCC-TCA-CTT-CT	TCC-CCT-CTG-CGA-CAT-TGA-AC
<i>CGN</i>	GCC-TCT-CTC-AGC-TTG-AGT-CC	TCT-CCC-TCT-CTT-CAG-CCT-GT
<i>CLDN14</i>	CCA-TCC-AGA-GCC-CTT-TCA-GG	GGA-GCT-CCA-CGA-AAG-GTC-TT
<i>CNTN1</i>	ACA-CTG-GGT-AGA-GGA-GAG-CC	GAA-GGA-GCC-ACA-TTT-GGT-GC
<i>COL5A2</i>	GGC-AGA-GAG-GTG-AAA-CTG-GG	GGC-ACC-AGG-AGT-ACC-ATC-AG
<i>COL5A3</i>	GAG-GAA-GAA-AGG-GCG-AGG-TC	GGC-AGA-TTT-GGA-GCT-GGA-GT
<i>COL6A3</i>	ATG-TGG-CTG-TGG-TCT-GCT-AC	TAG-AAG-CTG-ACC-TTG-CTG-GC
<i>CPNE4</i>	CAG-TCT-CAT-GGG-CAG-TGG-TT	TGG-GTT-TAT-GCA-GGT-GCG-AA
<i>CX3CL1</i>	TCA-CGT-GCA-GCA-AGA-TGA-CA	TCT-CCA-AGA-TGA-TTG-CGC-GT
<i>DCN</i>	CAG-AGT-ACC-TGG-TGG-GCT-G	GGT-GGG-CAG-AAG-TCA-CTT-GA
<i>F2RL2</i>	TTC-CCC-TTT-TCT-GCC-TTG-GA	AGC-ACT-TTC-TTC-AGG-GCA-CT
<i>FAAH2</i>	GCC-TGG-GTC-TGT-CAG-TGT-AC	TCC-ACC-AGC-TCT-TTA-CGC-AG
<i>FGFR1</i>	TCA-GAT-GCT-CTC-CCC-TCC-TC	GAG-CTA-CGG-GCA-TAC-GGT-TT
<i>FGR</i>	CCA-AAG-GTG-CCT-ACT-CCC-TG	TCA-CAT-GAT-CGC-CTC-TGG-TC
<i>FOXC2</i>	GCA-GTT-ACT-GGA-CCC-TGG-AC	CCT-CCT-TCT-CCT-TGG-ACA-CG
<i>GABRP</i>	TTC-CTG-GTG-GTG-TTG-TCC-TG	CGT-CAC-TCC-AAT-GCA-GGT-TC
<i>GAPDH</i>	AGC-CAC-ATC-GCT-CAG-ACA-C	GCC-CAA-TAC-GAC-CAA-ATC-C
<i>GJA5</i>	AGT-ACA-CAA-GCA-CTC-GAC-CG	AAA-TCA-GCC-TGC-TCA-TCC-CC
<i>GPC4</i>	ATT-CTG-GTC-CTC-CCT-TCC-GA	ACC-TGC-TTT-TGC-CTT-TCC-CA
<i>GPM6B</i>	ACC-TAT-GTG-CTT-GGA-GTG-GC	GGT-CTG-CGG-TGA-CTT-GAT-GA
<i>HPRT1</i>	TGA-CAC-TGG-CAA-AAC-AAT-GCA	GGT-CCT-TTT-CAC-CAG-CAA-GCT
<i>HSH2D</i>	CCT-CTA-CTC-CAA-CGC-AGT-GG	TCA-TCT-CTG-CTG-ACG-GCT-TC
<i>HSP90AA1</i>	GCC-AGT-TCG-GTG-TTG-GTT-TT	GAG-GAC-TCC-CAA-GCG-TAC-TG
<i>HSP90AB1</i>	TCA-AGG-GCA-AGA-TCA-GCG-AG	GTT-ACA-CAC-CTG-CTC-CAG-CT
<i>HSPA1A/B</i>	TCA-AGG-GCA-AGA-TCA-GCG-AG	GTT-ACA-CAC-CTG-CTC-CAG-CT
<i>IL6</i>	AGT-GAG-GAA-CAA-GCC-AGA-GC	ATT-TGT-GGT-TGG-GTC-AGG-GG

ITGA11	AAG-GTG-GCT-TTC-CGT-CTT-GA	CGC-TCA-TTA-CTG-TCA-CTG-CC
JAM3	GGC-ACT-TTG-GTG-TTC-ACT-GC	TCC-ATC-TCC-TGC-TCC-TCA-CA
KRT15	GGA-CGA-CTT-CAG-GCT-CAA-GT	GTC-AGC-TCA-TCC-AGG-ACT-CG
KRT18	GCT-GGA-AGA-TGG-CGA-GGA-CTT-T	TGG-TCT-CAG-ACA-CCA-CTT-TGC-C
LAMA1	TCA-AAC-ACC-AGG-TGG-CAG-TT	TGC-CTC-GGT-TCA-CAC-TCA-TC
LAMB4	TGT-GAA-TGT-GAC-CCC-GAT-GG	TTT-GCA-CTG-GTC-GCA-TTT-GG
LCN2	CAA-TGT-CAC-CTC-CGT-CCT-GT	GCT-GGC-AAC-CTG-GAA-CAA-AA
LMNTD1	GCA-GCA-TCT-GAA-GCA-AAG-CA	ATG-GCT-TGA-CCG-TTC-GGT-TT
LSR	AGA-CTG-GCT-CTT-CGT-GGT-TG	ATG-CCC-AGG-AGG-AGG-AAG-AT
MAN1A1	TGG-TGG-ACT-ACT-CTC-AGC-CT	GCC-CAA-GGT-ATT-CCA-GAG-GG
MUC16	CCT-GCT-AAG-GCC-CTT-GTT-CA	CCC-CAT-CTT-TCT-CTG-GCC-TG
MUC4	CCA-GGA-ACC-ACA-GAG-GAC-AC	GAG-CCT-GTT-GAG-GTG-ACT-GG
MXRA5	GCT-GGC-ATT-GCT-AAA-CAC-GT	TCC-AAC-TTG-GTC-AGT-CCT-GC
NTRK1	GGG-AGC-TGA-GAA-ACC-TCA-CC	TGA-GCC-GAG-TGA-AAT-GG
NWD2	TGC-AAT-GCA-GCC-TTC-TAC-CA	ACC-CTT-TTC-GTG-TAA-CAG-CT
OCLN	TGG-AGG-AGG-ACT-GGA-TCA-GG	TCC-TGT-AGG-CCA-GTG-TCA-AA
OMD	ATG-GTG-AAC-AAC-GAA-GCA-CT	TGC-CCT-TCT-GCT-CCT-TCT-TG
P4HA3	GCA-TCA-GGG-GAG-AAG-CAG-TT	TCC-TTC-AGC-CAG-GCA-CTT-TT
PCOLCE2	TCG-AGA-GTG-ACA-ACC-TGT-GC	TCT-TGT-TGC-CAC-TGG-ACA-CA
PGK1	AAG-TGA-AGC-TCG-GAA-AGC-TTC-TAT	AGG-GAA-AAG-ATG-CTT-CTG-GG
PIGR	AGG-GTC-CTG-GGC-TCC-TAA-AT	AAG-GGC-AGT-TGA-TGG-TCA-CC
PLA2G7	AGG-GGT-TCA-GTC-CAC-CAG-AA	AGC-ATG-TGT-CCA-ATT-ATT-TTG-CCA
PLCD4	AAC-TTG-CCA-TGC-TGC-GTT-TT	GGT-GAA-TGT-GGC-GGT-AAC-CT
PPI2A	GTC-AAC-CCC-ACC-GTG-TTC-TT	CTG-CTG-TCT-TTG-GGA-CCT-TGT
PRKD1	CTG-GGG-CAG-AGT-CTG-ATG-TG	CAC-TGT-CGT-TCT-GGC-ACT-CT
PRSS8	CAT-GTG-TGT-GGT-GGC-TCT-CT	CCC-AGC-TTG-ACC-TCA-TAG-GC
PTGFR	TGT-TGG-AGC-CCA-TTT-CTG-GT	ATG-TTG-CCA-TTC-GGA-GAG-CA
PTGIR	CTCA-AGC-TCT-GGG-TCT-GCT-G	CTT-TCC-CAC-AGG-AGC-AGA-GG
RASSF5	GAC-CCT-CTC-CAG-AAA-GCA-CC	CCC-AGG-CAG-TTC-TTC-TCT-CG
RPL19	ACA-TGG-GCA-TAG-GTA-AGC-GG	ACG-GTA-TCT-TCT-GAG-CAG-CC
RPL19 exogenous pTRIPZ	AGT-GAA-CCG-TCA-GAT-CGC-AC	AGT-GAA-CCG-TCA-GAT-CGC-AC
RPL36A	GCT-CAA-CGC-ACT-CAA-GCC-TT	ATG-ACA-GGA-AGC-AGA-GTG-GC
RPL36A exogeneous pTRIPZ	AGT-GAA-CCG-TCA-GAT-CGC-AC	CCT-GGG-CGT-ACA-GAG-AAT-CC
RPL36A exogeneous pWPIR	TAA-GTG-CAG-TAG-TCG-CCG-TG	GTT-GGT-GCT-TGC-CAC-ACT-TC
SCGB1A1	CTG-GTC-ACA-CTG-GCT-CTC-TG	AGG-AGG-GTT-TCG-ATG-ACA-CG
SERPING1	CTG-GGG-ATA-GAG-CCT-CCT-CA	TGT-TGT-TGC-GAC-CTT-CCC-TT
SFRP1	CGC-AAG-GTG-AAG-AGC-CAG-TA	CTG-AAA-GGT-GGG-GCA-CTC-AT
SHANK2	CAA-GTT-GCC-CTG-AAG-ACC-CT	CCG-ACG-ATG-GCT-GTG-TGA-TA

SLC1A3	GTG-GAC-TGG-TTC-CTG-GAT-CG	TCG-TGA-CAA-GTG-CTC-CAC-AA
SLC5A1	TGG-AAT-GCC-CTG-GTT-TTG-GT	ACC-GCT-TCC-TCA-GGT-ACT-CT
SNAI1	CAC-TAT-GCC-GCG-CTC-TTT-C	GCT-GGA-AGG-TAA-ACT-CTG-GAT-TAG-A
SNAI2	TGG-TTG-CTT-CAA-GGA-CAC-AT	TGA-CCT-GTC-TGC-AAA-TGC-TC
SPARC	CTG-TGG-CAG-AGG-TGA-CTG-AG	GGT-GGT-TCT-GGC-AGG-GAT-TT
ST14	CTA-CCA-CAA-GGA-GTC-GGC-TG	CGG-GAT-GCT-GAA-CTC-AGA-CC
SULF1	GAC-GGC-AAG-TCT-GTC-CTC-AA	TGT-TCG-AAA-CCT-GTT-ACC-TGG
SYT11	ACA-GTG-GTG-GTC-CTC-AAA-GC	AGG-ATT-ACC-TGA-GAG-ACC-GGT
TGFB1	CGA-CTA-CTA-CGC-CAA-GGA-GG	GAG-CAA-CAC-GGG-TTC-AGG-TA
TGFBR2	GTC-ACT-GAC-AAC-AAC-GGT-GC	ACA-GAT-GGA-GGT-GAT-GCT-GC
TGFBR3	CCT-CAG-TCC-ACA-TCC-ACC-AC	CCA-CAG-AAC-CCT-CAG-ACA-CC
TJP1 (ZO1)	TCA-CGC-AGT-TAC-GAG-CAA-GT	TGA-AGG-TAT-CAG-CGG-AGG-GA
TJP3	CCA-GAT-GAG-CAA-CGG-TCA-GA	GTA-CCC-ACG-ATC-CTC-CAT-GC
TRPV6	GCT-GGA-GTG-GAG-GGT-AAC-AC	CGA-GGT-CAG-TGG-TCC-ATA-CG
TWIST1	GCA-GGG-CCG-GAG-ACC-TAG	TGT-CCA-TTT-TCT-CCT-TCT-CTG
VCAN	AGG-ATA-CAG-CGG-AGA-CCA-GT	GAA-GGC-AGA-GGC-ACC-TGA-AT
VEGFC	ATC-ATG-TGC-GGT-GGT-TTC-CT	TTT-TCG-TGG-GTC-ATG-CCA-GA
VIM	GAC-CAG-CTA-ACC-AAC-GAC-AAA	GAA-GCA-TCT-CCT-CCT-GCA-AT
VTCN1	GCA-GAT-CCT-CTT-CTG-GAG-CA	GCT-GAG-GCG-ACA-GTA-GTG-AC
WNT7A	GCT-TCG-CCA-AGG-TCT-TTG-TG	CTC-CTC-CAG-GAT-CTT-TCG-GC
ZEB1	GTG-ACG-CAG-TCT-GGG-TGT-AA	TTG-CAG-TTT-GGG-CAT-TCA-TA
ZEB2	GCA-AAC-AAG-CCA-ATC-CCA-G	GTT-GGG-CAC-ACT-AGC-TGG-AC
ZO-1	TCA-CGC-AGT-TAC-GAG-CAA-GT	TGA-AGG-TAT-CAG-CGG-AGG-GA

Supplementary Figure Legends

Figure S1. EMT-related molecular features of hMEC and hMEC-ZEB1 cellular models.

(A) Cellular morphology. In contrast microscopy, hMEC cells display cell-to-cell adhesion while hMEC-ZEB1 cells exhibit an isolated fibroblast-like morphology. (B-C) EMT-related mRNA levels. Relative mRNA levels of epithelial marker (B) and mesenchymal markers (C) were analyzed by RTqPCR. Compared to the epithelial hMEC cells, ZEB1-overexpressing hMEC cells loose epithelial markers and express higher levels of mesenchymal markers. Each dot represents a biological replicate (n = 3 or 4). (D) EMT-related protein levels. Western blot reveals a switch in CDH1/VIM expression between hMEC and hMEC-ZEB1 cells, which express the mesenchymal VIM marker but not the epithelial CDH1 one. ****: p-value < 0.0001; **: p-value < 0.01; KU80: loading control.

Figure S2. Ribosome profiling approach. (A) Purity of cytoplasmic fractionation. Using western blot, purity of cytoplasmic (C) and nuclear (N) fractions was assessed by detection of histone H3 (nucleus) and α -tubulin (cytoplasm). (B) Example of polysome profiles. To perform ribosome profiling (*i.e.*, RIBOseq), mRNA-associated ribosomes corresponding to actively-translated mRNAs were collected by polysome gradients (n=3). The epithelial hMEC and mesenchymal hMEC-Zeb1 cell lines exhibit similar polysome profiles. (C-D) Comparison of $\log_2(\text{FC})$ obtained by NGS and RT-qPCR. Using *de novo* polysome profiles (n=5), values of $\log_2(\text{FC})$ between hMEC-ZEB1 and hMEC-ZEB1 was compared between RNAseq and medium through-put RT-qPCR of cytoplasmic RNA (C) and RIBOseq and medium through-put RT-qPCR of polysomic RNA (D). (E) Decision tree of RNAseq and RIBOseq comparison. Using read counts, fold-changes (FC) between hMEC-ZEB1 and hMEC were determined for RNAseq (n=2) and RIBOseq (n=3). A decision tree was determined based on three values (p-adj, p-val and $\log_2(\text{FC})$) to identified three main classes of genes: “BOTH”, including genes significantly and biologically deregulated between hMEC-ZEB1 and hMEC in RIBOseq and RNAseq; “RIBOseq”, including genes significantly and biologically deregulated between hMEC-ZEB1 and hMEC in RIBOseq but not in RNAseq; “RNAseq”, including genes significantly and biologically deregulated between hMEC-ZEB1 and hMEC in RNAseq but not in RIBOseq. Others genes correspond to either “non-significant” or “dubious” deregulation in RIBOseq and/or RNAseq. (F) Distribution of detected genes by classes. A total of 20,478 genes was detected in hMEC-ZEB1 and hMEC cells in both RNAseq and RIBOseq that categorized in distinct classes as described in (E). Number of genes are detailed.

Figure S3. Gene ontology of dysregulated “BOTH” and “RNAseq” mRNA classes identified by ribosome profiling in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells. (A-B) Analysis of gene enrichment. Gene enrichment was performed using hallmark or gene ontology (GO) annotations for the dysregulated mRNAs classified either as “BOTH” (A) or “RNAseq” (B). The top 10 of each list is shown in descending order of adjusted p-values. Complete datasets of dysregulated mRNA identified by ribosome profiling between hMEC-ZEB1 and hMEC are given in Table S1 and gene enrichment in Table S2.

Figure S4. Comparison of dysregulated mRNAs identified by ribosome profiling in hMEC-ZEB1 or hMEC-SNAIL compared to hMEC cells. Like for hMEC-ZEB1, three classes of dysregulated mRNAs were identified (BOTH, RIBOseq and RNAseq) by ribosome profiling in hMEC-SNAIL compared to hMEC ones. Identity of enriched mRNAs in the two EMT-TFs compared to hMEC were compared using Venn diagrams for each individual list, including BOTH (A-B), RIBOseq (C-D) and RNAseq (E-F) either for up- (A, C, E) or down- (B, D, F) regulated mRNAs. Most of mRNAs dysregulated at transcriptional and translational levels in ZEB1 overexpressing hMEC cell line are similarly dysregulated in SNAIL overexpressing hMEC cell line.

Figure S5. Validation of ribosome purification and mass spectrometry data. (A-B) Protein profiles of purified ribosomes. Five ribosome purification at 500mM KCl were processed independently from epithelial hMEC (E) and mesenchymal hMEC-ZEB1 (M) cells to perform mass spectrometry. Profiles of 1D separation are using both Coomassie blue (A) or silver (B) staining. **(C)** CryoEM resolution of purified epithelial hMEC ribosomes. High resolution modelling at 3.80Å of ribosomes purified from hMEC epithelial cells was performed using >205,000 particles to verify ribosome purity and structure. Blue: RPL36A. **(D-E)** Peptide raw counts. Mean peptides raw counts of 12 subunits of the eIF3 complex (D) and RPL36A (E) and are shown. Each dot represents a biological replicate (n=5) and horizontal bar to median.

Figure S6. Comparison of the 12 subunits of eIF3 complex between epithelial hMEC and hMEC-ZEB1 mesenchymal cells. Total protein level was compared using Western blot for the 12 subunits of the eIF3 complex between hMEC and hMEC-ZEB1 cell lines. No significant change in total protein level of eIF3 subunits was observed in hMEC-ZEB1 compared to hMEC cells (n=1 to 2). KDa: kilodalton; Ku80: loading control.

Figure S7. Overexpression leakage of RPL36A, but not of RPL19, triggers EMT in MCF10A cells independently of the nature of the antibiotic used for clone selection. (A-B) Exogenous mRNA levels. Levels of exogenous *RPL36A* (A) and *RPL19* (B) was quantified by RTqPCR at the end of antibiotic selection in basal condition (*i.e.*, without any doxycycline induction) in the simultaneously derived MCF10A models with inducible overexpression of *RPL36A* and *RPL19*. Compared to empty MCF10A clones, leakage occurs in MCF10A-*RPL36A* and *RPL19*. (C) Cell morphology. Pictures in phase contrast show morphology of MCF10A-empty, -*RPL36A* and -*RPL19* clones at the end of antibiotic selection. While the MCF10A-empty and -*RPL19* conserves an epithelial morphology, the MCF10A overexpressing *RPL36A* display a fibroblast-like morphology whatever the antibiotic used for the clone selection. White bar = 200µm (magnification x10). (D) Immunofluorescence staining. Representative immunofluorescence pictures of MCF10A-empty, -*RPL36A* and -*RPL19* clones at the end of antibiotic selection show the staining of epithelial CDH1 (red) and mesenchymal VIM (green) markers. Compared to MCF10A-empty and -*RPL19* clones, the two MCF10A-*RPL36A* clones show a loss of CDH1 protein level and a higher level of VIM protein. White bar = 100µm (magnification x40). (E-F) EMT-related mRNA levels. Levels of EMT markers were compared between the three pairs of MCF10A-empty and -*RPL36A* clones by RTqPCR. Compared to MCF10A-empty, constitutive overexpression of *RPL36A* decreases mRNA levels of epithelial markers (E) while it increases mRNA levels of the mesenchymal markers (F). Error bars represent biological replicates.

Figure S8. Overexpression of RPL36A mutant forms triggers EMT in MCF10A cells. (A) Protein sequences of generated *RPL36A* mutants. Mutations at known methylated lysine (K) of *RPL36A* were introduced to either mimic presence (arginine, R) or absence (alanine, A) of methylation. (B) Exogenous mRNA levels. Levels of exogenous *RPL36A* mutant was quantified by RTqPCR in the simultaneously derived MCF10A clones. Compared to empty MCF10A clone, exogenous *RPL36A* mRNA was detected in all the MCF10A clones overexpressing a *RPL36A* form. (C-D) Immunofluorescence staining. Representative immunofluorescence pictures of MCF10A-empty and -*RPL36A* wild-type (C) as well as MCF10A-*RPL36A* mutants (D) show the staining of epithelial CDH1 (red) and mesenchymal VIM (green) markers. Compared to MCF10A-empty clone, all the MCF10A clones overexpressing the different forms of *RPL36A* show a loss of CDH1 protein level and a higher level of VIM protein. White bar = 100µm (magnification x40). (E-H) EMT-related mRNA levels. Levels of EMT markers (E-G) and EMT-TF ZEB1 (H) were compared between MCF10A-empty

clone and the different MCF10A-RPL36A mutant by RTqPCR. Compared to MCF10A-empty, constitutive overexpression of both wild-type and mutant RPL36A decreases mRNA levels of epithelial markers (E-F) while it increases mRNA levels of the mesenchymal markers (G-H). (I) EMT-related protein levels. Level of EMT protein markers was assessed by Western blot. Compared to MCF10A-empty, a loss of CDH1 and OCLN proteins and an increase in VIM and ZEB1 proteins was observed in all the MCF10A overexpressing different forms of RPL36A.

For review only

Figure 1

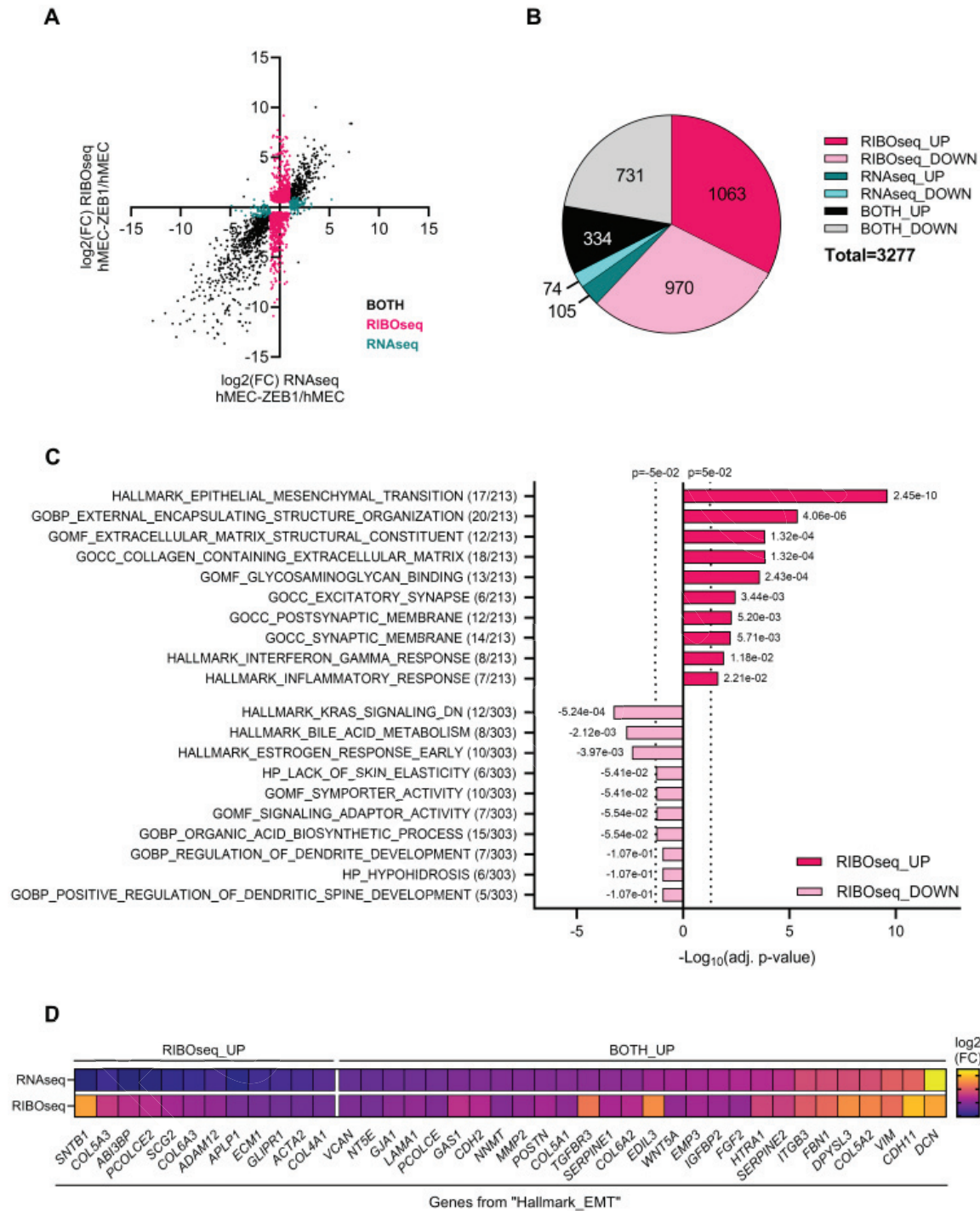


Figure 2

For review only

Figure 3

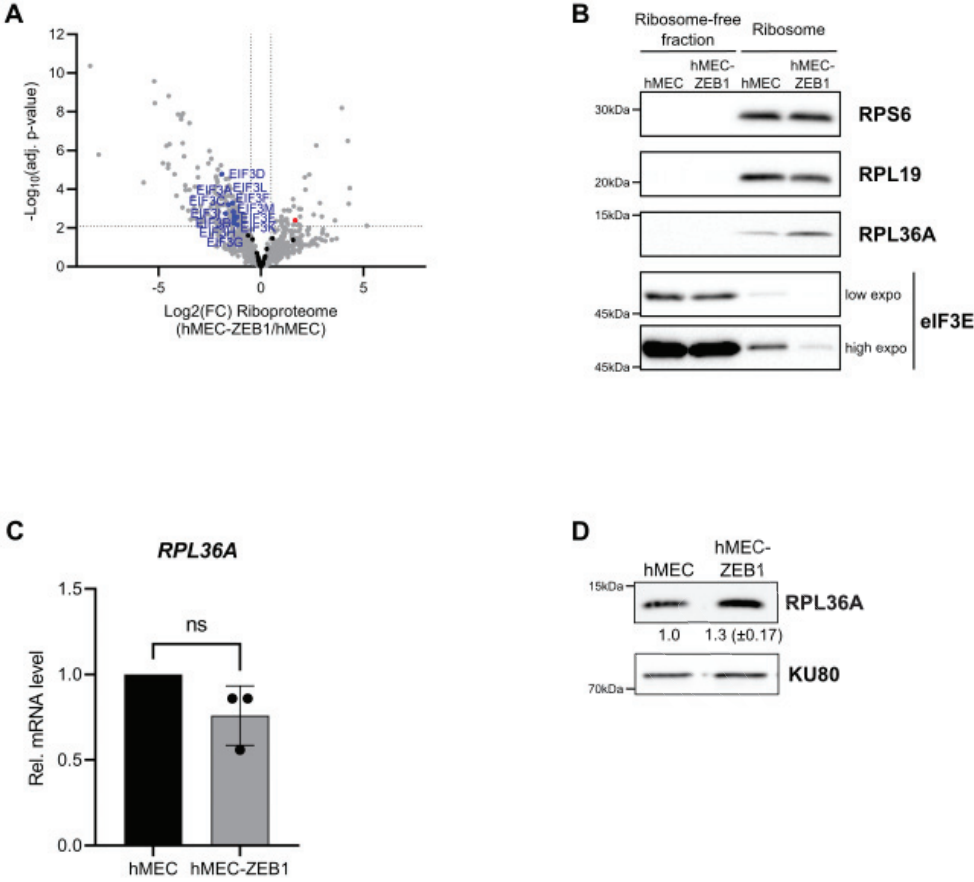


Figure 4

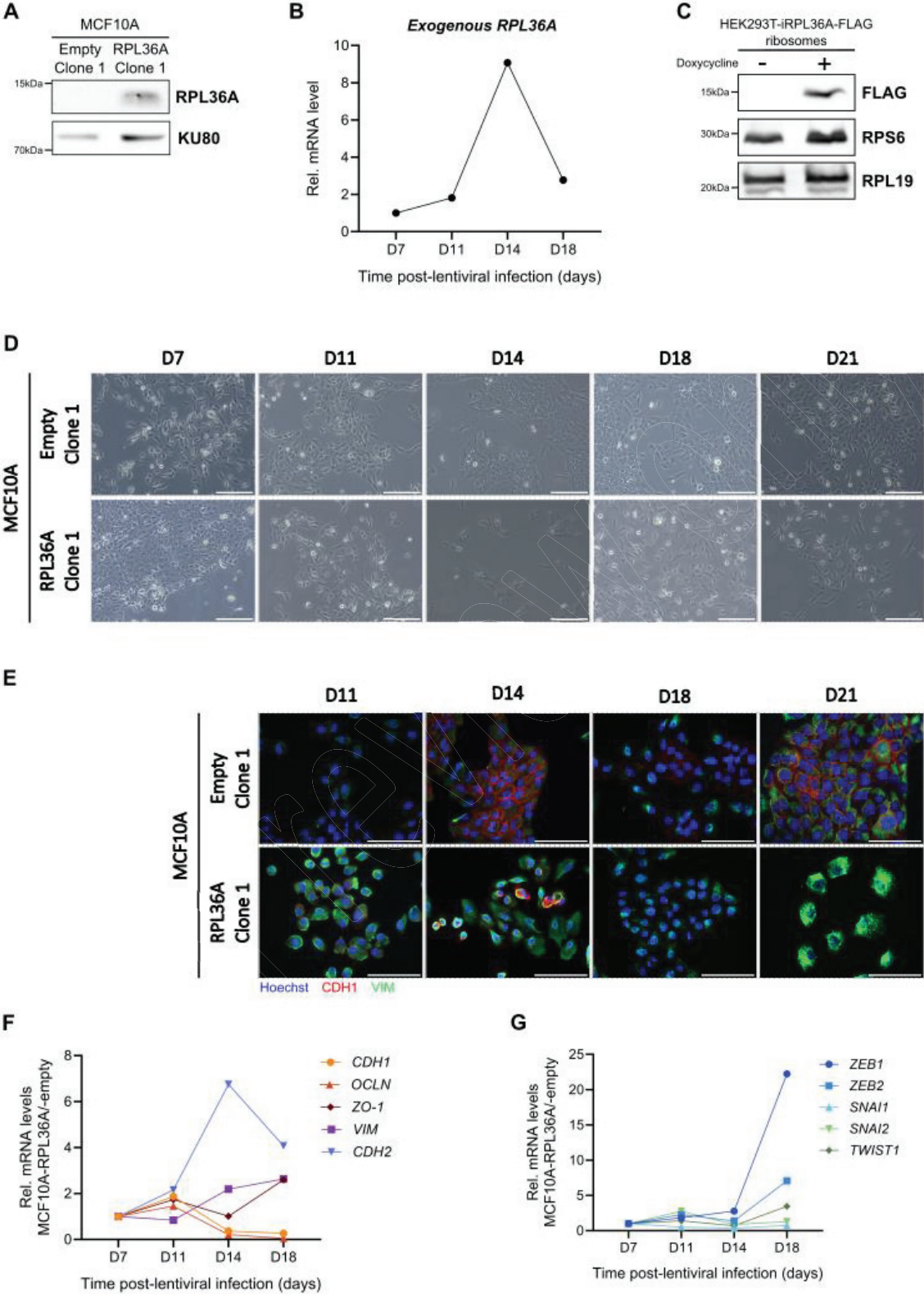


Figure 5

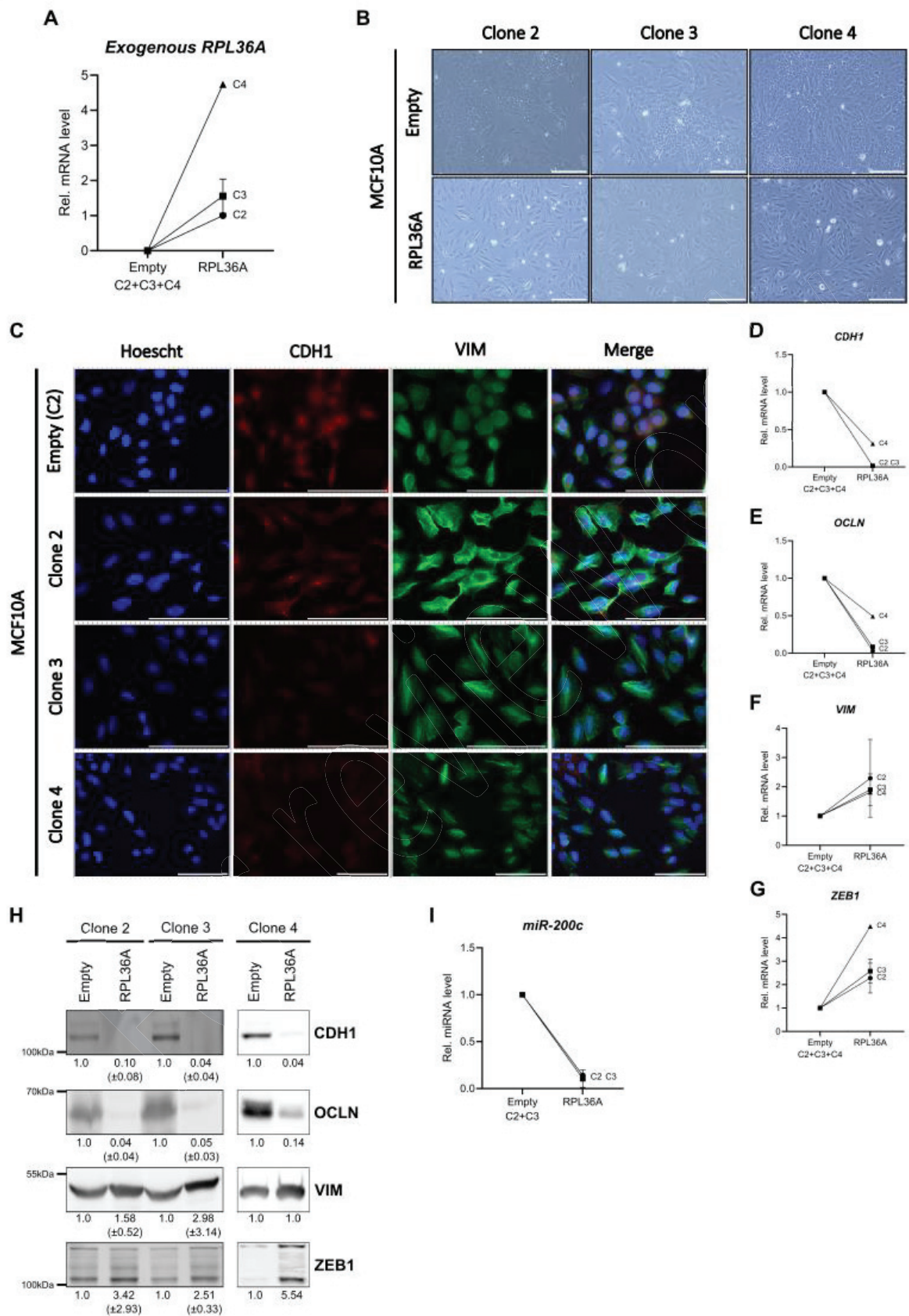


Figure S1

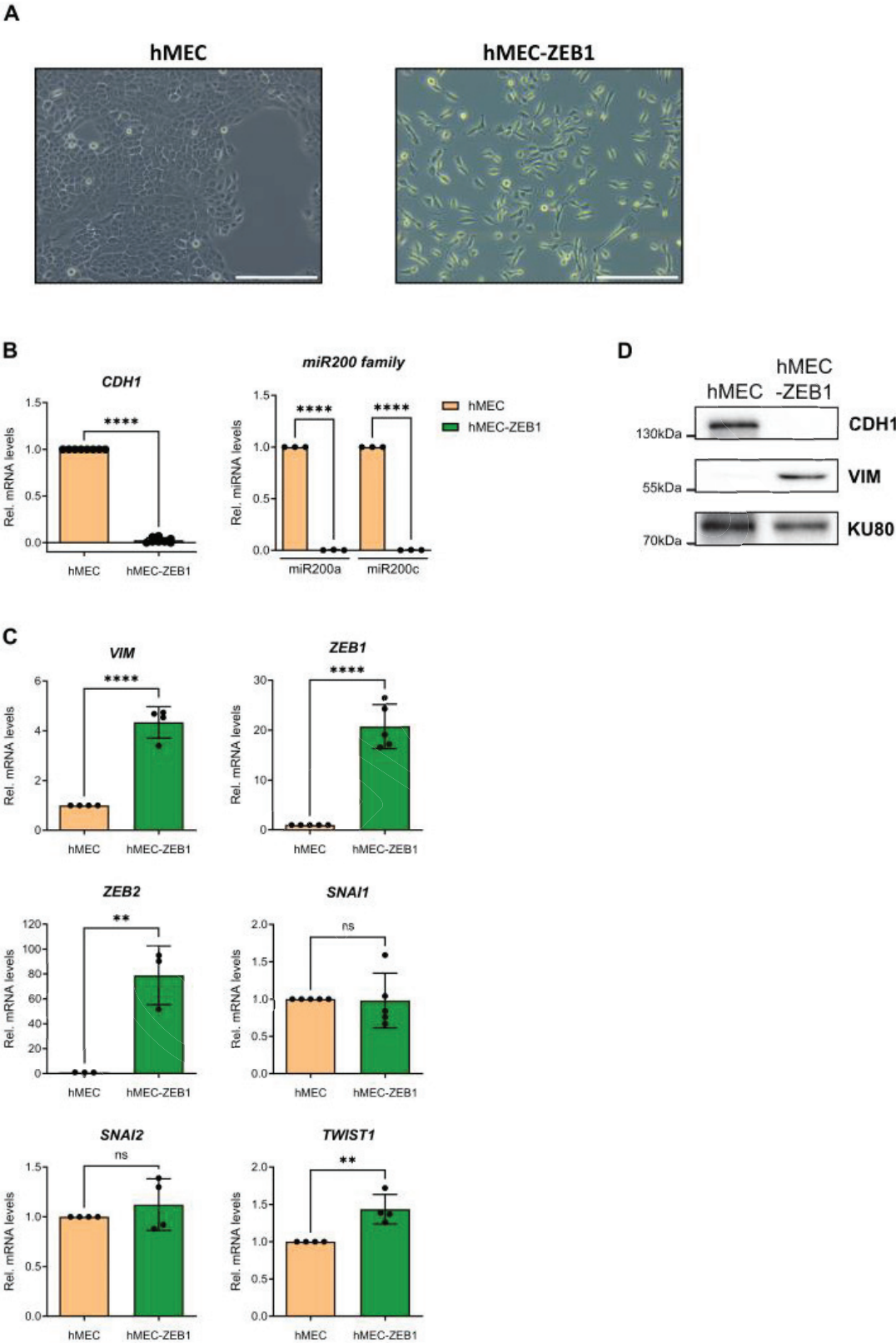


Figure S2

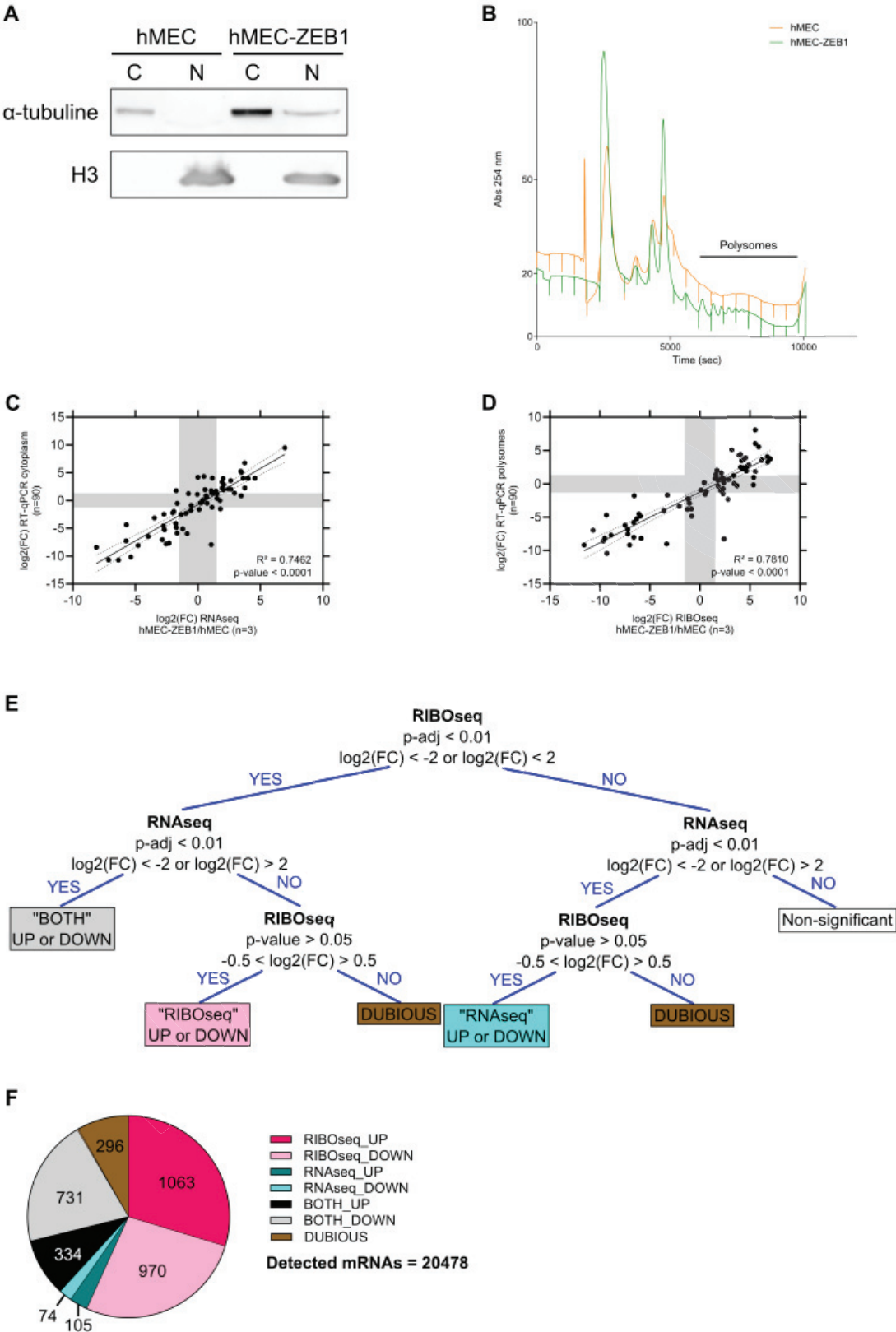


Figure S3

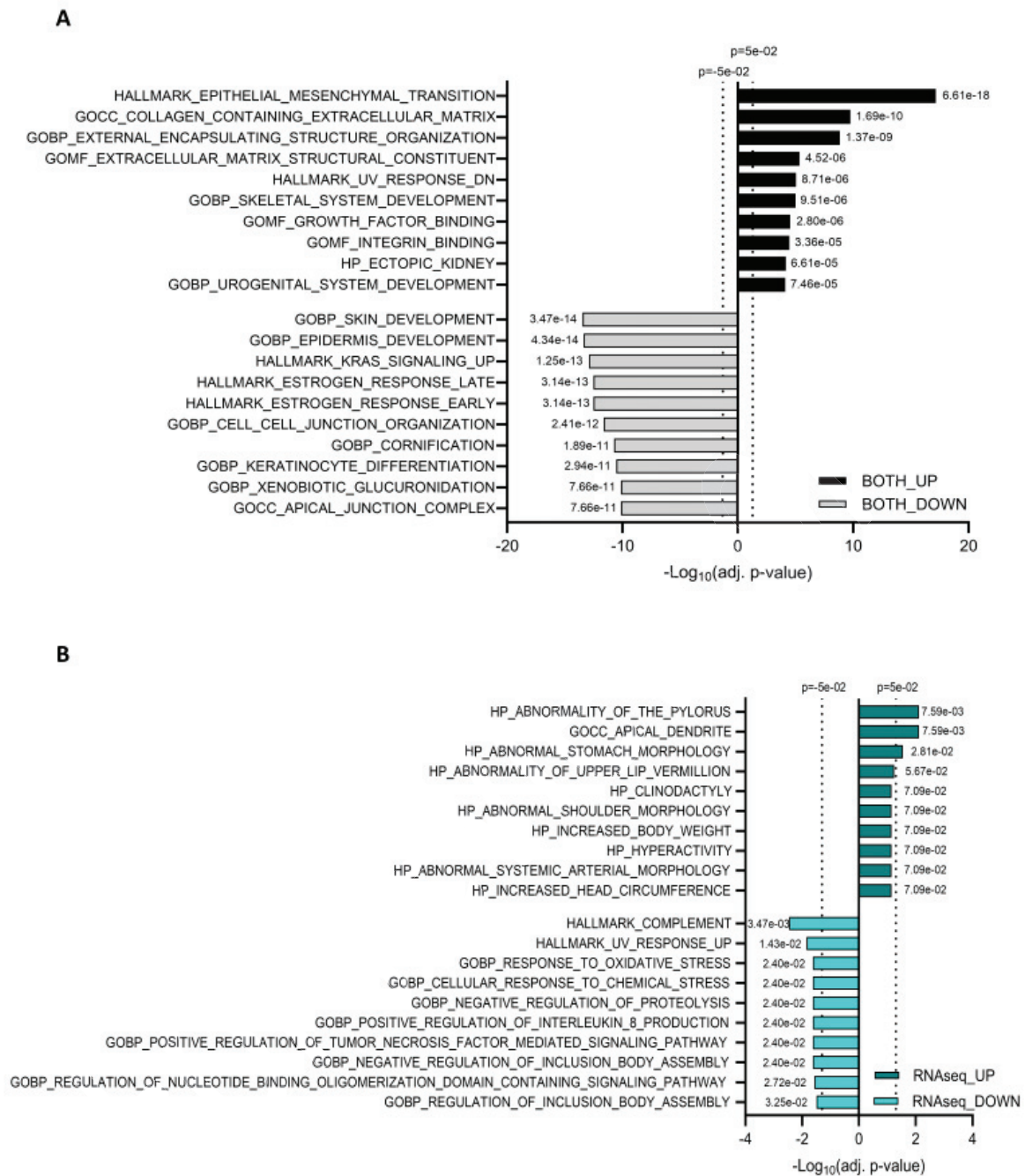


Figure S4

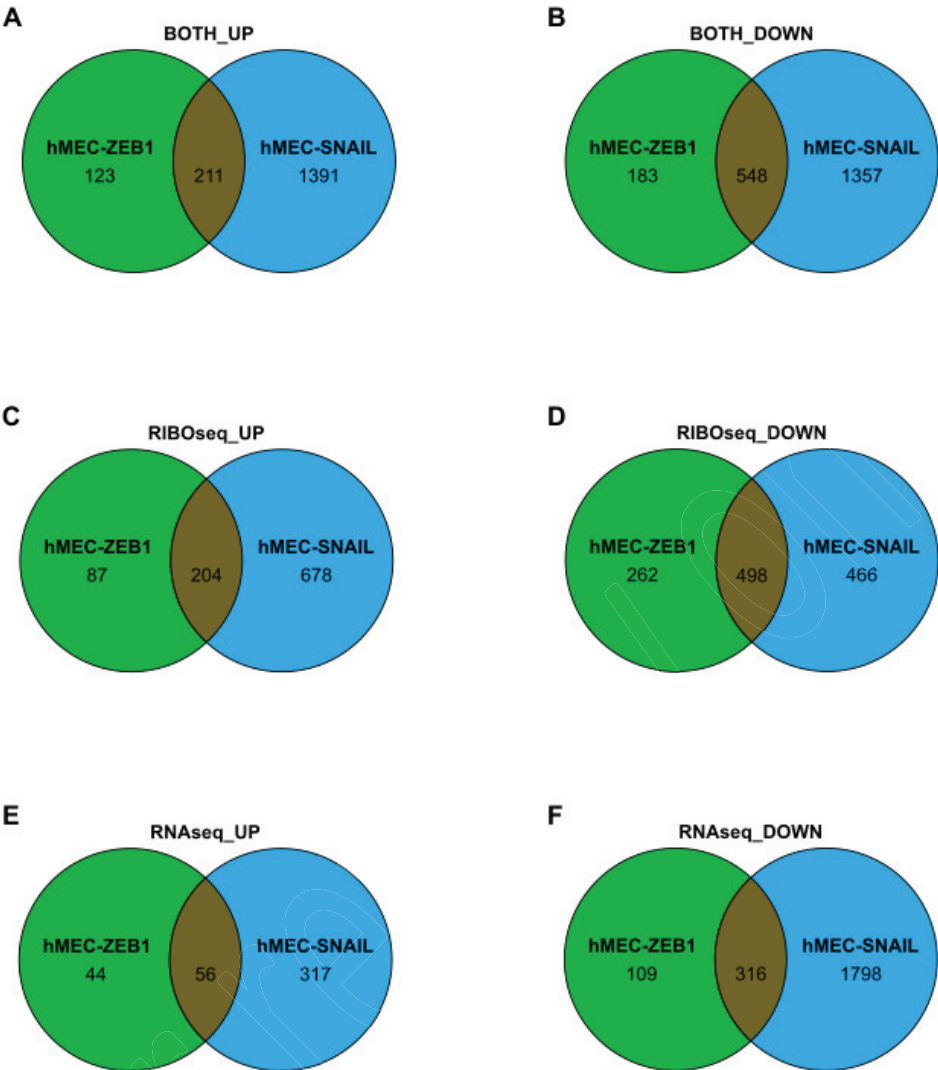


Figure S5

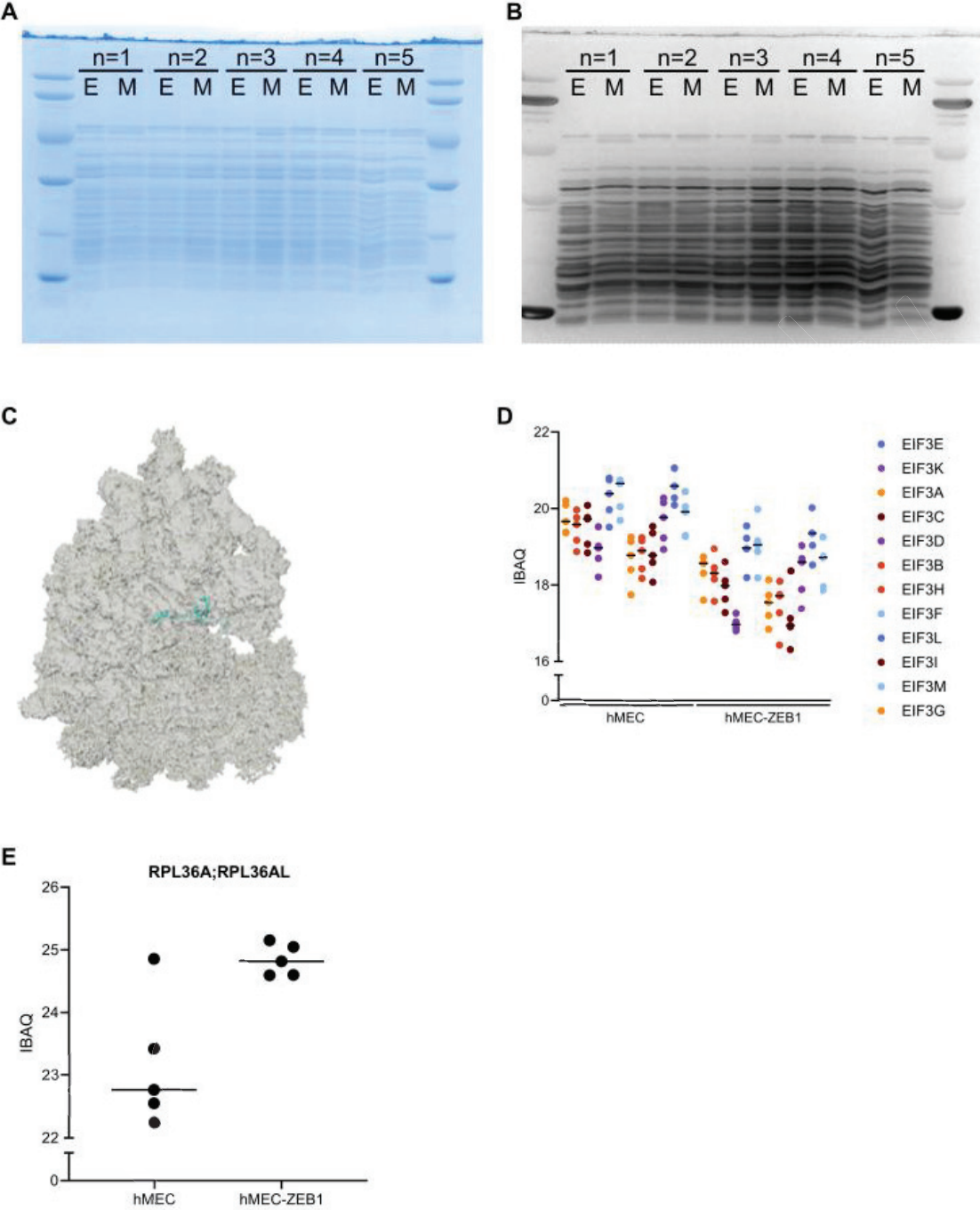


Figure S6

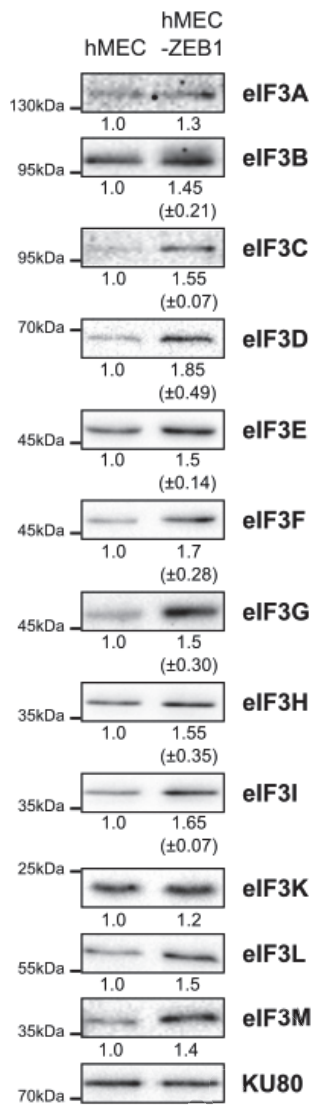


Figure S7

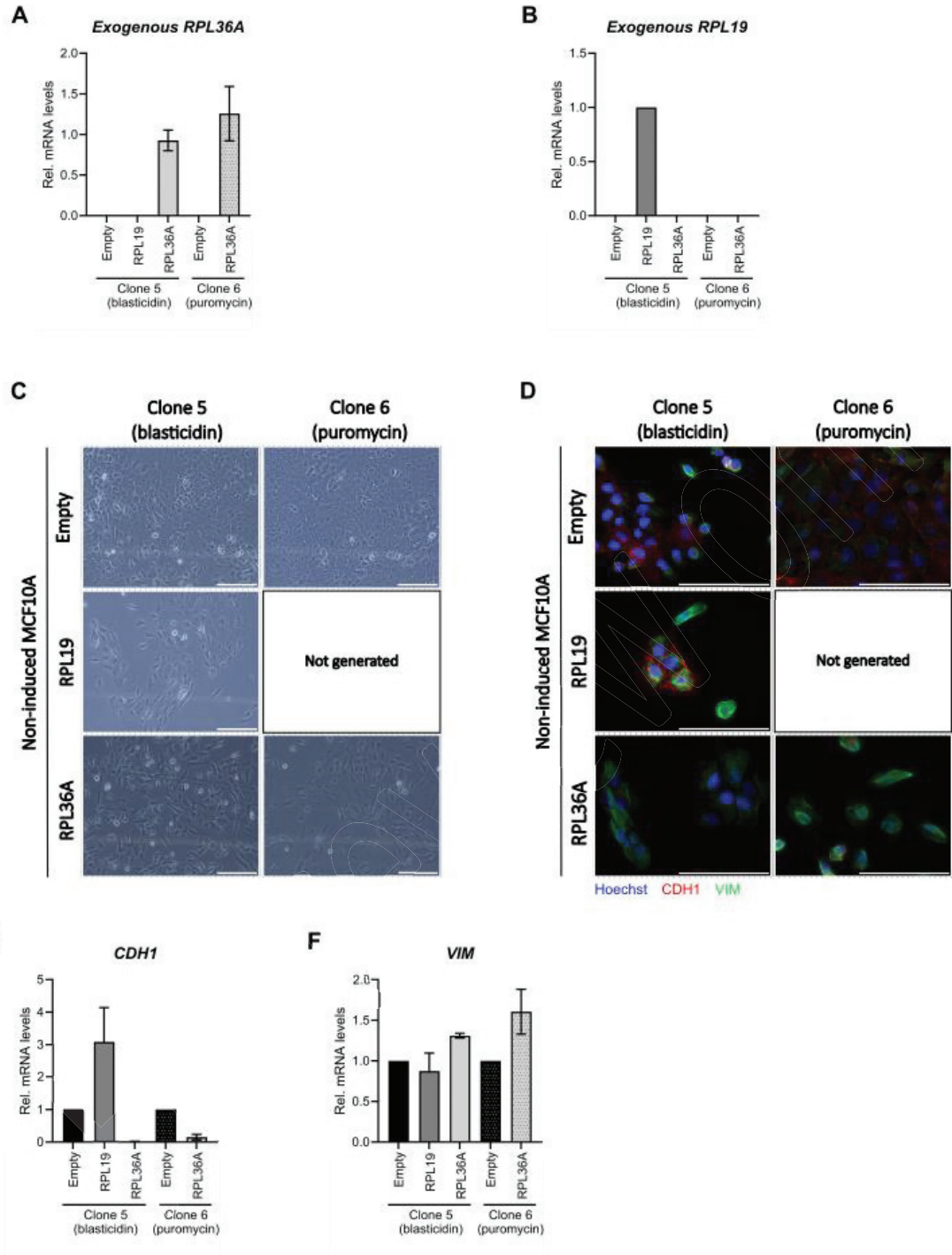
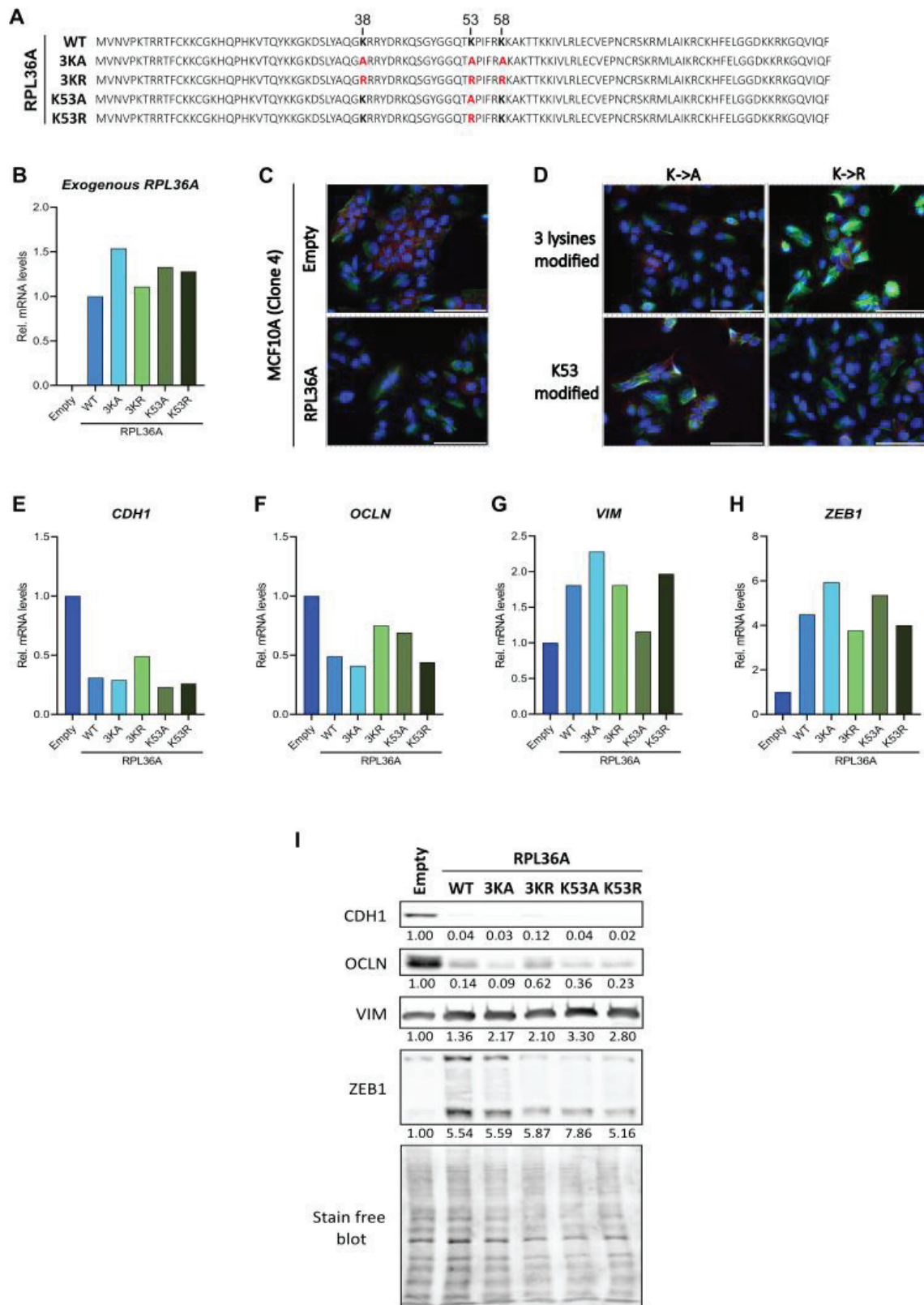


Figure S8



DISCUSSION

L'EMT est un phénomène physiologique dont les régulations épigénétiques et transcriptionnelles ont été largement documentées depuis sa découverte. Plusieurs études soutiennent également depuis les années 2000, le rôle de la régulation traductionnelle dans ce processus cellulaire. Par exemple, la réactivation via une régulation traductionnelle de certains EMT-TFs ou protéines mésenchymateuses (*e.g.*, SNAIL, ZEB1, TWIST1, VIM, COL1, etc.) de même que l'altération de l'expression de facteurs canoniques de la machinerie traductionnelle (*e.g.*, eIF3E, eIF5A2, 4E-BP1, etc.) induit l'initiation de l'EMT dans plusieurs contextes cellulaires (Morin *et al.*, 2022). Néanmoins, le rôle du ribosome dans la régulation traductionnelle et l'initiation de l'EMT n'a jamais été étudié. Dans mes travaux de thèse, j'ai notamment démontré que la composition du ribosome est modulée au cours de l'EMT, mais aussi que celle-ci contribue à l'initiation de l'EMT.

I. Hétérogénéité de composition en contexte physiologique et dynamique de l'EMT

Dans les travaux présentés précédemment, j'ai proposé la caractérisation de la composition du ribosome au cours de l'EMT. L'ensemble de mes travaux a démontré que la composition du ribosome est différente entre cellules épithéliales et mésenchymateuses, la plasticité cellulaire se reflétant dans la plasticité de la composition du ribosome. Deux points me semblent importants à noter. Tout d'abord, cette caractérisation a été réalisée à la fois entre états finaux et intermédiaires de l'EMT. De plus, la composition du ribosome a été caractérisée, pour la première fois, sous l'angle des modifications chimiques des ARN ribosomiques et des protéines ribosomiques à l'aide d'un même modèle cellulaire, permettant d'envisager une vision plus globale de son hétérogénéité.

1. Hétérogénéité de composition du ribosome entre les états finaux de l'EMT : épithélial *versus* mésenchymateux

Le choix d'utiliser un modèle stable était simple : il était dans un premier temps essentiel de favoriser une certaine homogénéité cellulaire afin de faire ressortir de potentielles

modulations du niveau de 2'Ome des ARNr. Or, comme explicité dans l'introduction, les modèles expérimentaux de l'EMT transitent par des phases intermédiaires dont la caractérisation reste complexe (J. Yang *et al.*, 2020). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser les cellules épithéliales mammaires humaines (hMEC) surexprimant ou non l'EMT-TF ZEB1 (hMEC-ZEB1), représentant des états stables épithéliaux et mésenchymateux, l'EMT-TF ZEB1 étant un inducteur fort de l'EMT (Morel *et al.*, 2012). Or, l'utilisation de modèles cellulaires sur-exprimant des EMT-TFs pour étudier l'EMT reste discutable. En effet, physiologiquement, les EMT-TFs sont réactivés de façon successive et/ou concomitante : c'est le réseau dynamique élaboré par ces EMT-TFs qui induit la mise en place d'une EMT particulière (Nieto *et al.*, 2016; J. Yang *et al.*, 2020). Le modèle de référence pour l'étude de l'EMT reste la lignée épithéliale MCF10A traitée au TGF β pour induire l'EMT. Nous nous sommes efforcés de valider nos données dans ce modèle plus physiologique, quand nos approches expérimentales permettaient son utilisation.

a. Hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr

Au cours des dernières années, plusieurs études ont suggéré l'existence d'une hétérogénéité du niveau de la 2'-O-ribose méthylation (2'Ome) des ARNr au cours de l'EMT, bien que ces données restent des indications indirectes (Gong *et al.*, 2017; Mourksi *et al.*, 2020; Puppo *et al.*, 2022; D. Zheng *et al.*, 2015). Par exemple, l'augmentation de l'expression du snoARN SNORA23A, guidant la 2'Ome au site 28S_Cm4506, inhibe les capacités de prolifération, migration et invasion des cellules de carcinome hépatique (*i.e.*, marqueurs des cellules mésenchymateuses) (Z. Liu *et al.*, 2022). En 2020, Marcel *et al.* ont également démontré par RiboMethSeq que des variations du niveau de 2'Ome des ARNr étaient observables entre tumeurs mammaires de sous-type luminal (*i.e.*, enrichi en cellules *epithelial-like*) et de sous-type triple-négatif (*i.e.*, enrichi en cellules *mesenchymal-like*), soutenant l'existence d'une variabilité de 2'Ome entre statut épithélial et mésenchymateux (Marcel *et al.*, 2020). Cependant, aucune de ces données n'a permis de démontrer clairement l'existence de l'hétérogénéité de 2'Ome des ARNr dans le processus de l'EMT.

Pour répondre à cette question, je me suis concentrée sur la comparaison de composition du ribosome de modèles cellulaires reflétant un état épithélial (hMEC) et mésenchymateux (hMEC-ZEB1) par RiboMethSeq.

Ce modèle cellulaire présente une variation du taux de 2'Ome sur une vingtaine de sites entre l'état épithélial hMEC et mésenchymateux hMEC-ZEB1 (cf. Article 1). Parmi ces 20 sites variables, 14 ont été décrits dans la littérature comme variables entre tissus sains et pathologiques (*i.e.*, tumeurs mammaires, leucémies aiguës myéloïdes ou dyskératose congénitale) (Marcel *et al.*, 2020; Motorin *et al.*, 2021; Nachmani *et al.*, 2019; F. Zhou *et al.*, 2022) et un site a été décrit comme ayant un impact traductionnel, sans description de son impact phénotypique (*i.e.*, 18S_Cm174) (Jansson *et al.*, 2021). Nos données permettent donc de conforter l'existence d'une hétérogénéité de modifications chimiques à certains sites de 2'Ome des ARNr uniquement entre différents contextes biologiques.

Sur la base de ces 20 sites de 2'Ome les plus variables, identifiés en réponse à la surexpression de ZEB1, la classification hiérarchique de plusieurs lignées cellulaires hMEC surexprimant d'autres EMT-TFs (*i.e.*, ZEB2, TWIST1) a démontré que la signature 2'Ome des ARNr permet la discrimination des cellules épithéliales et mésenchymateuses *in vitro* (cf. Article 1). Ces données soutiennent une hétérogénéité de 2'Ome des ARNr dans l'EMT. Par ailleurs, le site qui présente le plus de variation est le site 28S_Um2402 (*i.e.*, diminution significative de 10% dans les cellules mésenchymateuses hMEC-ZEB1 par rapport aux cellules épithéliales hMEC). Ce résultat a été confirmé à la fois dans les lysats cytoplasmiques (*i.e.*, ribosomes matures) et dans les ribosomes traductionnellement actifs (*i.e.*, polysomes). Ces données démontrent l'existence de ribosomes actifs de composition différente au sein des cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales. En particulier, nos analyses montrent que la réduction de la 2'Ome au site 28S_Um2402 est spécifique des cellules mésenchymateuses ayant réalisé une EMT complète (*i.e.*, surexprimant un EMT-TF fort tel que ZEB1 ou ZEB2).

L'approche utilisée dans notre étude (*i.e.*, analyse de RiboMethSeq sur profils de polysomes) est innovante et n'a jamais été publiée auparavant. Nos résultats permettent ainsi de démontrer (i) la faisabilité d'une telle approche et (ii) que les résultats obtenus dans les polysomes ne concordent pas systématiquement avec ceux obtenus dans les cytoplasmes totaux. De ce fait, il apparaît que toutes les modifications observées par RiboMethSeq sur des ARNr cytoplasmiques totaux (*i.e.*, approche utilisée jusqu'à présent dans la littérature) ne sont pas nécessairement présentes dans les ribosomes actifs (*i.e.*, en cours de traduction) et pourraient ainsi biaiser les conclusions émises. Néanmoins, il est à noter que certaines modifications chimiques, telles que 28S_Um2402, sont détectables à la fois dans les extraits cytoplasmiques totaux et dans les polysomes. Ainsi, il semble qu'une validation systématique de la présence

des modifications chimiques détectées dans les cytoplasmes totaux doit être réalisée dans les polysomes afin de pouvoir conclure sur une potentielle altération de la composition et/ou activité du ribosome.

Il reste à évaluer si les variations du niveau de 2'Ome permettent de discriminer les cellules épithéliales et mésenchymateuses *in vivo*, directement dans les échantillons humains. A ce jour, des études complémentaires en ce sens sont actuellement en cours au sein de mon laboratoire d'accueil sur des tumeurs mammaires aux caractéristiques épithéliales *versus* mésenchymateuses. Ces études sont réalisées sur la base de deux cohortes de tumeurs mammaires pour lesquelles nous disposons à la fois les données de RiboMethSeq et de transcriptomique ou d'expression d'EMT-TFs. Pour le moment, nous avons tout de même démontré dans l'Contexte que les variations de 2'Ome obtenues dans les lignées cellulaires hMEC et dérivées sont reproductibles dans des lignées représentatives des cancers du sein aux caractéristiques épithéliales (*i.e.*, non *Claudin-low*) ou mésenchymateuses (*i.e.*, *Claudin-low*). Ainsi, ces données démontrent une diminution significative de la 2'Ome au site 28S_Um2402 dans les lignées cellulaires *Claudin-low* par rapport aux lignées cellulaires non *Claudin-low*.

Outre la 2'Ome, qui est la modification chimique des ARNr la plus abondante, la pseudo-uridylation constitue également un élément important de l'hétérogénéité de composition du ribosome avec plus d'une centaine de sites recensés (Krogh *et al.*, 2016; Taoka *et al.*, 2018). En particulier, une étude de Tang *et al.* a montré que la surexpression du snoARN SNORA71A est cliniquement retrouvée dans les tissus de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), et est associée *in vitro* à une augmentation des capacités d'invasion, de migration et d'EMT des cellules de CBNPC (G. Tang *et al.*, 2019). Ainsi, cette étude suggère un lien entre pseudo-uridylation des ARNr et EMT, même si les variations de pseudo-uridylation n'ont pas été démontrée dans cette étude. Il est à noter que la base de données snoDB suggère des rôles non-canoniques pour SNORA71A (Bergeron *et al.*, 2023). De ce fait, l'étude de la pseudo-uridylation entre cellules épithéliales et mésenchymateuses permettrait de valider et/ou supporter le rôle de cette modification chimique dans l'EMT, mais également d'évaluer plus globalement l'hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr dans l'EMT.

b. Hétérogénéité des protéines ribosomiques

Les travaux réalisés dans ce manuscrit se sont également intéressés à la composition protéique du ribosome entre cellules épithéliales et mésenchymateuses. Ainsi, il a été montré que les cellules mésenchymateuses (*i.e.*, hMEC-ZEB1) possèdent plus de ribosomes contenant la protéine RPL36A que les cellules épithéliales (*i.e.*, hMEC). Ces données ont été démontrées biochimiquement (*i.e.*, Western blot) et par des analyses haut-débit (*i.e.*, spectrométrie de masse) sur ribosomes purifiés.

Néanmoins, l'origine exacte de cette différence d'incorporation de RPL36A dans le ribosome reste obscure. En effet, nos données suggèrent que cette altération ne dépend pas d'une augmentation de l'expression de RPL36A dans les cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales, ni au niveau ARNm, ni au niveau protéique. Une hypothèse serait que le taux de modifications post-traductionnelles de RPL36A varie entre les deux états finaux de l'EMT, induisant des biais de détection lors des analyses biochimiques et omiques. En effet, seul un peptide est différentiellement détecté entre cellules épithéliales et mésenchymateuses, ce peptide correspondant aussi à la région détectée par l'anticorps disponible. Pour tester cette hypothèse, et aux vues de la rareté des anticorps anti-RPL36A, la réalisation d'une spectrométrie de masse sur ribosomes purifiés dédiée à la détection des modifications post-traductionnelles des protéines devrait être envisagée.

De plus, bien que nous ayons montré une augmentation de la proportion des ribosomes contenant RPL36A dans les cellules hMEC-ZEB1 comparé aux cellules épithéliales hMEC, la validation de la composition protéique du ribosome dans d'autres modèles est indispensable pour déterminer si cette modulation est spécifique de ZEB1 ou, au contraire, un marqueur général de l'EMT. En particulier, l'utilisation du modèle cellulaire MCF10A, plus physiologique, pourrait répondre à cette question en comparant des ribosomes purifiés de cellules épithéliales (*i.e.*, MCF10A) et mésenchymateuses (*i.e.*, MCF10A induites au TGF β). Ces analyses sont actuellement en cours dans mon laboratoire d'accueil.

La question de l'hétérogénéité protéique du ribosome au cours de l'EMT pourrait être abordée par une étude *in vivo*, bien que plus complexe. En effet, dans la mesure où aucune variation de la quantité totale d'ARNm et de protéines codant pour RPL36A n'est détectée,

seule l'analyse de ribosomes purifiés permettrait une telle démonstration dans des échantillons humains. Or, la purification de ribosomes nécessite une grande quantité d'échantillon de départ (*i.e.*, 500µg de protéines cytoplasmiques), ainsi qu'une préservation suffisante de l'intégrité tissulaire et cellulaire pour réaliser un fractionnement cytoplasmique propre. De ce fait, l'analyse *in vivo* de la composition protéique du ribosome *via* des technologies nécessitant la purification de ribosomes devra être développée dans le futur. Une autre possibilité pour étudier la présence ou l'absence de RPL36A dans les ribosomes *in vivo* est la *Proximity Ligation Assay* (PLA). En effet, cette technique permettrait l'analyse de coupes tissulaires en marquant spécifiquement RPL36A et une autre protéine ribosomique proche (*e.g.*, RPL5, RPL10A, RPL11, RPL21). Cependant, cette technique requière l'obtention d'un anticorps anti-RPL36A et d'un anticorps anti-RPL capables de cibler leur protéine d'intérêt lorsque celle-ci est présente au sein du ribosome structuré. Malheureusement, les essais de *dot blot* (*i.e.*, dépôt de ribosomes purifiés conformés sur membrane de nitrocellulose suivi d'un marquage par anticorps primaire d'intérêt et d'une révélation) réalisés au cours de mon doctorat avec l'anticorps anti-RPL36A à ma disposition n'ont pas été fructueux. Ainsi, la mise au point de cette technique avec de nouveaux anticorps anti-RPL36A semble indispensable avant de pouvoir réaliser les essais de PLA.

2. Hétérogénéité de composition du ribosome en contexte dynamique

Dans la littérature, plusieurs études concernant la composition du ribosome ont vu le jour ces dernières années. De la même façon que nous avons procédé ci-dessus, ces études se sont centrées sur l'analyse de la composition du ribosome entre deux états physio-pathologiques distincts. Or, la manière dont la composition du ribosome est modulée dynamiquement au cours d'un processus biologique reste inexplorée. L'EMT étant un processus dynamique (J. Yang *et al.*, 2020), ce modèle m'a permis d'aborder pour la première fois cette question.

a. Hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr

L'analyse de la 2'Ome entre deux états cellulaires stables de l'EMT nous a permis de mettre en évidence, de manière reproductible et robuste, que le niveau de 2'Ome du site 28S_ Um2402 est différent entre cellules épithéliales et mésenchymateuses. En complément,

nous nous sommes intéressés à la dynamique du niveau de méthylation à ce site au cours de l'EMT induite par l'EMT-TF ZEB1 dans le modèle inductible hMEC-i-ZEB1.

Les données de 2'Ome obtenues dans le modèle hMEC-i-ZEB1 montrent que le niveau de 2'Ome au site 28S_Um2402 diminue progressivement au cours de l'acquisition des marqueurs mésenchymateux (*i.e.*, ZEB1, VIM). De plus, cette diminution de 2'Ome est corrélée à la diminution de l'expression des deux snoARNs guides associés à ce site, SNORD143 et SNORD144. Ces données confortent les données obtenues par RiboMethSeq entre les états finaux de l'EMT, et soutiennent également l'existence d'une régulation dynamique de la 2'Ome au cours de l'EMT. Ces données ne permettent cependant pas de comprendre avec précision la dynamique moléculaire reliant les variations d'expression de ZEB1 et de SNORD143 et SNORD144. Ces données montrent pour la première fois que le niveau de 2'Ome des ARNr varie dynamiquement dans un même modèle cellulaire en cours de changement d'identité cellulaire. Il conviendra de valider ces observations dans un autre modèle pour déterminer si cette dynamique est spécifique ou non de l'EMT-TF ZEB1. Le modèle MCF10A inductible au TGF β pourrait représenter un modèle adéquat pour répondre à cette interrogation.

Le parallèle entre changement de niveau de 2'Ome des ARNr au site 28S_Um2402 et expression des snoARNs guides laisse envisager la faisabilité d'une étude fonctionnelle. En effet, afin de mieux comprendre le rôle de la méthylation au site 28S_Um2402 dans l'établissement du phénotype mésenchymateux, l'inhibition de SNORD143 et SNORD144 semble être la méthode la plus appropriée. L'inhibition des snoARNs guides dans des cellules épithéliales pourrait permettre de déterminer si la diminution de la 2'Ome au site 28S_Um2402 est (i) un inducteur de l'EMT, (ii) nécessaire, en plus d'autres inducteurs (*e.g.*, EMT-TFs, TGF β), à l'établissement de l'EMT ou (iii) un effet collatéral de l'induction de l'EMT. Pour répondre à ces interrogations, des études sont actuellement en cours dans mon laboratoire d'accueil dans le modèle MCF10A inductible au TGF β .

b. Hétérogénéité des protéines ribosomiques

De la même façon que pour les modifications chimiques des ARNr, l'étude de la dynamique de la composition protéique du ribosome permettrait d'obtenir un modèle complet de l'hétérogénéité de composition du ribosome au cours de l'EMT.

Cependant, comme soulevé précédemment, la caractérisation de la composition protéique du ribosome nécessite sa purification, et donc une quantité non négligeable de matériel biologique de départ. De ce fait, il n'a pas été possible pour le moment de valider l'augmentation de la quantité de ribosomes contenant RPL36A de façon dynamique au cours de l'EMT. Pour permettre cela, il est préférable d'utiliser le modèle MCF10A inductible au TGF β afin (i) de pouvoir obtenir suffisamment de matériel biologique et (ii) de réaliser cette validation dans un modèle plus physiologique qu'une induction par ZEB1.

3. Modifications chimiques des ARNr et protéines ribosomiques : 2 faces d'une même pièce ?

Le ribosome étant composé d'ARNr et de protéines ribosomiques, l'étude des modifications de sa composition doit englober ces deux composants afin d'établir un modèle complet de son hétérogénéité de composition. Or, à l'heure actuelle, aucune étude n'a été menée sur ces deux aspects dans un même modèle cellulaire. Jusqu'à mes travaux, il était donc difficile de déterminer si l'hétérogénéité de composition du ribosome dans un contexte donné reposait uniquement sur un de ces composants, ou au contraire sur un ensemble de modifications. Cette première étape est effectivement clé pour comprendre le rôle de l'hétérogénéité de composition du ribosome dans la régulation traductionnelle et l'établissement de phénotypes particuliers.

Au cours de mon doctorat, j'ai pu caractériser la composition nucléotidique et protéique du ribosome dans un même modèle. Ainsi, bien que présentés de façon scindée, les deux articles de ce manuscrit montrent que les ribosomes épithéliaux et mésenchymateux purifiés présentent à la fois une modification du niveau de 2'Ome des ARNr et de stœchiométrie des protéines ribosomiques. Cependant, à l'heure actuelle, il n'a pas pu être établi si les ribosomes contenant la protéine RPL36A sont aussi ceux qui ne présentent pas de 2'Ome au site 28S_Um2402. Afin de répondre à cette question, il serait possible de purifier les ribosomes contenant la protéine RPL36A (*i.e.*, immunoprécipitation) et de réaliser un RiboMethSeq sur les ARNr contenus dans ces ribosomes.

Bien que nous ayons démontré que la composition des ribosomes varie au cours de l'EMT, il reste à déterminer si ces ribosomes de composition différente sont traductionnellement actifs. Tout d'abord, la qualification du site 28S_Um2402 comme étant un

site de 2'Ome variable a été réalisée sur des extraits cytoplasmiques, mais également sur des extraits polysomiques. De ce fait, il semble que les ribosomes mésenchymateux ne contenant pas la 2'Ome au site 28S_Um2402 sont traductionnellement actifs, de même que ceux contenant cette modification chimique. En revanche, l'existence de potentielles différences d'activité entre ces deux populations de ribosomes restent à être déterminée. Dans le cas de RPL36A, j'ai pu démontrer que les ribosomes contenant la protéine RPL36A sont présents dans les polysomes, et donc traductionnellement actifs (Figure 15). De ce fait, il semble que ces deux variations n'aient pas d'impact sur la maturité du ribosome et son implication dans le processus de traduction. Néanmoins, compte-tenu du fait que les ribosomes des cellules mésenchymateuses ont un taux d'erreur de lecture des codons stop supérieur à celui des cellules épithéliales (cf. Article 2), des interrogations se posent quant au rôle de RPL36A dans la fidélité de lecture du ribosome, et en particulier dans le non-respect des codons stops.

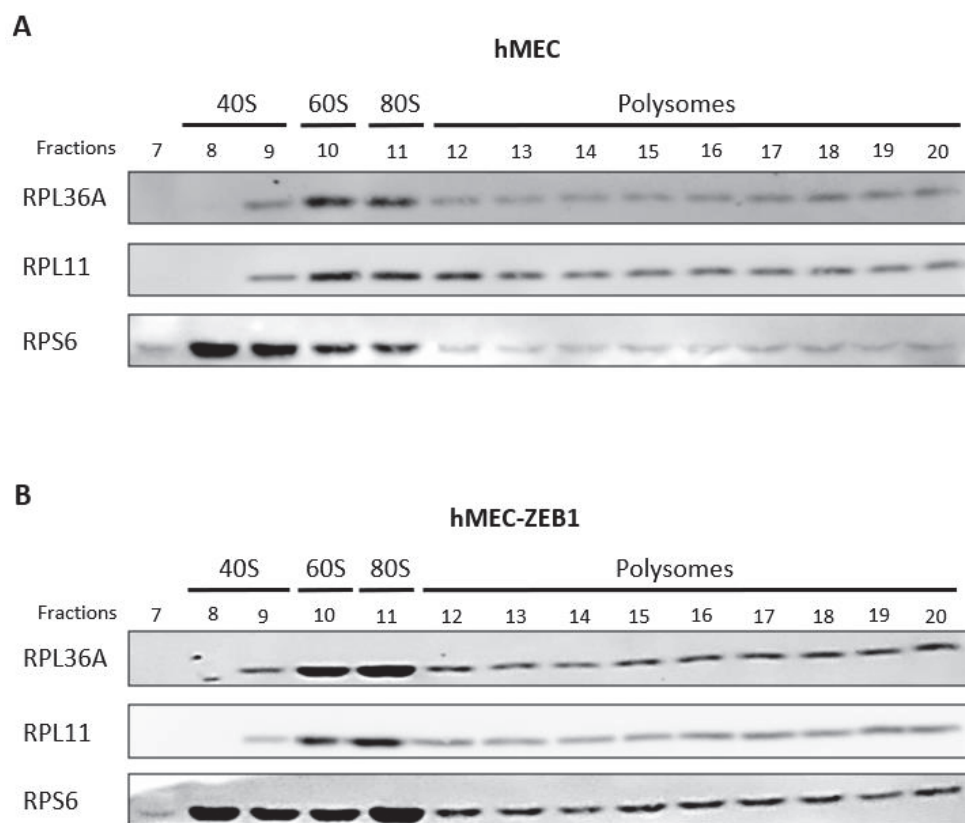


Figure 15 : Western blot sur profils de polysomes issus des lignées cellulaires hMEC (A) et hMEC-ZEB1 (B). Les protéines contrôles RPL11 et RPS6 sont présentes respectivement dans la grande et la petite sous-unité libres du ribosome, ainsi que dans les polysomes (i.e., ribosomes traductionnellement actifs). La protéine RPL36A est présente dans les grandes sous-unités libres (60S) ainsi que dans les ribosomes traductionnellement actifs. Ainsi, les ribosomes contenant la protéine RPL36A sont traductionnellement actifs dans les lignées cellulaires hMEC et hMEC-ZEB1.

Le rôle de ces deux variations de composition du ribosome (*i.e.*, RPL36A et 28S_Um2402) ne semble en revanche pas contradictoire. En effet, le site de 2'Ome 28S_Um2402 se situe au niveau du tunnel de sortie du néo-peptide, plus exactement à la sortie du tunnel emprunté par le néo-peptide, et est orienté vers l'intérieur de ce tunnel. Ainsi, il est possible de suggérer, sur la base des analyses structurales, que l'altération de la 2'Ome à ce site peut affecter le bon écoulement du néo-peptide vers la sortie du ribosome. La protéine RPL36A quant à elle est imbriquée dans le ribosome au niveau du site P. Le paralogue de RPL36A, RPL36AL, a été décrit chez la levure comme capable d'interagir avec l'ARNt présent dans le site P et de promouvoir le passage de l'ARNt du site P vers le site E (Baouz *et al.*, 2009; Hountondji *et al.*, 2012). En raison du taux de conservation existant entre les ribosomes de levures et de mammifères, il est possible de suggérer que le rôle de RPL36A est identique dans le ribosome humain. Ainsi, il semble que, sur la base des observations structurales, la méthylation au site 28S_Um2402 permet la régulation de la sortie du néo-peptide, tandis que, d'après les études biochimiques chez la levure, RPL36A régule le passage de l'ARNt du site P vers le site E. De ce fait, 28S_Um2402 et RPL36A pourraient avoir un rôle conjoint de régulation de l'élongation de la traduction. Aussi, l'hétérogénéité de composition du ribosome en RPL36A et/ou 28S_Um2402 pourrait avoir lieu de façon synchronisée et/ou complémentaire, mais des études moléculaires et mécanistiques sont à réaliser pour valider cette hypothèse.

II. Hétérogénéité de composition du ribosome : un nouvel inducteur de l'EMT ?

Dans la littérature, plusieurs études ont démontré que l'altération quantitative des ribosomes (*i.e.*, augmentation ou diminution du nombre de ribosomes) induit des modifications phénotypiques. En particulier, Prakash *et al.* ont démontré en 2019 que l'augmentation de la biogenèse des ribosomes dans les cellules épithéliales murines NMuMG induit l'initiation de l'EMT (Prakash *et al.*, 2019). Bien que ces études démontrent un lien entre altération quantitative des ribosomes et EMT, aucune n'a permis d'établir un lien direct entre variations qualitatives du ribosome et initiation de l'EMT.

1. Hétérogénéité des protéines ribosomiques

L'hétérogénéité protéique du ribosome semble être associée à l'EMT dans la publication de Shi *et al.* (Z. Shi *et al.*, 2017). En effet, dans les cellules embryonnaires de souris, les ribosomes contenant la protéine RPL10A traduisent préférentiellement les ARNm codant pour des protéines de la matrice extracellulaire, telles que LAMA1, COL4A2, TGFBI, MMP2, etc., tous étant des marqueurs mésenchymateux (Z. Shi *et al.*, 2017). Ces données suggèrent donc, depuis quelques années, un lien entre hétérogénéité de composition protéique du ribosome et EMT, sans démonstration directe du rôle du ribosome dans l'établissement du phénotype mésenchymateux.

Les travaux présentés dans l'Contexte démontrent que la surexpression d'une seule protéine ribosomique (*i.e.*, RPL36A) suffit à l'initiation de l'EMT dans le modèle cellulaire MCF10A. Conformément aux recommandations de la TEMTIA (J. Yang *et al.*, 2020), des analyses complémentaires sont indispensables pour conclure définitivement sur l'initiation de l'EMT par la surexpression de RPL36A, notamment sur les aspects comportementaux (*i.e.*, prolifération, migration, invasion, etc.). Néanmoins, la pluralité des marqueurs moléculaires étudiés dans ces travaux, associée aux données d'imagerie (*i.e.*, contraste de phase et immunofluorescence), suggèrent un lien fort entre surexpression de RPL36A et l'établissement d'un phénotype mésenchymateux dans les cellules MCF10A surexprimant RPL36A (*e.g.*, switch E-cadhérine/vimentine, morphologie fibroblastique, etc.).

Plusieurs études suggèrent que les protéines ribosomiques ont des activités extra-ribosomiques (Warner & McIntosh, 2009). Il n'est donc pas à exclure que l'impact de la surexpression de RPL36A soit dépendant d'une activité extra-ribosomique de cette protéine. Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée n'existe quant à une potentielle activité extra-ribosomique de RPL36A. Néanmoins, compte-tenu du fait que la forme surexprimée dans notre modèle est la forme native (*i.e.*, *wild-type*) de RPL36A, il n'est pas possible de différencier la forme exogène de la forme endogène au niveau protéique. De ce fait, nous avons vérifié, par surexpression d'une forme étiquetée (*i.e.*, RPL36A-Flag) dans des cellules HEK293T, que les formes exogènes de RPL36A s'intègrent dans les ribosomes. Bien que ces résultats ne soient qu'une preuve de concept, ils suggèrent que les modifications moléculaires et phénotypiques observées dans les cellules MCF10A suite à la surexpression de RPL36A soient dépendantes de l'activité intra-ribosomique de RPL36A.

D'un point de vue moléculaire, nous avons observé que les cellules MCF10A surexprimant RPL36A présente une surexpression protéique des EMT-TFs de la famille Snail, associée à une diminution de leur expression au niveau ARNm (Figure 16). Cette observation suggère que la surexpression de RPL36A induit une augmentation de la traduction des ARNm *SNAIL* et *SNAI2*. Cette hypothèse corrèle avec les données de la littérature démontrant une régulation traductionnelle spécifique des ARNm *SNAIL* au cours de l'EMT, par divers mécanismes moléculaires (Morin *et al.*, 2022).

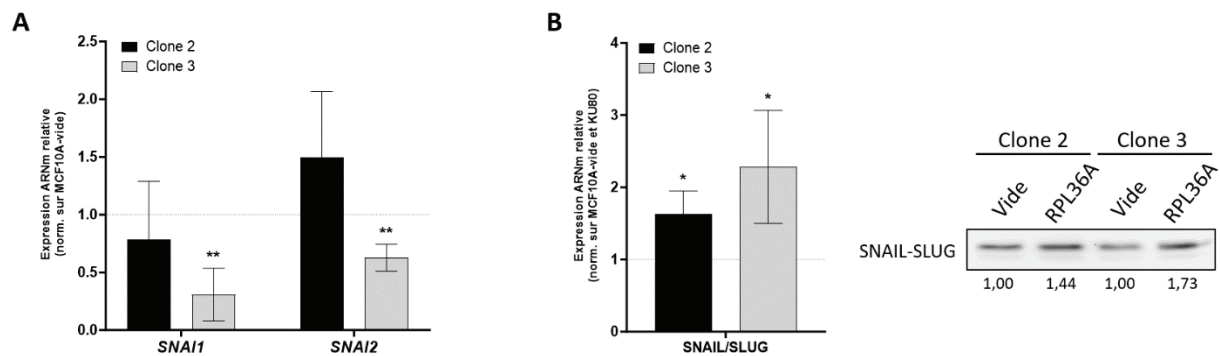


Figure 16 : Expression des EMT-TFs de la famille Snail dans le modèle cellulaire MCF10A surexprimant RPL36A (MCF10A-RPL36A). (A) Expression relative des ARNm *SNAIL* et *SNAI2* dans deux clones cellulaires MCF10A-RPL36A par rapport aux cellules ne surexprimant pas RPL36A (MCF10A-void). (B) Expression protéique relative de *SNAIL/SLUG* dans deux clones cellulaires MCF10A-RPL36A par rapport aux cellules ne surexprimant pas RPL36A (MCF10A-void).

Chez la levure, la déplétion de RPL36A diminue la traduction dépendante des IRES (Samanfar *et al.*, 2017). De plus, nos données de spectrométrie de masse sur ribosomes purifiés montrent une diminution de la quantité de 11 des 12 sous-unités d'eIF3 associées aux ribosomes mésenchymateux hMEC-ZEB1 par rapport aux ribosomes épithéliaux hMEC. Or, eIF3 est un complexe impliqué dans la traduction dépendante de la coiffe, suggérant ainsi une diminution de la traduction dépendante de la coiffe au cours de l'EMT. Sachant que l'ARNm *SNAIL* possède un IRES dans sa séquence 5'UTR (Evdokimova *et al.*, 2009), nous avons étudié la possibilité d'une régulation dépendante des IRES de *SNAIL* par RPL36A. Pour cela, les cellules HEK293T inductibles pour l'expression d'une forme étiquetée de RPL36A (*i.e.*, HEK293T-RPL36A-Flag) ont été utilisées pour des essais luciférase bicistroniques. Ces expériences permettent, *via* l'utilisation d'un plasmide codant pour les luciférase Renilla et Firefly séparées par la séquence 5'UTR d'intérêt, d'évaluer le taux de traduction dépendante d'un IRES par

rapport à celui de la traduction dépendante de la coiffe. Les résultats obtenus pour ces essais luciférase bicistroniques sont fournis en Figure 17. Nos données ne montrent pas de différence significative entre la traduction dépendante des IRES et la traduction dépendante de la coiffe, suggérant l'absence d'une régulation dépendante des IRES de l'ARNm *SNAI1* par la surexpression de RPL36A. Il est à noter qu'en absence de RPL36A, l'activité IRES de l'ARNm *SNAI1* est augmentée en réponse à la tunicamycine ou à la thapsigargine, démontrant que ce système rapporteur bicistronique est fonctionnel. Cependant, le contrôle positif de cette expérience (*i.e.*, IRES de *IGF1R*) ne présente lui non plus pas de régulation traductionnelle particulière en réponse à la surexpression de RPL36A, suggérant que la surexpression de RPL36A n'affecte pas la traduction IRES dépendante comme démontré chez la levure. De ce fait, plusieurs hypothèses sont à l'étude. Bien que nous ayons démontré que les ribosomes HEK293T incorporent RPL36A suite à sa surexpression, il est possible que les cellules HEK293T possèdent déjà 100% de ribosomes contenant RPL36A à l'état basal, empêchant ainsi une augmentation de l'intégration de cette protéine et donc l'observation d'un effet traductionnel en condition de surexpression. De plus, sachant que la traduction dépendante des IRES induite par RPL36A a été observée chez la levure en condition de stress environnementaux (*i.e.*, chocs thermiques et chimiques), est-ce que la régulation traductionnelle dépendante des IRES médiée par cette protéine est spécifique à une réponse au stress environnemental ?

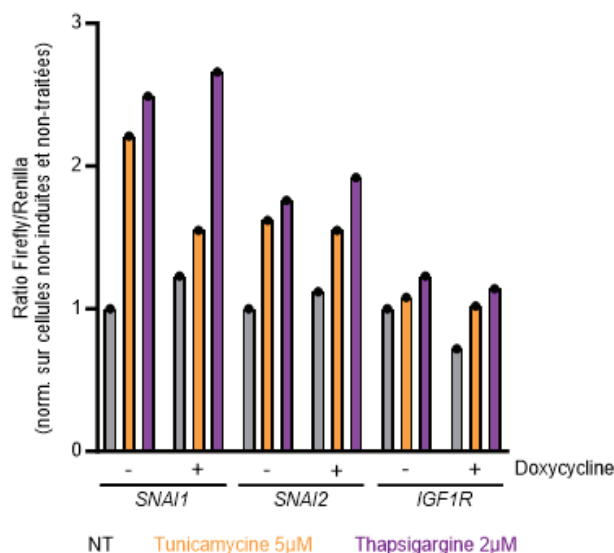


Figure 17 : Ratio de l'expression de l'ARNm codant pour la luciférase Firefly par rapport à celui de la luciférase Renilla dans la lignée HEK293T-RPL36A-Flag. Aucune différence significative n'est observable pour aucune des trois séquences analysées (*SNAI1*, *SNAI2* et *IGF1R*) en réponse à la surexpression de RPL36A-FLAG (+ doxycycline), suggérant l'absence de régulation dépendante des IRES par RPL36A.

2. Hétérogénéité des modifications chimiques des ARNr

Malgré la démonstration de l'existence de ribosomes actifs possédant un profil de 2'Ome des ARNr différent entre cellules épithéliales et mésenchymateuses, il n'a pas été démontré que cette modulation impacte l'activité traductionnelle des ribosomes. En effet, bien qu'il ait été mis en évidence dans ce modèle l'existence d'une régulation traductionnelle au moins aussi importante que la régulation transcriptionnelle, il sera indispensable de démontrer le lien direct entre modulation de la 2'Ome au site 28S_Um2402 et activité traductionnelle du ribosome.

Afin d'évaluer l'impact de la 2'Ome de 28S_Um2402 sur l'activité traductionnelle du ribosome, il est envisageable d'altérer l'expression des snoARNs guidant la 2'Ome à ce site (*i.e.*, SNORD143 et SNORD144). En effet, on peut supposer que l'inhibition de SNORD143 et SNORD144 par la technologie *Antisense LNA GapmeR* (*i.e.*, interférence ARN) dans les cellules épithéliales hMEC puisse générer des ribosomes dépourvus de la 2'Ome 28S_Um2402. A l'inverse, dans la mesure où une diminution de l'expression de SNORD143 et SNORD144 a été détectée dans les cellules mésenchymateuses hMEC-ZEB1, il peut être envisagé d'induire la surexpression de ces deux snoARNs dans ce modèle cellulaire afin de générer des ribosomes présentant la méthylation d'intérêt. Dans ces deux contextes de modulation de l'expression de SNORD143 et SNORD144, la réalisation d'un RiboMethSeq de validation couplé à un *Ribosome Profiling* pourrait permettre de démontrer le rôle de la méthylation 28S_Um2402 dans la régulation traductionnelle.

Néanmoins, de récentes études font émerger de nouveaux rôles non-canoniques pour les snoARNs, principalement des rôles de régulateurs traductionnels par interaction avec des ARNm (*i.e.*, activité *miRNA-like*) (Ender *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2010). Ainsi, des études de prédiction d'interaction des snoARNs SNORD143 et SNORD144 avec d'autres cibles que l'ARNr 28S doivent être envisagées. Ces potentielles cibles non-canoniques devront alors être étudiées en parallèle de l'inhibition des snoARNs afin de confirmer une indépendance entre régulation traductionnelle et activité(s) non-canonique(s) des snoARNs. A l'heure actuelle, aucune donnée biologique ou de prédiction n'a pour le moment suggéré une activité non-canonique potentielle pour SNORD143 et SNORD144 (Bergeron *et al.*, 2023).

CONCLUSION

Les données obtenues au cours de ma thèse démontrent pour la première fois l'existence de l'hétérogénéité de composition du ribosome au cours de l'EMT, à la fois entre états finaux, mais également de façon dynamique (Figure 18A). Cette hétérogénéité touche à la fois la 2^{ème} des ARNr et la composition protéique du ribosome. Bien qu'il ne soit pas encore possible de déterminer si les ribosomes contiennent ces deux variations en même temps, nos données suggèrent que ces ribosomes de composition différente sont traductionnellement actifs, puisque présents dans les polysomes. Néanmoins, des études plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer l'impact exact de ces variations de composition sur l'activité traductionnelle du ribosome (Figure 18).

D'un point de vue phénotypique, il est possible de conclure grâce aux données obtenues. La surexpression de la protéine ribosomique RPL36A seule est suffisante pour induire l'EMT dans le modèle MCF10A (Figure 18B). Ces résultats démontrent, pour la première fois, l'implication directe de l'hétérogénéité de composition protéique du ribosome dans l'induction de l'EMT. De ce fait, l'étude de la composition du ribosome semble apporter un nouveau niveau dans la caractérisation et la compréhension de l'établissement de l'EMT. Ces suggestions sont appuyées par le fait que l'étude de la régulation traductionnelle semble avoir gagné en intérêt au cours des dernières années. Ainsi, l'étude du ribosome, acteur majeur de la traduction, pourrait permettre non seulement de définir de nouveaux marqueurs de l'EMT (*i.e.*, hétérogénéité de composition), mais également de mieux appréhender les mécanismes de régulation traductionnelle déjà décrits (*i.e.*, activité traductionnelle intrinsèque du ribosome).

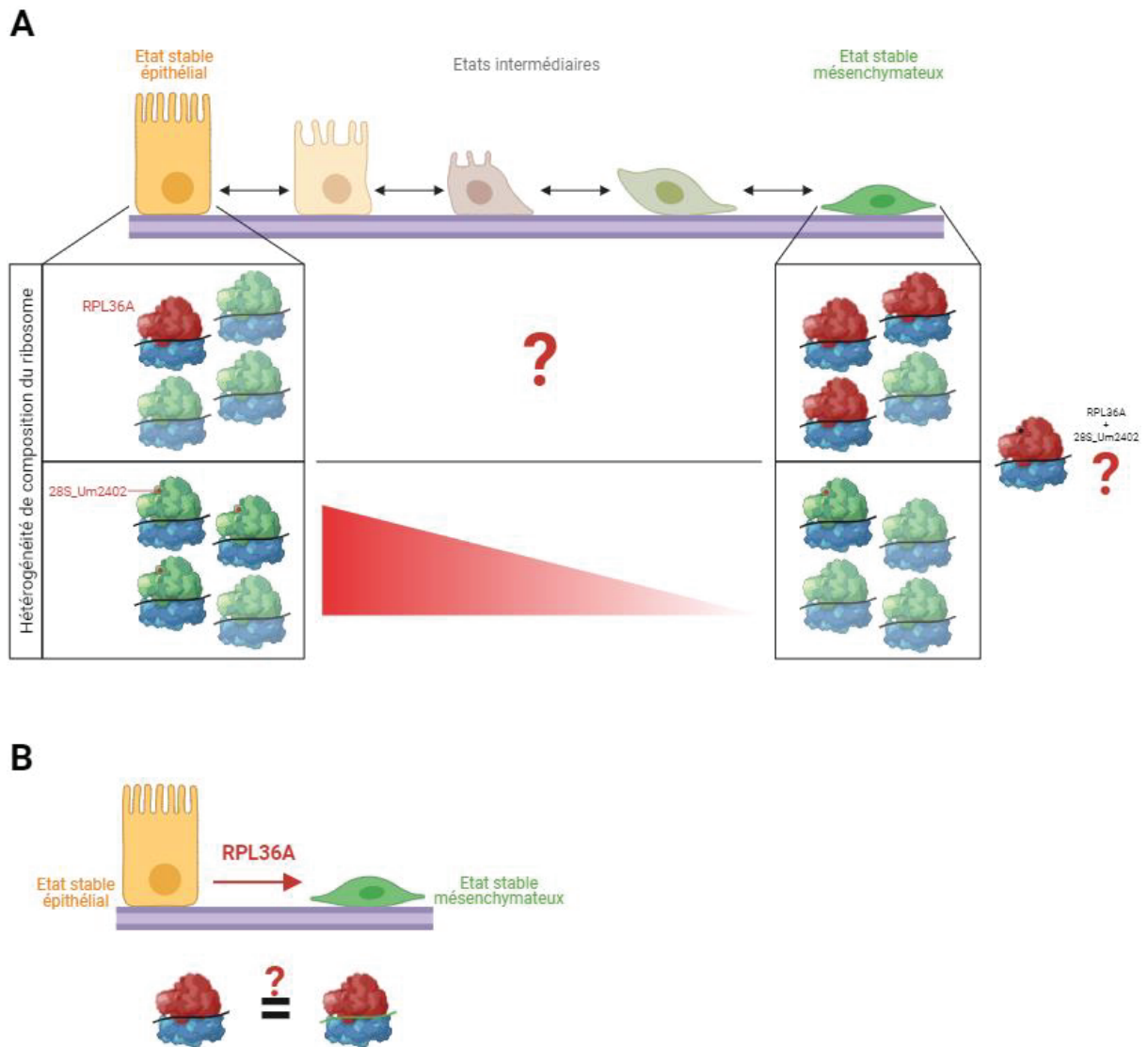


Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'hétérogénéité de composition du ribosome (A) et son rôle (B) au cours de l'EMT.

ANNEXES

I. Liste des publications

1. Revue de la littérature : “snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management”

Cette revue de la littérature dont je suis autrice en 2ème position a été publiée en février 2020 dans le journal Cells. Le manuscrit est inclus à la suite de cette introduction.

a. Contexte

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer, tous sexes confondus. En effet, la survie à 5 ans de cette pathologie est faible, notamment dû au fait que les traitements ne sont pas optimaux et souvent associés à des résistances. Bien que les études génomiques intensives réalisées dans ces cancers aient permis d'identifier des éléments promoteurs de la tumorigenèse bronchique, à l'origine des thérapies ciblées utilisées actuellement en routine, il ressort que de nombreuses tumeurs bronchiques ne présentent pas d'altération(s) génomique(s). De même, l'apparition de résistance aux traitements ne résulte pas systématiquement d'une altération génomique. Ainsi, la découverte de nouveaux mécanismes moléculaires non-génomiques impliqués dans les cancers bronchiques reste indispensable pour la prise en charge des patients. Ces nouveaux mécanismes pourraient reposer, par exemple, sur la régulation traductionnelle et le ribosome lui-même.

De manière intéressante, de nombreuses données existent dans les cancers bronchiques sur les snoARNs régulant les modifications chimiques des ARNr. En effet, bien que les snoARNs soient connus depuis les années 1960, la démonstration de leur implication dans des processus pathologiques, y compris dans les cancers bronchiques, n'est que très récente. Notre revue de la littérature s'attèle à centraliser les données existantes et relever les zones d'ombre persistantes autour des rôles des snoARNs dans la tumorigenèse bronchique afin de donner un état de l'art des connaissances et d'aiguiller sur les possibles futures approches permettant d'utiliser les snoARNs pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'un cancer du poumon.

b. Résultats principaux

Notre revue démontre l'intérêt croissant de la communauté scientifique pour les snoARNs, notamment dans le domaine clinique. D'un point de vue fonctionnel, ces petits ARNs non-codants ont été « redécouverts » récemment. En effet, outre leur abondance et leur rôle canonique dans la biogenèse des ribosomes (modification post-transcriptionnelle des ARNr) déjà connus, de plus en plus d'articles scientifiques font émerger des rôles non-canoniques des snoARNs : activité d'ARNs interférents (miARNs et piARNs) à la suite d'un clivage, clivage et modification d'ARNm, épissage et stabilité des ARNm, etc. De plus, la détection d'une quantité anormale de snoARNs dans certaines pathologies (*e.g.*, syndrome de Prader-Willis, maladies neurodégénératives, etc.) et notamment les cancers, renforce l'objectif croissant visant à utiliser les snoARNs en clinique.

En ce sens, et compte-tenu des défis thérapeutiques liés aux cancers bronchiques, les snoARNs sont actuellement un point central dans le domaine clinique. Plusieurs études transcriptomiques, utilisant différentes méthodes, ont pu mettre en évidence des dérégulations de l'expression de snoARNs dans des tissus de cancers du poumon comparés à des tissus normaux. De plus, quelques études mentionnent la détection de snoARNs dans les fluides biologiques de patients, laissant entrevoir dans les snoARNs de nouveaux biomarqueurs non invasifs très utiles pour le suivi des patients (*e.g.*, salive, sérum, etc.). Enfin, le lien mécanistique entre cancer bronchique et plusieurs snoARNs a été décortiqué dans la littérature. Les analyses moléculaires dans des lignées cellulaires de cancers bronchiques ont ainsi révélé le rôle anti-apoptotique de SNORA80E, SNORD3A et SNORD118, pro-plasticité de SNORD78 et les régulateurs des voies MAPK et KRAS que sont SNORA71A et SNORD50A/B par exemple. Autant de pistes potentielles de compréhension de la biologie des cancers bronchiques et de possibles biomarqueurs et/ou traitements.

En conclusion, cette revue réunit les études ayant démontré le rôle émergent des snoARNs dans la tumorigenèse pulmonaire, autant au niveau moléculaire que clinique, que ce soit *via* leur activité canonique ou non. Il en ressort ainsi la promesse de nouvelles découvertes à venir, primordiales pour l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de tumeur bronchique.

c. Ma contribution

J'ai réalisé la rédaction de la version originale de cette revue. En effet, cette revue, dans sa version primaire, a constitué mon rapport bibliographique de premier stage de Master 2 (août-octobre 2019). Initialement longue d'environ 30 000 caractères en raison des contraintes d'évaluation de ma formation, cette revue a par la suite été étoffée par Nour-El-Houda Mourksi (première autrice) dans le cadre de sa première année de doctorat et soumise au journal *Cells* dans le cadre d'une issue spéciale consacrée aux ARNs non-codants.

d. Manuscrit

Review

snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management

Nour-El-Houda Mourksi ¹, Chloé Morin ¹, Tanguy Fenouil ^{1,2}, Jean-Jacques Diaz ¹ and Virginie Marcel ^{1,*} 

¹ Univ Lyon, University Lyon 1, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, 69373 Lyon CEDEX 08, France; nour.mourksi@gmail.com (N.-E.-H.M.); morinchloe27@gmail.com (C.M.); tanguy.fenouil@chu-lyon.fr (T.F); jeanjacques.diaz@lyon.unicancer.fr (J.-J.D.)

² Hospices Civils de Lyon Institute of Pathology EST, Site Est-Groupement Hospitalier Est, 69677 Bron, France

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

Received: 31 January 2020; Accepted: 24 February 2020; Published: 26 February 2020



Abstract: Small nucleolar RNAs (snoRNAs) are non-coding RNAs localized in the nucleolus, where they participate in the cleavage and chemical modification of ribosomal RNAs. Their biogenesis and molecular functions have been extensively studied since their identification in the 1960s. However, their role in cancer has only recently started to emerge. In lung cancer, efforts to profile snoRNA expression have enabled the definition of snoRNA-related signatures, not only in tissues but also in biological fluids, exposing these small RNAs as potential non-invasive biomarkers. Moreover, snoRNAs appear to be essential actors of lung cancer onset and dissemination. They affect diverse cellular functions, from regulation of the cell proliferation/death balance to promotion of cancer cell plasticity. snoRNAs display both oncogenic and tumor suppressive activities that are pivotal in lung cancer tumorigenesis and progression. Altogether, we review how further insight into snoRNAs may improve our understanding of basic lung cancer biology and the development of innovative diagnostic tools and therapies.

Keywords: snoRNA; lung cancer; ribosome; rRNA chemical modification

1. Introduction

Genome-wide analyses unveiled that approximately 80% of the human genome encodes RNAs, while only 1.5% of those are transcribed into proteins. Hence, a majority of RNAs in the cell correspond to non-coding RNAs (ncRNAs), and most of these, including transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), microRNA (miRNA), long non-coding RNA (lncRNA), piwiRNA (piRNA) or small nucleolar RNA (snoRNA), are involved in translational regulation [1]. miRNAs are the most studied ncRNAs, and their role in cancer has been extensively studied within the last decades [2]. In contrast, although understanding the biogenesis of snoRNAs and their related molecular mechanisms are still dynamic fields of research 60 years after their first description, the studies dedicated to snoRNAs and cancer have only start to emerge. A computational wide-scale study recently performed in 14 types of cancers on 465 detectable snoRNAs, revealed that human cancer tissues tend to aberrantly overexpress snoRNAs compared to normal paired tissues [3]. Although the roles of snoRNAs have been explored in various cancer types, their exact functions remain incompletely described, particularly in lung cancer.

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in women and men worldwide. Tobacco smoking is one of the main risk factors triggering lung tumorigenesis by inducing genomic alterations. Lung cancer diagnosis is an important issue in patient management due to its asymptomatic progression

during the early stages. To date, clinical care not only lacks non-invasive tools in order to efficiently and rapidly detect lung cancer onset before the appearance of aggressive symptoms, but does not provide a radical therapeutic arsenal to achieve complete patient remission [4]. Targeted therapies are often confronted with resistance development [5]. Given this observation, lung cancer patient management remains a major public health issue in many countries.

Regarding these medical issues, ncRNAs and especially snoRNAs may provide innovative tools in this field of research. Indeed, though their initial biochemical characterization in the 1990s [6], their association with cancer onset and progression since early 2010s has raised considerable interest. snoRNAs embody on the one hand an innovative biological vision of the disease and on the other, provide original medical management options. In lung cancer, snoRNA investigations are certainly in their infancy and yet they forebode promising clinical opportunities.

This review aims at providing rationale for the pursuit of snoRNA-centered studies in lung cancer. The first sections will present a brief overview of snoRNA biology and lung cancer. The last sections will highlight the clinical relevance of the use of snoRNAs in lung cancer and address their known biological contributions in the molecular mechanisms underlying lung tumorigenesis.

2. snoRNAs: An Age-Old Class of Non-Coding RNAs Recently Rediscovered

First described in pea embryos in the late 1950s [7], snoRNAs have been the topic of more than 3200 publications, a third of which were published in the last 4 years due to their central role in the emerging field of epitranscriptomics (PubMed timeline tool). Since then, numerous studies have deciphered in great details the molecular biology of snoRNAs, summarized in the following section. Detailed mechanisms related to snoRNA biogenesis and processing have recently been reviewed by Kufel and Grzechnik [8].

2.1. Abundance and Diversity of Human snoRNAs

snoRNAs belong to the ncRNA family and are involved in different cellular processes taking place predominantly within the nucleolus, especially in the processing of rRNAs, messenger RNAs (mRNAs) and other ncRNAs [6,9]. snoRNAs are 60–300 nucleotide long RNAs with complex primary and secondary structures. In 2016, the number of snoRNAs was evaluated at around 600 in humans using both predictions from external databases and de novo predictions [10]. So far, two genomic organizations of snoRNAs have been described, their complexity being correlated with evolution [8,11]. Indeed, this dichotomy in snoRNA biogenesis seems to be correlated with their functions. Around 10% of snoRNAs are transcribed from intergenic regions through dedicated promoters, either as independent or polycistronic genes. These snoRNAs guide cleavage of rRNAs (i.e., SNORA73, SNORD3A (or U3), SNORD14, SNORD22 and SNORD118 (or U8)). This small number of snoRNAs is however vital for cell viability, the lack of rRNA cleavage leading to cell death. In contrast, the remaining 90% of snoRNAs are mainly embedded in spliced introns of host genes, mainly encoding ribosome biogenesis factors or long non-coding RNAs (lncRNAs), and are involved in posttranscriptional chemical modifications of RNAs [11].

There are three main classes of snoRNAs: the small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs), the H/ACA box snoRNAs (SNORA) and the C/D box snoRNAs (SNORD). In this review, we will focus on SNORA and SNORD due to their abundance in cells, with around 180 SNORAs and 395 SNORDs predicted in humans [10]. These snoRNAs are composed of conserved box regions to which proteins bind and of a unique 10–20 nt sequence, which provides a high specificity for each snoRNA. The SNORA family is characterized by the H box (ANANNA) and a trinucleotide ACA box, which induce a “hairpin-hinge-hairpin-tail” secondary structure [12]. In vertebrates, SNORAs are able to interact with four proteins, H/ACA ribonucleoprotein complex subunits 1–3 (NHP2, NOP10 and GAR1) and the dyskerin pseudouridine synthase 1 (DKC1) [13,14] to form a small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP). The SNORD family contains a kink-turn (k-turn) structure and conserved sequence boxes C (RUGAUGA) and D (CUGA) at the 5' and 3' RNA ends, respectively. In vertebrates, this k-turn

structure allows the assembly of the snoRNPs containing nucleolar protein 56 (NOP56), nucleolar protein 58 (NOP58), NHP2-like protein 1 (NHP2L1 or 15.5 Kd) and the rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin (FBL) [13,15]. Most of the SNORDs have C' and D' boxes that provide them with a symmetrical structure, their sequences being similar to C and D boxes [13]. The structure of snoRNPs is essential for the maturation and processing of snoRNAs in the Cajal bodies but also for their nucleolar localization [13]. Indeed, ribonucleoprotein recruitment is crucial for snoRNA stability due to their scaffold activity [16]. It has to be noted that several nomenclatures are currently used to name the snoRNAs. For more clarity, we will use the HUGO Gene Name Nomenclature (HGNC, <https://www.genenames.org>) that takes in account the molecular family H/ACA box (SNORA) or C/D box (SNORD) in snoRNA naming (Supplementary Table S1). The recent RNACentral database gives the correspondence between the different nomenclatures (<https://rnacentral.org>).

2.2. snoRNAs Are More Than Just Major Actors of Ribosome Biogenesis

snoRNAs accumulate in the nucleoli where they are responsible for the maturation and posttranscriptional chemical modifications of rRNAs. The ribosome is composed of four rRNAs, three of which are generated from a polycistronic RNA, a 47S pre-rRNA synthesized by the RNA polymerase I (RNA pol I) that contains the sequences of the 5.8S, 18S and 28S mature rRNAs. The fourth rRNA corresponds to the 5S the transcription of which is driven by the RNA polymerase III (RNA pol III). In the 47S pre-rRNA, the three rRNA sequences are separated by external and internal transcribed spacer sequences (ETS and ITS respectively), which are recognized and cleaved by endo- and exonucleases [17]. SnoRNAs were originally described for their role in the endonucleolytic cleavage of rRNAs, demonstrating their essential role in pre-rRNA cleavage [18]. For instance, some SNORDs, such as SNORD3A (U3), are specialized in the cleavage at sites O1 and A0 in ETS in yeast and vertebrate [9,19].

In parallel to their synthesis and cleavage, the three RNA pol I-derived rRNAs that compose the ribosome (28S, 18S and 5.8S) are post-transcriptionally modified. Altogether, they display over 200 chemical modifications that contribute to optimizing activities of the ribosome: 12 base modifications, 95 pseudo-uridylation and 106 2'-O-ribose methylations [9,15]. The exact position of the two latter chemical modifications is determined thanks to the unique sequence of snoRNAs. snoRNAs hybridize to rRNAs in a sequence-specific manner and act as guides for enzymes, the pseudouridine synthase DKC1 or the 2'-O-methyltransferase FBL, to modify specific rRNA residues. Thus, SNORAs and SNORDs are involved in rRNA pseudo-uridylation [13] and 2'-O-ribose methylation [9], respectively.

Recent studies highlighted new roles for snoRNAs in humans. First, several reports indicate that snoRNAs could themselves be cleaved into smaller functional units such as piRNAs [20] and miRNAs [21], thus acquiring novel molecular functions. Second, additional emerging roles are increasingly attributed to snoRNAs, including regulation of mRNA abundance [22] or alternative splicing [23]. Interestingly, these additional functions might reconcile two important observations. On the one hand, it appears that the number of snoRNAs is much greater than that of chemical modifications reported in rRNAs, and on the other hand, some snoRNAs do not present a specific sequence complementary to any known rRNAs making them "orphan" snoRNAs, with unknown functions in ribosome biogenesis. These observations support the existence of yet undiscovered molecular functions for snoRNAs. Thus, the myriad of snoRNAs may display diverse and unexpected functions in cells, in addition to the processing and modification of rRNAs.

2.3. Clinical Significance of snoRNAs in Human Diseases

snoRNAs are involved in various pathological processes. Historically, the first snoRNA-associated human disease described is the Prader–Willi syndrome (PWS), a rare genetic disease characterized by hypotonia and hyperphagia [24]. PWS patients lack the locus 15q11.2–q13.1 containing the SNRNP Upstream Reading Frame–Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (*SNURF-SNRPN*)

gene, which hosts six SNORDs (SNORD107, SNORD64, SNORD108, SNORD109a, SNORD115 and SNORD116), the deleterious effects being driven by the absence of SNORDs. Additional examples can be given including the role of snoRNA dysregulation in lipotoxic stress or neurodegenerative disease [25]. Hence, alterations of snoRNAs have a broad impact on human diseases reflecting the required roles of snoRNAs in diverse cellular processes.

Alterations in the expression level of snoRNAs have also been associated with cancer. Dysregulation of snoRNA expression has been reported in different types of cancers, from leukemia [26] to carcinoma [27] and even sarcoma [28]. Due to these alterations in snoRNA expression, these small RNAs have been considered as potential biomarkers in cancer for several years. Indeed, a set of eight snoRNAs can be used to predict the survival rate of gastric cancer patients [29]. snoRNAs share biological features with the extensively studied miRNAs, including the fact they are reliable and detectable in biological fluids, and provide accessible markers useful in the clinic [30]. From the mechanistic point of view, it has to be underlined that alteration of a single snoRNA could have deleterious effects. Several reviews detail the role of snoRNAs in diverse types of cancers, including the ones of Mannoor et al.'s or Thorenoor and Slaby's [31,32]. We will focus on the role of snoRNAs in lung tumorigenesis.

3. Lung Cancer: A Long Quest to Overcome a Major Killer

3.1. A Clinical Overview of Lung Cancer

Being the second most diagnosed cancer worldwide with about 2.1 million new cases in 2018 (GLOBOCAN 2018, WHO, <https://gco.iarc.fr>), lung cancer remains a major and global public health issue. Around 90%/80% of lung cancers in men/women are caused by tobacco, while the remaining 10%/20% are presumed to be caused by occupational exposure to tumorigenic molecules or spontaneous genetic mutations [33]. Moreover, lung cancer is a highly aggressive disease with a poor 5-year survival rate of about 19%, representing about 1.8 million cancer-associated deaths in 2018 (ACS 2019; GLOBOCAN 2018, WHO).

This poor survival rate is, at least in part, due to the complexity of lung cancer diagnosis at early stages. Indeed, most of the patients are diagnosed at an advanced stage of the disease rendering treatment options limited [4]. The lung contains fewer sensitive neurons compared to other organs. Thus, the lesions have to be severe for the patient to display symptoms, including breathing difficulties. When lung cancer is suspected, imaging techniques are performed after clinical examination. Radiography of the chest is a simple method to detect thoracic lesions. This examination is always followed by the computerized-tomography scan (CT scan) in order to precisely delineate the suspected mass. Then, bronchoscopy is performed to precise the mass localization and if possible, to harvest cytological and histological samples (i.e., bronchoalveolar washing, bronchial brushing and transbronchial biopsy) in order to confirm the presence of neoplastic cells. In case of both peripheral location of the mass and lack of histological malignancy clues using previous methodologies, a nonsurgical transparietal tissue biopsy can be performed using CT-guided fine needle aspiration (FNA) [34]. Although histological analysis of tissue biopsy is the gold standard and is required in most countries to initiate treatment, tissue biopsy could be unfortunately uninformative for few lung cancer patients. Some studies thus investigated the use of liquid biopsy as source of non-invasive diagnostic measures, although they are more suitable as prognostic or predictive biomarkers. For example it has been reported that tumoral cells could be detected using the sputum [35]. Alternatively, blood-derived liquid biopsy containing circulating cancer cells and released DNA–RNA constitutes a wealthy and accessible source of information on tumors. However, clinical relevance of this modern tool has to be demonstrated [36].

3.2. Histological and Genomic Classification of Lung Cancer

Although deaths associated with lung cancer have been described since the late 19th century, current rates of morbidity and mortality worldwide denote that its management remains difficult for physicians underlining a high tumoral complexity. Lung cancers are classified depending on their histological characteristics. Non-small cell lung cancers (NSCLCs) account for approximately 85% of lung cancers, while the remaining 13% correspond to small-cell lung cancer (SCLC). Among the major groups of NSCLCs, squamous lung carcinomas (lung squamous carcinoma, LUSC, 20% of NSCLCs) are more aggressive than non-squamous lung cancers, which display different molecular backgrounds such as the heterogeneous adenocarcinoma histological subtype (lung adenocarcinoma, LUAD, 63% of NSCLCs) [37]. The histological type is defined based on cell morphology, however when there is a lack of differentiation evidences, immunohistochemistry is performed using adenoma or squamous carcinoma markers: trefoil factor-1 (TTF-1), cytokeratin-7 (CK-7) and napsin-A (ASP4; LUAD); interleukin-9 (IL-9 or p40) and cytokeratin-5/6 (CK-5/6; LUSC) [38,39].

The genomic classification further refines this histological classification at the molecular level, as genomic imbalances are recurrent in lung cancer. Chromosomes impacted by this genomic instability harbor either loss or gain of genes identified as oncogenes in lung cancer [40]. Genome-wide approaches have thus enabled the separation of NSCLCs into different molecular subtypes, based on genomic alterations of driver genes. Genomic alterations mainly correspond to activated mutations on genes encoding kinases, triggering the constitutive activation of signaling pathways to support tumorigenesis and aberrant cancer cell proliferation. Intrinsic mutations on the Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene homolog (*KRAS*) are important alteration that occurs in 25% of lung adenocarcinoma. On other hand, alteration on the Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) gene is found in 15% of lung adenocarcinoma and translocations of the Anaplastic Lymphoma Kinase (*ALK*) gene occur in 3%-7% of lung adenocarcinoma [41]. Other genomic alterations (translocation: ROS proto-oncogene 1 (*ROS1*) and Rearranged during Transfection (*RET*); mutation: B-RAF proto-oncogene (*BRAF*), Mesenchymal Epithelial Transition (*MET*) and Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (*ERBB2*); amplification: *MET*, etc.) also drive lung tumorigenesis but are less frequent [42]. Of note, 40% of lung adenocarcinoma have not yet been associated with particular driver genomic alteration [41]. In this context, the tumor initiation process is unclear, although it likely results from alterations in gene expression.

3.3. Therapies and Limitations

Appropriate therapies are chosen depending on the histological and genomic classification of lung tumors and on the stage of the disease. Like most cancers, early treatment considerably improves the survival rate, surgery remaining the main therapeutic option. The optimal treatment of stages I and II lung cancer is tumor resection. When surgery is impractical, patients are recommended to be treated via radiotherapy and/or chemotherapy [35]. However, chemotherapy results in non-specific tissue targeting, attacking both tumor and healthy tissues. Moreover, chemotherapy-induced side effects are often observed and, for some patients, associated with only a moderate tumor response.

In addition to these therapies, due to the great heterogeneity in lung cancer, personalized medicine is a powerful strategy to limit toxicity and improve patient outcome [43]. The classification based on specific driver mutation subtypes enables clinicians to precisely treat tumor cells through targeted therapies. Targeted therapies are small molecules successfully integrated into lung cancer patient management these past decades that mainly target the mutant tyrosine kinases, and are so called tyrosine kinase inhibitors (TKIs). They are used in first and/or second line treatment in patients displaying advanced tumors at diagnosis. For example, *EGFR* mutant-driven tumors that represent 15% of NSCLCs, can be treated by therapeutic molecules designed to specifically inhibit mutant and overactivated *EGFR* proteins, such as erlotinib, afatinib and gefitinib [41]. Other FDA-approved drugs are routinely used such as crizotinib, ceritinib or alectinib for *ALK* rearranged NSCLC or crizotinib for *ROS1* rearranged NSCLC. Additional drugs are currently under evaluation (*MET*: crizotinib; *RET*: cabozantinib; *NTRK*: entrectinib) [41,44]. However, targeted therapies display some limitations. First,

there is no available drug to specifically target the *KRAS* mutant driven tumors, which represent the most important proportion of NSCLCs, and downstream targets are under evaluation for these particular tumors (selumetinib a MEK1/2 inhibitor). Second, although TKIs have a great efficiency compare to non-targeted therapies, most lung cancer patients undergo progression mainly due to resistance. Several mechanisms have been described to explain TKI resistance, including accumulation of genetic alterations within or outside the targeted tyrosine kinase [41]. Such acquired mutations are thought to arise from a latent reservoir of stem-cell like cells tolerant to the drug [45]. For instance, in 50%–60% of cases, treating an *EGFR*-mutant primary tumor with targeted therapies induces a positive selection of resistant cancer cells within the tumor due to the acquisition of a secondary mutation, T790M in the *EGFR* protein that occurs outside of the ATP binding site [41]. The new generation of TKIs, such as osimertinib, is able to inhibit those resistant *EGFR*-mutant cells but, once again, new mutated cells can be selected.

When no genomic alterations are detected and when at least 50% of tumor cells express the immunosuppressive programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) membrane protein, immune-checkpoint inhibitors (ICI) are used [46]. These correspond to monoclonal antibodies (e.g., pembrolizumab, atezolizumab or nivolumab) that could be proposed in first or second line treatment to reinforce the effects of radio-chemotherapy. At present immunotherapy is moderately introduced in lung cancer patient management because of the need for sufficient PD-L1 expressing cells [46]. However, results of the KEYNOTE 042 clinical trial demonstrated that patients with locally advanced/metastatic lung cancer expressing low PD-L1 (1% tumor proportion score) benefit from first line pembrolizumab treatment [47]. Hence, new mechanisms to understand lung tumorigenesis and relapse remain to be identified to develop innovative therapies to improve lung cancer patient management.

4. Altered Expression of snoRNAs in Lung Cancer

Several pioneer studies investigated the landscape of snoRNAs differentially expressed during lung oncogenesis, the objective being to identify putative snoRNAs, which could be used as diagnostic biomarkers. To achieve this, most studies focused on overexpressed snoRNAs in lung cancer patients versus healthy donors, both in tissues and circulating fluids.

4.1. snoRNA Profiling in Normal and Tumoral Lung Tissues

To our knowledge, Liao et al. [48], in 2010, paved the way for extended snoRNA profiling in lung cancer. Definition of a signature of snoRNAs, the altered expression of which was associated with early stage NSCLC, was achieved through the comparison of the expression level of 352 human mature snoRNAs using a GeneChipR Array. Authors compared snoRNA expression in 22 NSCLC stage I resected tissues (11 LUSC and 11 LUAD) versus paired non-cancerous specimens resected from the same patient at a distance from the tumor. Six snoRNAs (SNORA80E, SNORA73B, SNORD33, SNORD66, SNORD76 and SNORD78) were significantly overexpressed at least 1.5-fold in samples of lung cancer tissue compared to the ones of healthy donors (Table 1). Furthermore, no difference was observed between the expression of these snoRNAs and the two types of NSCLCs, indicating that there was no histological-specific association in this study, which may be due to the small number of samples. Although results were thoroughly validated by RT-qPCR, one has to keep in mind that the Chip array depends on the identification of a selected set of transcripts preventing the analysis of non-included snoRNAs. As a consequence, a Chip array designed to detect 352 correctly annotated snoRNAs oversees around half of the total 600 predicted snoRNAs [10]. To extend this preliminary lung cancer snoRNA profiling, Gao and colleagues [49] proposed to use RNA-seq. This high throughput technology permitted the examination of 458 mature snoRNAs in 12 pairs of normal and tumor lung tissues classified as stage I NSCLC. 29 snoRNAs, including SNORA71A, were significantly overexpressed (by at least 3-fold) in tumor tissues compared to normal biopsies (Table 1).

Since then, snoRNA screening has been preferentially performed by exploiting publicly available RNA-seq datasets, the most commonly used being the ones hosted by The Cancer Genome Atlas

(TCGA) database. Recently, Gong et al. [3] investigated the expression of 465 snoRNAs in pairs of tumoral/normal tissues arising from 31 types of cancers, including two main subtypes of NSCLCs (LUAD $n = 46$ and LUSC $n = 45$; Table 1). In contrast to previous studies, they compared the global alteration of snoRNA expression rather than individual snoRNA variations between normal and tumoral tissues. They found that global change in snoRNAs mainly corresponded to their overexpression in 12 cancers. In LUAD and LUSC, a significant (2.5-fold) increase was observed in tumoral compared to normal tissues, making lung cancer the 4th cancer exhibiting the highest snoRNA overexpression. Meanwhile, analysis of aberrant snoRNAs that distinguished female smokers and non-smokers within normal and cancerous tissues from lung adenocarcinoma, identified 28 snoRNAs the expression of which was significantly altered between normal and tumoral tissues, irrespective of the smoking status, reinforcing the finding that alterations in snoRNA expression occur in lung cancer [50] (Table 1). In parallel, using machine learning algorithms, Pan et al. [51] investigated the expression pattern of more than 1000 snoRNAs in 8 cancers including NSCLC (LUAD $n = 559$ and LUSC $n = 521$). They found a specific signature encompassing only a few snoRNAs compared to other types of cancers both for LUAD (SNORD7, SNORD81 and SNORD99) and LUSC (SNORA31A, SNORA47 and SNORD83B).

However, these results display discrepancies in the NSCLC-snoRNA profile obtained despite the high quality of analyses (Figure 1). Such heterogeneity may be due to sampling and patient population diversities, as well as to different approaches employed to track snoRNA footprints in NSCLC pulmonary tissues (Table 1). It may also reflect the heterogeneity of lung cancer itself. Indeed, a lung tumor mass is composed of stromal cells, endothelial cells, cancerous differentiated lung cells that are highly proliferative and another small subpopulation sharing cancer stem cell (CSC) features: the initiating tumoral cells (TICs) also called drug-tolerant persister cells (DTPs) [52]. TICs are capable of self-renewal and appear to be the main source of tumorigenesis onset in vivo [53,54]. Detection of TICs relies on the presence of the CD antigen 133 (CD133) surface marker of cancer stem cells [55], the expression of the cytoplasmic marker (KDM5A or histone deacetylase (HDAC) [56] or the over-activity of the aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) [57,58]. In 22 NSCLC primary surgical pieces, 22 snoRNAs have been identified as mainly up-regulated between ALDH1⁺ and differentiated ALDH1⁻ cells using microarray analysis (Table 1) [59]. SNORA3 and SNORA80E are the top two highly expressed snoRNAs in TICs compared to differentiated lung cancer cells [59].

Table 1. snoRNA signatures identified in lung cancer patients.

References	Sample Type	Cohort Characteristics	Cancer Sub-Type (N)	Stage (N)	Total snoRNAs Analyzed	Technology	Fold Change Threshold	p-Value Threshold	Number of snoRNAs in Signatures	snoRNA Signature
Liao et al. 2010 [48] F. Jiang lab	Lung Tissues	22 NSCLC patient samples/22 matched normal patient samples	LUSC (11)	Stage I (22)	352	GeneChipR Arrays (Affymetrix)	≥ 1.0-fold change	<i>p</i> < 0.01	31	SNORA18, SNORA21, SNORA80E, SNORA73B, SNORD1C, RNU3P2, SNORD13, SNORD25, SNORD29, SNORD31, SNORD33, SNORD34, SNORD35A, SNORD36C, SNORD38B (1), SNORD44, SNORD49A, SNORD55, SNORD66, SNORD76, SNORD78, SNORD83B, SNORD88A, SNORD88C, SNORD95, SNORD96A, SNORD100, SNORD104, SNORD110, SNORD116-26
			LUAD (11)							
Gao et al. 2015 [49] F. Jiang lab	Lung Tissues	12 NSCLC patient samples/12 matched normal patient samples	LUSC (6)	Stage I (12)	458	Deep sequencing (Illumina® Genome Analyzer Ix)	≥ 2.0-fold change	<i>p</i> ≤ 0.001	68	SNORA12, SNORA14A, SNORA18, SNORA21, SNORA34, SNORA38B, SNORA39, SNORA80E, SNORA47, SNORA57, SNORA64, SNORA66, SNORA68, SNORA70 (2), SNORA71A, SNORA7C, SNORA73B, SNORA75, SNORA78, SNORA80, SNORA80B, SNORD3A, SNORD3B-1, SNORD3B-2, SNORD33, SNORD66, SNORD74 (1), SNORD76, SNORD78, SNORD80, SNORD96A, SNORD113-5, SNORD113-7, SNORD113-8, SNORD114-11, SNORD114-13, SNORD114-20, SNORD114-25, SNORD114-26, SNORD114-28, SNORD115-2, SNORD115-9, SNORD115-10, SNORD115-12, SNORD115-15, SNORD115-17, SNORD115-18, SNORD115-19, SNORD115-23, SNORD115-32, SNORD115-34, SNORD115-38, SNORD115-40, SNORD115-41, SNORD115-42, SNORD116-18, SCARN1, SCARN12, SCARN20 (1), SCARN21, SCARN23
			LUAD (6)							
	Plasma	37 NSCLC patient samples/37 non-cancerous samples (22 healthy donors and 26 COPD)	LUSC (16) LUAD (21)	Stage I (10) Stage II (12) Stage III-IV (15)	6 *	RT-qPCR	NA	<i>p</i> < 0.01	3	

a. snoRNA signatures in normal vs tumors samples

Table 1. Cont.

References	Sample Type	Cohort Characteristics	Cancer Sub-Type (N)	Stage (N)	Total snoRNAs Analyzed	Technology	Fold Change Threshold	p-Value Threshold	Number of snoRNAs in Signatures	snoRNA Signature
Su et al. 2015 [60] F. Jiang lab	Sputum	59 NSCLC patient samples/ 61 cancer-free smoker samples	LUSC (28) LUAD (31)	Stage I (29) Stage II (30)	6 *	RT-qPCR	NA	$p < 0.05$	4	SNORA80E, SNORD33, SNORD66, SNORD78
Gong et al. 2017 [3] L. Han lab	Lung Tissues	91 NSCLC patient samples/91 matched normal patient samples	LUSC (45) LUAD (46)	NA	465	miRNA-seq (TCGA data set)	≥ 2.0 -fold change	$p < 0.05$	46	SNORA21, SNORA56, SNORA71B, SNORA71D, SNORA73A, SNORA73B, SNORA84 (6), SNORD1A, SNORD9, SNORD10, SNORD11, SNORD12B, SNORD12C, snoU13, SNORD13, SNORD14C, SNORD15A, SNORD15B, SNORD16 (6), SNORD18, SNORD18C, SNORD19B, SNORD30, SNORD34, SNORD35A, SNORD35B, SNORD36C, SNORD41, SNORD44, SNORD45C, SNORD46, SNORD58C, SNORD72, SNORD75, SNORD76, SNORD77, SNORD78, SNORD80, SNORD82, SNORD83A, SNORD83B, SNORD88A, SNORD96A, SNORD102, SNORD114-14 (4), SCARNA5
Mannoor et al. 2014 [59] F. Jiang lab	Lung Tissues	ALDH ⁺ cells (TICs) sorted from 22 NSCLC tumor tissues/ALDH ⁻ cells sorted from matched 22 NSCLC tumor tissues	NA	NA	352	GeneChipR Arrays (Affymetrix)	≥ 3.0 -fold change	$p < 0.01$	22	SNORA3, SNORA18, SNORA80E, SNORA61, SNORA62, SNORD1C, SNORD14E, SNORD33, SNORD34, SNORD36C, SNORD38B, SNORD44, SNORD55, SNORD66, SNORD73B, SNORD76, SNORD78, SNORD83B, SNORD88A, SNORD96A, SNORD110, SNORD116-26
Pan et al. 2019 [51] Y-D. Cai lab	Lung Tissues		LUSC (621) LUAD (659)	NA	459	miRNA-seq (TCGA data set and Gong et al. 2019 [3] data)	NA		10 (6)	SNORA31 (ACA31) (6), SNORA47 (HBI-115) (6), SNORD7 (mgU6-47) (4), SNORD81 (U81) (4), SNORD83B (U83B) (3), SNORD99 (HBI-420) (4), SNORD115 (4), SNORD115-32 (HBI-52-32) (4), SNORD123 (6)(6)

* Correspond to the 6 top snoRNAs composing the signature defined in lung tissues by Liao et al., 2010; (1) found twice in the data however with different fold changes; (2) found three times in the data however with different fold changes; (3) specific to LUSC in this signature; (4) specific to LUAD in this signature; (5) complete signature not available; red: overexpressed in lung cancer tissues; green: underexpressed in lung cancer tissues.

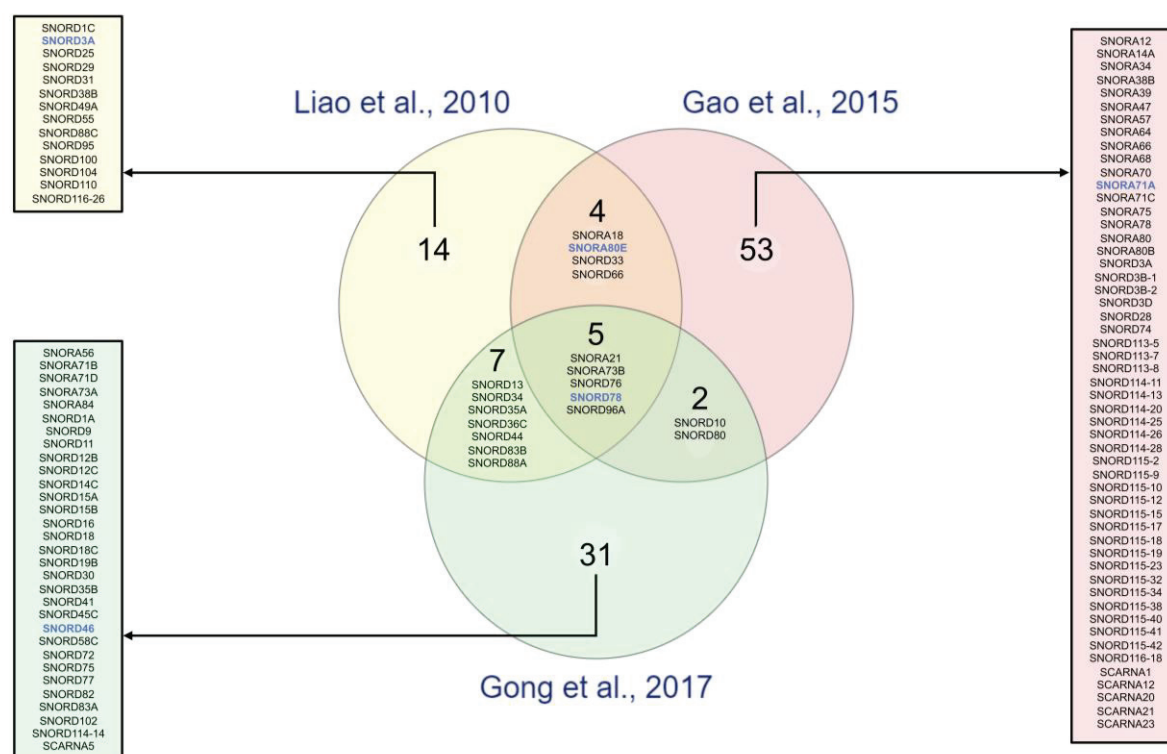


Figure 1. Comparison of snoRNA signatures in primary lung cancer tissues. Three studies identified snoRNAs significantly dysregulated in lung cancer using pairs of cancerous and non-cancerous primary pulmonary tissues at diagnosis using different approaches (yellow, Liao et al., 2010 [48]: microarray; red, Gao et al., 2015 [49]: RNA-seq; and green, Gong et al., 2017 [3]: analysis of public TCGA dataset). The Venn diagram presents the logical relation between the datasets of significantly altered snoRNAs provided by these three studies. Briefly, we uploaded the snoRNA lists provided by each study and identified snoRNAs present either in 1, 2 or 3 datasets using an online visualization tool (<http://www.molbiotools.com/listcompare.html>). Intersections correspond to snoRNAs commonly dysregulated in at least 2 studies, while boxes present snoRNAs identified in a single study. Interestingly, this comparison reveals a set of 5 commonly detected snoRNAs (SNORA21, SNORA73B, SNORD76, SNORD78 and SNORD96A). SnoRNAs, the roles of which have been investigated in lung tumorigenesis, are indicated in blue.

4.2. Circulating snoRNA Profiling in Healthy and Lung Cancer Patients

Extracellular ncRNAs appear to occur through cell death or controlled exocytosis (exosomal RNAs) [61]. Thus, by analogy with prior reports on miRNAs found in blood and sputum in lung cancer [62,63], released circulating snoRNAs were also prospected in biological fluids (blood, plasma, urine and sputum). The presence of snoRNAs within biofluids in cancer was examined for the very first time in NSCLC, lung cancer being a disease for which non-invasive biomarkers are urgently required due to the difficulty in performing tissue biopsies [64]. A proof-of-concept study demonstrated that snoRNAs can be detected in different blood fractions (cells, plasma and pellet/supernatant of plasma) of NSCLC patients using RNA-seq approaches [65].

Liao and al. [48] extended their initial investigation on NSCLC tissues to patient plasma using their primary tumor-related snoRNA signature (SNORA80E, SNORA73B, SNORD33, SNORD66, SNORD76 and SNORD78). Similarly to miRNAs, the panel of these six snoRNAs [48] is resistant to RNase digestion and stable over time in healthy plasma. snoRNAs could thus be routinely and accurately detected using RT-qPCR. Quantification of circulating snoRNAs demonstrated that only three snoRNAs (SNORD33, SNORD76 and SNORD66) out of the 6-snoRNA signature displayed a significantly higher level in the plasma of cancer patients compared to healthy individuals. In addition, combined detection

of these three plasmatic snoRNAs can discriminate NSCLC patients from cancer-free individuals and from chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients with a high sensitivity and specificity, making them strong NSCLC-specific diagnostic candidates. Of note, the analysis of a small cohort (four LUSC samples and three samples from healthy donors) using RNA-seq instead of RT-qPCR, identified seven snoRNAs the level of which was significantly decreased in the plasma of lung cancer patients compared to healthy donors (SNORD2, SNORD38A/B, SNORD58B, SNORD73A, SNORD75 and SNORD81), suggesting that other snoRNAs can improve this plasma-derived snoRNA signature [65].

Moreover using a similar approach, sputum from healthy and NSCLC individuals was also shown to contain stably and reliably measurable snoRNAs [60]. In sputum, exploration of the expression pattern of the 6-snoRNA signature led to the detection of four snoRNAs (SNORA80E, SNORD33, SNORD66 and SNORD78) that significantly discriminated NSCLC patients from cancer-free smokers [60]. As SNORD66 and SNORD78 are commonly overexpressed in lung cancer, examination of their expression level in sputum was carried out and results were combined with examination of miRNA levels that have already been correlated with lung cancer disease. Combination of snoRNA and miRNA detection exhibited stronger sensitivity and specificity than individual ncRNA tests to diagnose lung cancer in sputum [66].

snoRNAs appear to be stable and strong non-invasive biomarkers from a technical point of view. Although these studies focused on the snoRNA signature derived from lung cancer tissues, the correlation of snoRNA levels between tumoral tissues and liquid biopsies derived from the same patients has not yet been investigated. Nevertheless, similarly to tissues, circulating snoRNA levels vary in liquid biopsies of lung cancer patients compared to healthy donors, supporting the alteration of snoRNA expression levels in lung cancer.

4.3. Clinical Significance of Altered snoRNAs in Lung Cancer

The profiling of snoRNAs in lung cancer highlighted a set of snoRNAs that were significantly dysregulated, mostly overexpressed, in cancerous versus normal samples, some snoRNAs being specific to cancers compared to other lung diseases or to particular histological subtypes of lung cancer. Hence, detection of these disease-specific snoRNAs could be used as a diagnostic tool for lung cancer. Based on these encouraging findings, studies have focused on the prognostic value of these snoRNA-derived signatures.

Gong et al. [3] based their approach on a wider panel of snoRNAs to evidence their biomedical significance. The 200 snoRNAs displaying the greatest variability in their expression between cancerous and healthy tissues in different cancers were selected. Their expression level was then used to assign each cancer to several subtypes using Consensus Cluster Plus. Finally, survival associated with each subtype was evaluated. Novel subtypes classified according to snoRNA expression showed distinct prognostic value in LUSC, as well as in three other cancers, suggesting that snoRNA profiling might refine histological classification of lung cancers displaying distinct survival rates.

Having identified a list of 29 highly overexpressed snoRNAs in lung tumor tissues, Gao et al. [49] then aimed at highlighting the association between overall survival of lung cancer patients and snoRNA expression. Individual association of each of the 29 snoRNAs analyzed by RNA-seq with survival was first determined using both univariate and multivariate cox regression analyses in a collection of 77 frozen lung cancer tissues corresponding to different grades of the disease. Among these 29 snoRNAs, only three (SNORA47, SNORA68 and SNORA78) were identified as independent markers of poor prognosis after adjustment on clinical standards (age, gender, race, smoking, stage and histology). Patients harboring lung tumors with high levels of each of these three snoRNAs displayed a poorer overall survival than patients carrying tumors with relatively lower levels. Moreover, based on the combined expression level of these three snoRNAs, a validated risk score was extrapolated to predict outcome of NSCLC patients by assigning them to a high-risk or low-risk group. Additional association between individual snoRNA expression and survival was reported. For instance, in 82 NSCLC samples, RT-qPCR evaluation of SNORA3 and SNORA80E expression levels, up-regulated in TICs, revealed

that individually their highest expression is statistically associated with poor prognosis. Similarly, high levels of SNORA71A [67] or SNORD50A/B [68] in lung cancer tissues are independent predictors of an overall shorter patient survival.

Although histological analysis of tissue biopsy remains the gold standard of cancer diagnosis, non-invasive prognostic and predictive biomarkers are needed in clinic. The current literature supports the use of snoRNAs as diagnostic biomarkers in plasma and sputum that may offer lung cancer biomarkers' innovative candidates. Surprisingly, prognostic and predictive significance of the snoRNAs have never been evaluated neither in sputum nor in blood in lung cancer patients.

5. snoRNA Dysregulation Contributes to Lung Cancer Tumorigenesis

Several studies have shown differences in snoRNA expression between normal and lung cancer cells in humans, as detailed above. However, few studies have investigated the involvement of snoRNAs in lung tumorigenesis and progression. To date, only seven studies explored the contribution of snoRNAs to lung cancer and mainly by determining their role in cellular processes, the molecular mechanism remaining largely understudied. In this section, we reviewed the list of snoRNAs, which have been shown to be involved in lung tumorigenesis.

5.1. SNORA80E Inhibits Apoptosis and Supports Stemness

From the profiling studies, SNORA80E (also termed SNORA42 or ACA42) emerged as a recurrent overexpressed H/ACA box snoRNA in many independent signatures of lung cancer, both in tissue and fluid biopsies (Figure 1) [48,49,59,60]. Moreover, SNORA80E is overexpressed in other cancers, such as colorectal cancer [69]. Chromosomal location of SNORA80E (1q22) in a well-known amplified genomic region in lung cancer [40] argues in favor of a relationship between lung cancer development and SNORA80E overexpression. Two studies from the laboratory of Jiang [59,70] investigated the role of SNORA80E in lung tumorigenesis.

The impact of the modulation of SNORA80E expression on cellular phenotypes in lung cancer cell lines have been elucidated by a gain- and loss-of-function experimental strategy *in vitro* and *in vivo*. SNORA80E knockdown using siRNA in H460 and H1944 NSCLC cell lines abolishes cell proliferation 24 h post-transfection onwards and formation of colonies in soft agar by 80%. These severe effects observed in response to SNORA80E knockdown demonstrate its pivotal role in oncogenesis. Consistently, overexpression of SNORA80E via its transfection using a pCMV-SNORA80E vector in normal bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and in the H1299 NSCLC cell line promotes cell proliferation and soft agar colony formation. Thus, SNORA80E favors cell proliferation in both an anchorage-dependent and -independent manner *in vitro*. In addition to the decreased cell proliferation, the proportion of apoptotic cells in response to siRNA-SNORA80E transfection was increased as well as the cleavage of caspase-3 and poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1), suggesting that SNORA80E promotes cell proliferation by inhibiting apoptosis. *In vivo*, SNORA80E knockdown inhibits tumorigenicity. Nude mice transplanted with H1944 NSCLC cells inoculated with siRNA-SNORA80E do not develop tumors, neither ectopically nor orthotopically after a latency of 14 or 28 days, respectively, in contrast to mice engrafted with cells transfected with the control siRNA. These data support a role for SNORA80E in promoting cell proliferation, both *in vitro* and *in vivo*, and in tumorigenesis likely by inhibiting apoptosis.

Mei and colleagues reported that the SNORA80E knockdown is associated with an accumulation of the cellular tumor antigen p53 protein in a set of NSCLC cell lines (H460, H1944 and H292). Accordingly, SNORA80E overexpression is associated with decreased p53 protein levels. Moreover, increased expression of p53 in mice xenografts was negatively correlated with SNORA80E levels, as reported by immunohistochemistry. Interestingly, apoptosis in p53-null (H299) or mutant p53 (A549) NSCLC cell lines was not affected by SNORA80E ectopic overexpression, suggesting that SNORA80E promotes cell proliferation through inhibition of apoptosis in a p53-dependent manner (Figure 2).

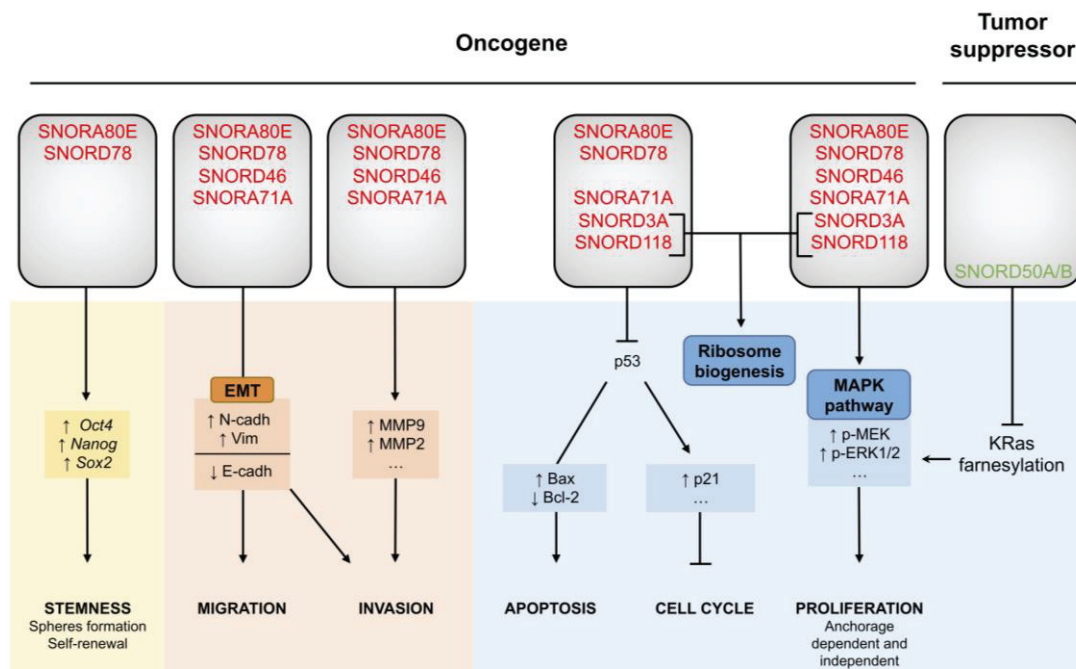


Figure 2. Biological functions of snoRNAs in lung cancer. snoRNAs act either as oncogenes or tumor suppressors. Experimental dysregulation of these snoRNAs affects different cellular processes (bottom panel), such as cell mobility, stemness and cell viability, by modulating different signaling pathways (middle panel). Altogether, this diagram summarizing the snoRNAs-related cellular functions reported in lung cancer, supports their key role in lung tumorigenesis and progression. snoRNAs overexpressed in lung cancer tissues compared to non-cancerous tissues are highlighted in red, underexpressed in green.

Furthermore, it has been reported that SNORA80E is overexpressed by 2.5-fold in CD133⁺ TICs compared to CD133⁻ differentiated cells [59]. Downregulation of SNORA80E in H1944- and Calu-1-derived CD133⁺ cells reduces by 50% the expression of cancer stem cell-associated genes, namely POU domain class 5 transcription factor 1 (*POU5F1* or *Oct4*), nanog homeobox (*Nanog*), SRY-box transcription factor 2 (*Sox2*), neurogenic locus notch homolog 1 (*otch1*), smoothed frizzled class receptor (*Smo*) and ATP binding cassette subfamily G member 2 (*ABCG2*). Consistently, TICs transfected with the siRNA targeting SNORA80E have a reduced self-renewal capacity as observed by sphere formation and proliferation as observed by soft agar assay. After 72 h in culture, proliferation is abolished, highlighting the need for SNORA80E for cell proliferation. Therefore, SNORA80E overexpression contributes to TIC establishment and maintenance in NSCLC, certainly by regulating apoptosis. Indeed, the concomitant increase in apoptotic cells detected by cleaved caspase-3 was observed in TIC populations treated with SNORA80E-siRNA. Such findings were confirmed in vivo. Mice transfected with CD133⁺ NSCLC cells harboring the siRNA-SNORA80E are unable to develop tumors compared to control mice, underlining the pivotal function of SNORA80E in cancer stem cell properties, thus contributing to NSCLC malignancies [59].

These data demonstrate that SNORA80E acts as an oncogene. Not only is SNORA80E overexpressed in lung cancer but it also promotes cell proliferation, at least in part by inhibiting p53-induced apoptosis, and TIC formation, thereby stimulating lung tumorigenesis and aggressiveness (Figure 2). Although SNORA80E upregulation has shed light onto its role as an oncogene in prostate [71] and colorectal cancer [69], the molecular mechanisms by which SNORA80E contributes to cancer initiation and/or progression remain unclear.

5.2. SNORD78 Triggers Cancer Cell Plasticity

A study from Chen's lab investigated the role of SNORD78 in lung tumorigenesis [72]. Indeed, following snoRNA profiling, SNORD78 (or U78) was considered to be an interesting snoRNA in lung cancer, as it is significantly overexpressed both in lung cancer cells and lung TICs (Table 1, Figure 1) [48,59]. Chen and colleagues first reported that SNORD78 expression level is an independent marker of poor prognosis in lung cancer. In 56 NSCLC patients, the ones harboring lung tumors expressing high levels of SNORD78 displayed a poorer overall survival than patients with lung tumors expressing low SNORD78 levels [72]. This observation supports a role for SNORD78 in lung tumorigenesis and/or progression.

Second, they showed that SNORD78 knockdown induced by the shRNA lentivirus approach in the H1975 NSCLC cell line, reduces proliferation. It was associated with an increased proportion of cells in G0/G1 and an increased protein level of the cyclin-dependent kinase inhibitors 1 (p21) and 2A (p16), two markers of G0/G1 arrest. In addition to inducing cell cycle arrest, reduction of SNORD78 expression enhanced a proportion of apoptotic cells, pro/anti-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 cleavage. Thus, SNORD78 knockdown reduces cell proliferation by inducing cell cycle arrest and apoptosis. As expected, stable overexpression of SNORD78 in A549 NSCLC cells stimulates cell division. In vivo, nude mice engrafted with H1975 NSCLC cells expressing reduced levels of SNORD78 developed tumors although smaller than the ones developed by mice engrafted with scrambled shRNA infected cells. These data support the involvement of SNORD78 in lung tumorigenesis and aggressiveness.

Transwell assays showed that SNORD78 also plays a role in the induction of NSCLC invasion. Cell motility could be acquired along an epithelial to mesenchymal transition (EMT), characterized by an enrichment in CSCs [73]. Chen's study reported that the reduction of SNORD78 expression in the H1975 NSCLC line leads to increased expression of the epithelial marker cadherin-1 (E-cadherin) paralleled with a reduced expression of the mesenchymal markers Vimentin and cadherin-2 (N-cadherin). Moreover, they showed that SNORD78 was overexpressed especially in CD133⁺ CSC-like cells isolated from the A549 cancer cell line [72], as it has been suggested in snoRNA signatures (Table 1) [59]. In vitro, stable silencing of SNORD78 via shRNA, resulted in fewer and smaller spheres, and in a decreased expression of a set of key stem transcription factors, including *Sox2*, *POU5F1*, *Nanog* and *Kruppel like factor 4 (Klf4)*. Interestingly, in patients, SNORD78 in combination with another biomarker, specifically predicted the appearance of lymph node metastasis. Thus, SNORD78 promotes EMT and maintenance of the stemness state of lung cancer cells to favor invasion and metastasis (Figure 2). SNORD78 might contribute to lung cancer progression through the formation of metastases that may sustain the poor survival of lung cancer patients with tumors expressing high levels of SNORD78.

Like SNORA80E, SNORD78 appears to act as an oncogene, which promotes cell proliferation by limiting apoptosis and CSC maintenance. However, the exact molecular mechanisms triggered by SNORD78 to regulate these biological functions remain to be explored. Interestingly, the individual role of SNORD78 in lung cancer is supported by the opposite effect of its host Growth Arrest Specific 5 (*GAS5*) gene. Indeed, like most snoRNAs, SNORD78 is located in an intronic region of the *GAS5* gene. It has been shown that the lncRNA *GAS5* plays a tumor suppressor activity in lung cancer by sponging miRNAs with oncogenic properties [74]. Remarkably, lung cancers treated with *GAS5*-siRNA showed an expected reduction in *GAS5* expression, independent of SNORD78 levels that remain unchanged. The dual effects of SNORD78 and lncRNA *GAS5* coded by the same gene reinforce the role of SNORD78 on its own in lung tumorigenesis and progression.

5.3. SNORA71A: A Regulator of MAPK Signaling

To improve our understanding of the relationship between snoRNA overexpression and lung cancer, Tang et al. [67] focused on SNORA71A (U71a) located in an intron of the lncRNA SNHG17, and screened for cellular consequences of its dysregulation in NSCLC.

The relatively high level of endogenous expression of SNORA71A in A549 and PC9 lung cancer cell lines favored their use as cellular models for such investigations in vitro. The knockdown of

SNORA71A in these two cell lines using an siRNA strategy induces a G0/G1 arrest, as shown by flow cytometric analyses and increases the expression of the inhibitor of G0/G1 checkpoint p27, the cyclin-dependent kinase inhibitor 1B. Moreover, SNORA71A inhibition is associated with a loss in Vimentin and a gain in E-cadherin expression, suggesting induction of EMT in both cell lines (Figure 2). In parallel, scratch wound healing assays revealed alterations of migratory and invasive properties of A549 and PC9 cells transfected with siRNA-SNORA71A. These observations support the importance of SNORA71A in the maintenance of tumorigenic characteristics of lung tumors, including cell cycle progression, EMT and migration/invasion, like SNORA80E and SNORD78.

Remarkably, *in vivo*, xenografted mice derived from stable A549 cells with SNORA71A knockdown display a drastic reduction in tumor growth from 350 to 50 mm³ compared to mice xenografted with normal A549 cells, that corresponds to an 85% reduction in tumor volume. Lung cancer tumorigenicity seems to be greatly compromised or even impossible in the absence of SNORA71A. Besides, using an available dataset from a cohort of 91 lung tumor samples [75], high levels of SNORA71A were associated with poor overall survival of lung cancer patients [67]. These data argue in favor of a role for SNORA71A in lung cancer.

Interestingly, the authors identified a disruption in the MAPK pathway in response to SNORA71A knockdown in A549 and PC9 cells. They showed a reduction in the phosphorylation of the dual specific mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK) and the mitogen-activated protein kinase 1 and 2 (ERK1/2), three kinases of the oncogenic proliferative MAPK-ERK pathway (Figure 2). It has to be noted that no rescue experiment was performed to demonstrate the involvement of MAPK pathway in the cellular processes affected by SNORA71A depletion, and that the molecular mechanisms from nucleolar snoRNA dysregulation to cytoplasmic MAPK pathway extinction have not been investigated. Nevertheless, the involvement of SNORA71A in the regulation of MAPK signaling pathway offer novel opportunities to understand lung cancer biology, especially since the MAPK pathway is genetically altered in only 1% of NSCLC but is a well-known oncogenic signaling pathway in many types of cancers.

5.4. SNORD50A/B, Inhibitors of the Normal KRas Pathway

Most studies dedicated to investigating the contribution of snoRNAs to lung cancer were designed to identify snoRNAs the expression of which was stimulated in human lung tumors versus healthy lung samples. Such a historical approach is based on the primary objective of these pioneering studies to identify snoRNAs suitable to be used as biomarkers, a clinical test being more sensitive if there is an increased rather than a decreased expression. However, such approaches preclude the discovery of snoRNAs displaying tumor suppressive activities. Siperashvili et al. [68] took an opposite stance by conducting a large-scale study to investigate whether snoRNA genes exhibiting frequent deletion could contribute to lung cancer tumorigenesis and/or progression.

Using TCGA database, 5,473 pairs of tumoral/normal samples encompassing 21 types of cancers, which include two subtypes of lung cancer (297 LUAD and 278 LUSC), were analyzed to identify copy number alterations (CNAs) in genomic regions encoding snoRNAs. *In silico* analysis revealed that the somatic loss of SNORD50A (U50) and SNORD50B (U50B) genes is a common feature in different types of cancers (12 out of 21), indicating their involvement in oncogenesis. In lung cancer, SNORD50A/B are lost in 10% of lung squamous cell carcinoma and up to 30% in lung adenocarcinoma, LUAC being one of the cancers exhibiting the highest SNORD50A/B deletion frequency. These Pan-Cancer data suggest a strong correlation between SNORD50A/B and lung tumorigenesis. In agreement with observations in patients, nude mice xenografted with either A459 or NSCLC NCI-H23 lung cancer cell lines deleted in SNORD50A/B using the CRISPR method, developed larger tumors than mice injected with non-depleted cells.

As snoRNAs are known to interact with proteins, in particular within snoRNP complexes, Siperashvili et al. identified molecular interactions between SNORD50A/B and cancer-related proteins to elucidate the molecular mechanisms by which SNORD50A/B deletion promotes lung tumorigenesis. Using a small RNA-protein interaction microarray (SR-PMA) containing 9,125 recombinant proteins,

high-throughput screening of proteins interacting with SNORD50A and/or SNORD50B was performed. In addition to the known molecular functions of snoRNAs in rRNA processing, SNORD50A/B are also able to interact directly with proteins that are not involved in nucleolar snoRNP complexes, such as with the GTPase KRas protein. A cross-linking and immuno-precipitation (CLIP) assay validated the interaction between recombinant KRas and SNORD50A/B and revealed an interaction between SNORD50A/B and other Ras isoforms, although to a lesser extent. Further electromobility assays also validated this unexpected binding. Diffuse residues in KRas protein and a specific 7-nt long region of the box C of the two snoRNAs contribute to the stable SNORD50A/B: KRas interaction that occurs in the cytoplasm.

In a set of four cell lines (primary keratinocytes, CHL-1 melanoma cells, Cal27 head and neck squamous cell carcinoma cells and ME180 cervical carcinoma) harboring a functional Ras-Raf-MAPK pathway, reduction of SNORD50A/B expression by specific Antisense Oligonucleotides (ASOs) triggers ERK1/2 and MAPK activation and reduces cell proliferation *in vitro*. Furthermore, total abolition of SNORD50A/B expression using the CRISPR technology in CHL-1 melanoma (wild-type KRas) and two A549 and NCI-H23 lung cancer cell lines (mutant KRas) also resulted in an increase in ERK1/2 phosphorylation and in cell proliferation. SNORD50A/B overexpression in both wild-type and mutant KRas cells led to a decrease in ERK1/2 phosphorylation and limited cell growth and proliferation. Hence, SNORD50A/B acts as a negative regulator of the KRas pathway irrespective of its mutational status, and affects tumorigenic capacities of cancer cells, including lung cancer cells (Figure 2). Interestingly, the specific interaction between SNORD50A/B and KRas induces the inhibition of interaction between KRas and the farnesyltransferase (FTase), which usually leads to the activation of the KRas protein through farnesylation and prenylation. The current model suggests that when SNORD50A/B is depleted, FTase then binds to KRas, leading to its activation and downstream signaling pathway that could provide support for the ERK1/2 phosphorylation observed in cell lines lacking SNORD50A/B. Thus, SNORD50A/B act as tumor suppressors probably by preventing KRas activation.

Based on these data, it appears that the depletion of SNORD50A/B often found in patient tumor samples is a key step for lung tumor initiation by activating the oncogenic KRas pathway, the genomic alterations of which represent about 25% of lung adenocarcinomas [42]. SNORD50A/B is the only example so far of a snoRNA with suppressive activity in lung cancer. Moreover, those data illustrate the possibility for snoRNAs to interact directly with cytoplasmic proteins in addition to nucleolar proteins involved in snoRNPs. The physical binding of a snoRNA with an unexpected protein has already been observed. SNORD46, a C/D box snoRNA, is overexpressed in many cancers [3]. Its inhibition using antisense locked nucleic acid (LNA) Gapmer technology in the NSCLC A549 cell line resulted in decreased cell viability, migration and invasion, suggesting a function for SNORD46 in these cellular mechanisms. In addition, like SNORD50A/B, SNORD46 interacts with oncoproteins. Experimental identification of proteins interacting with a synthesized SNORD46 through RNA-pull down and mass spectrometry analysis (MS), demonstrated an interaction with the pappalysin-1 (PAPP1) protein, a secreted metalloprotease, probably unveiling unknown functions of snoRNAs in non-canonical localization.

5.5. SNORD3A and SNORD118: From Ribosome Biogenesis to Tumorigenesis

Since a majority of the studies investigating the contribution of snoRNA dysregulation in lung tumorigenesis did not decipher the direct snoRNA-related molecular mechanism but rather provided an associative evidence between snoRNA dysregulation and cancer cell behavior, Langhendries et al. [19] from D. Lafontaine's lab attempted to address this concern by focusing on the primary role of snoRNAs in pre-rRNA processing during tumorigenesis.

SNORD3A (U3) and SNORD118 (U8) belong to the small fraction of C/D box snoRNAs participating in the cleavage of the 47S pre-rRNA into the three main rRNA species (5.8S, 18S and 28S) prior to their assembly into ribosomal proteins in eukaryotic species. Dysregulation in the expression levels of these two snoRNAs has never been steadily detected in lung cancer. However, since inhibition of

SNORD3A and SNORD118 impedes mammary tumorigenesis [27], Langhendries et al. investigated their individual role in tumorigenesis using two cellular models, namely human lung (H1944) and breast (MCF-7) cancers. Only data related to lung cancer are presented herein.

In response to reduced SNORD3A or SNORD118 levels, p53 and p21 proteins accumulate (up to 25-fold after 24 h) as evidenced by Western blot, a regulation dependent on the presence of the ribosomal proteins RPL5 and RPL11. It is associated first with a G1 blockade, around 80% of NSCLC H1944 cells being arrested only after 24 h of ASO treatment, and second with an increased proportion of apoptotic cells associated with progressive dislocation of the nucleolus. Thus, reduction of SNORD3A or SNORD118 levels promotes a p53 suppressive response in a ribosomal protein-dependent manner. Such response has been extensively studied and corresponds to a classical response termed ribosomal stress (or nucleolar stress), where defects in ribosome biogenesis, including defects in pre-rRNA cleavage, induce cell cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner through disruption of the interaction between p53 and the human double minute 2 (Hdm2) protein by ribosomal proteins (for review see [76,77]).

Furthermore, SNORD3A and SNORD118-depleted H1944 lung cancer cells lose their ability to form colonies in vitro using soft agar assay. While reduction of SNORD3A levels diminished colony formation by 75%, the effect of SNORD118 knockdown is even stronger since it completely prevents colony growth. Injection of cells previously treated with SNORD3A or SNORD118 ASO inhibitor in nude mice corroborate these results. Among the 12 mice engrafted with SNORD118-depleted H1944 cells, no tumor was visible using either necked eye or PET (positron emission tomography) two months after engraftment, although the scramble treated H1944 cells led to the formation of visible and palpable tumors. The other set of 12 mice transplanted with H1944 lung cancer cells expressing reduced SNORD3A levels in response to ASO treatment, developed tumors 24 days after transplant though these were 500-fold smaller than control tumors.

Polysome analysis of H1944 cells treated with specific ASO targeting either SNORD3A or SNORD118, revealed a reduction in 40S (i.e., small ribosome subunit) and 60S (i.e., large ribosome subunit) peaks, respectively. As a consequence, a reduction in polysomes (i.e., mRNAs bound by ribosomes) is observed, indicative of a reduction in ribosome production however in a different extent. Indeed, some polysomes are still visible in response to SNORD3A knockdown, while they are largely absent in response to SNORD118 depletion. Such a difference may be due to the fact that knockdown expression of these snoRNAs alters different steps of the pre-rRNA cleavage as shown by Northern blot assays (SNORD3A: 5'-ETS and ITS1 leading to 18 rRNA; SNORD118: ITS2 and 3'-ETS involved in 28S rRNA), thus driving the accumulation of inappropriate rRNA intermediates. Hence, SNORD3A and SNORD118 do have key functions in maintaining human ribosome biogenesis in cancer cells.

Altogether, it appears that SNORD118 is more tumorigenic than SNORD3A. The difference observed in their individual impact on ribosome biogenesis might explained such a difference in tumorigenic activity, the 60S defects associated with SNORD118 depletion may have more impact on tumorigenesis than the 40S defects associated with SNORD3A although it remains to determine by which mechanism. Nevertheless, both SNORD3A and SNORD118 directly contribute to lung tumorigenesis by promoting ribosome production necessary to maintain cell growth and the high proliferative rate of cancer cells.

6. The Future of snoRNAs in the Field of Lung Cancer

The involvement of snoRNAs in lung cancer tumorigenesis is paving the way for novel studies investigating the pathophysiology of lung cancer. Indeed, it appears that studying genomic alteration is no longer sufficient to understand both lung tumorigenesis and progression. Moreover, it emerges. It only starts to emerge that alteration in gene expression might mediate resistance to targeted therapies [41]. In parallel, the demonstration that snoRNA expression varies in lung cancer tissues challenges the former dogma, according to which snoRNAs were considered to be effectors of housekeeping functions in ribosome biogenesis [6]. SnoRNAs are mostly overexpressed in lung cancer

tissues compared to non-cancerous samples, while only a few of them are downregulated in lung tumors (Table 1). Mechanistic examination of such dysregulation in lung cancer cells argues in favor of oncogenic activities for most snoRNAs.

Overexpressed snoRNAs act as oncogenes activating different survival pathways such as MAPK or KRas, likely through inhibition of p53-mediated apoptosis. Experimental inhibition of some individual snoRNAs abolished lung tumorigenesis *in vitro* and *in vivo*. Knowing the emerging role of cancer stem cells in lung tumorigenesis and progression, both by promoting metastases and resistance to targeted therapies, the importance of snoRNAs in promoting and maintaining self-renewal properties in lung cancer illustrates the major role of snoRNAs in lung cancer malignancies. To date, a single study accumulates evidence regarding the tumor suppressive role of snoRNAs, attributed to *SNORD50A* and *SNORD50B*, which are deleted in lung tumors [68]. However, it is expected that many more snoRNAs may have tumor suppressive effects.

Research in this field is unquestionably at its infancy and requires further insight. Preliminary data relied on promising findings that need to be completed, in particular regarding the molecular mechanisms by which snoRNAs contribute to lung cancer tumorigenesis and progression. The notion that expression of snoRNAs can be altered in cancer, thus questioning their housekeeping functions, has to be paralleled with the emerging field of epitranscriptomics [15,78,79]. Indeed, the canonical role of snoRNAs in catalyzing rRNA chemical modifications (i.e., 2'-*O*-ribose methylation and pseudo-uridylation) has not yet been explored, although it appears that rRNA chemical modifications play a key role in regulating translation [15]. Indeed, alterations of rRNA 2'-*O*-ribose methylation directly affect translation of some mRNAs, which contain particular cis-regulator elements in their 5' UTR (i.e., Internal Ribosome Entry Sites or IRES), such as the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (*IGF1R*) or Myc proto-oncogene (*MYC*), in breast cancer and leukemia [80–82]. However, the relationship between ribosome biogenesis and lung cancer is supported not only by the role of the *SNORD3A*- and *SNORD118*-induced 47S pre-rRNA cleavage in lung cancer proliferation, but also by the recent demonstration that rRNA synthesis is required to drive *KRAS-TP53* lung tumorigenesis [83]. One could speculate that malignancy mediated by snoRNAs in lung cancer is driven by the fine-tuning of ribosomes. However, it appears that snoRNAs might exert yet undescribed non-canonical functions outside of the nucleus, since some studies demonstrated snoRNA binding to extra-nuclear proteins and reported the role of some “orphan” snoRNAs in mRNA metabolism [3,68].

Studying snoRNAs in lung cancer may pave the way for innovative clinical applications, both as biomarkers and therapeutic targets. snoRNAs have singular intrinsic biochemical features, ideal as a source of non-invasive lung cancer biomarkers. Indeed, snoRNAs are released through exosomal vesicles or after cell death in circulating fluids such as sputum [60] or plasma [48], where they are stably and readily detected in a non-invasive manner. Precise identification of snoRNA signatures during the course of the disease may provide major indications of the subtype and the stage of the disease, but also predict relapse [3]. Discovering novel signatures will rely on RNA-seq approaches, although nomenclature issues inherent to both diverse snoRNA annotations and snoRNA identity based on a unique 10–20 nt sequence, have still to be addressed. From the therapeutic point of view, it could be hypothesized that snoRNAs can be efficient targets to reduce lung tumor growth, as it has been observed in *in vitro* and *in vivo* experiments. The transfer of experimental findings on the inhibition of snoRNAs to novel clinical therapeutic approaches may be highly promising. RNA therapies began in the 1990s, the first US Food and Drug Administration (FDA) approved RNA-based therapy using antisense oligonucleotide to cure cytomegalovirus retinitis having been released in 1998 (Nature outlook, RNA therapies 2019). MicroRNA themselves can be used as efficient drugs as demonstrated by several clinical trials, including in lung cancer (NCT02369198) [84]. Moreover, tools could be designed to repress snoRNAs in a specific manner, including antisense oligonucleotides or miRNAs [84,85].

7. Conclusions

The literature dedicated to snoRNAs in lung cancer, although limited today, highlights the biological and clinical outcomes that may arise from studying snoRNAs. In particular, confronted with the limitations presented by current therapies used in lung cancer management and the associated elevated morbidity in lung cancer patient populations, snoRNAs may become pivotal elements to improve our understanding of lung cancer and relevant multimodal tools to improve cancer patient management from their diagnosis to their treatment.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/541/s1>, Table S1: snoRNA nomenclature.

Author Contributions: N.-E.-H.M. wrote the first draft of the review and figures/table; C.M. contributed to the first draft of the review; T.F. corrected the clinical section; J.-J.D. gave critical advice to reach the final version of the manuscript; V.M. supervised draft writing and contributed to figures/table. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ITMO Cancer (RESIST, 18CN044-00), SIRIC LYriCAN (INCa-DGOS-Inserm_12563) and INCa (MARACAS, PLBIO 2019-138). N.-E.-H.M. was a recipient of doctoral fellowship from the French National Ligue Contre le Cancer. J.-J.D. and V.M. are members of the Inserm.

Acknowledgments: We thank Brigitte Manship for English editing. We apologize to authors whose works have not been cited in this review.

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

References

- Palazzo, A.F.; Lee, E.S. Non-coding RNA: What is functional and what is junk? *Front. Genet.* **2015**, *6*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Peng, Y.; Croce, C.M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Tar.* **2016**, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gong, J.; Li, Y.; Liu, C.-J.; Guo, A.-Y.; Lin, C.; Correspondence, H. A Pan-cancer Analysis of the Expression and Clinical Relevance of Small Nucleolar RNAs in Human Cancer. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 1968–1981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Knight, S.B.; Crosbie, P.A.; Balata, H.; Chudziak, J.; Hussell, T.; Dive, C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol.* **2017**, *7*.
- Neel, D.S.; Bivona, T.G. Resistance is futile: Overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma. *npj Precis. Oncol.* **2017**, *1*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maxwell, E.; Fournier, M. The Small Nucleolar RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 897–934. [[CrossRef](#)]
- Stern, H.; Johnston, F.; Setterfield, G. Some chemical properties of isolated pea nucleoli. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1959**, *6*, 57–60. [[CrossRef](#)]
- Kufel, J.; Grzechnik, P. Small Nucleolar RNAs Tell a Different Tale. *Trends Genet.* **2019**, *35*, 104–117. [[CrossRef](#)]
- Lafontaine, D.L.J. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 11–19. [[CrossRef](#)]
- Jorjani, H.; Kehr, S.; Jedlinski, D.J.; Gumienny, R.; Hertel, J.; Stadler, P.F.; Zavolan, M.; Gruber, A.R. An updated human snoRNAome. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 5068–5082. [[CrossRef](#)]
- Dieci, G.; Preti, M.; Montanini, B. Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility. *Genomics* **2009**, *94*, 83–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Balakin, A.G.; Smith, L. The RNA World of the Nucleolus: Two Major Families of Small RNAs Defined by Different Box Elements with Related Functions. *Cell* **1996**, *86*, 823–834. [[CrossRef](#)]
- Bertrand, E.; Fournier, M.J. The snoRNPs and Related Machines: Ancient Devices That Mediate Maturation of rRNA and Other RNAs. In *Madame Curie Bioscience Database*; Olson, M.O.J., Ed.; Landes Bioscience: Austin, TX, USA, 2011; pp. 223–258.
- Massenet, S.; Bertrand, E.; Verheggen, C. Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 680–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lo Monaco, P.; Marcel, V.; Diaz, J.J.; Catez, F. 2'-O-methylation of ribosomal RNA: Towards an epitranscriptomic control of translation? *Biomolecules* **2018**, *8*, 106. [[CrossRef](#)]

16. Tollervey, D.; Kiss, T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 337–342. [[CrossRef](#)]
17. Therizols, G.; Laforêts, F.; Marcel, V.; Catez, F.; Bouvet, P.; Diaz, J.J. Ribosomal RNA Methylation and Cancer. In *Epigenetic Cancer Therapy*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 115–139. ISBN 9780128002247.
18. Kass, S.; Tyc, K.; Steitz, J.A.; Sollner-Webb, B. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* **1990**, *60*, 897–908. [[CrossRef](#)]
19. Langhendries, J.-L.; Nicolas, E.; Doumont, G.; Goldman, S.; Lafontaine, D.L.J. The human box C/D snoRNAs U3 and U8 are required for pre-rRNA processing and tumorigenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 59519–59534. [[CrossRef](#)]
20. Zhong, F.; Zhou, N.; Wu, K.; Guo, Y.; Tan, W.; Zhang, H.; Zhang, X.; Geng, G.; Pan, T.; Luo, H.; et al. A SnoRNA-derived piRNA interacts with human interleukin-4 pre-mRNA and induces its decay in nuclear exosomes. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 10474–10491. [[CrossRef](#)]
21. Ender, C.; Krek, A.; Friedländer, M.R.; Beitzinger, M.; Weinmann, L.; Chen, W.; Pfeffer, S.; Rajewsky, N.; Meister, G. A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 519–528. [[CrossRef](#)]
22. Huang, C.; Shi, J.; Guo, Y.; Huang, W.; Huang, S.; Ming, S.; Wu, X.; Zhang, R.; Ding, J.; Zhao, W.; et al. A snoRNA modulates mRNA 3' end processing and regulates the expression of a subset of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 8647–8660. [[CrossRef](#)]
23. Falaleeva, M.; Pages, A.; Matuszek, Z.; Hidmi, S.; Agranat-Tamir, L.; Korotkov, K.; Nevo, Y.; Eyraş, E.; Sperling, R.; Stamm, S. Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E1625–E1634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sahoo, T.; Del Gaudio, D.; German, J.R.; Shinawi, M.; Peters, S.U.; Person, R.E.; Garnica, A.; Cheung, S.W.; Beaudet, A.L. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 719–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Falaleeva, M.; Welden, J.R.; Duncan, M.J.; Stamm, S. C/D-box snoRNAs form methylating and non-methylating ribonucleoprotein complexes: Old dogs show new tricks. *BioEssays* **2017**, *39*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhou, F.; Liu, Y.; Rohde, C.; Pauli, C.; Gerloff, D.; Köhn, M.; Misiak, D.; Bäumer, N.; Cui, C.; Göllner, S.; et al. AML1-ETO requires enhanced C/D box snoRNA/RNP formation to induce self-renewal and leukaemia. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 844–855. [[CrossRef](#)]
27. Su, H.; Xu, T.; Ganapathy, S.; Shadfan, M.; Long, M.; Huang, T.H.M.; Thompson, I.; Yuan, Z.M. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 1348–1358. [[CrossRef](#)]
28. Davanian, H.; Balasiddaiah, A.; Heymann, R.; Sundström, M.; Redenström, P.; Silfverberg, M.; Brodin, D.; Sällberg, M.; Lindskog, S.; Kruger Weiner, C.; et al. Ameloblastoma RNA profiling uncovers a distinct non-coding RNA signature. *Oncotarget* **2017**, *8*, 4530–4542. [[CrossRef](#)]
29. Wang, X.; Xu, M.; Yan, Y.; Kuang, Y.; Li, P.; Zheng, W.; Liu, H.; Jia, B. Identification of Eight Small Nucleolar RNAs as Survival Biomarkers and Their Clinical Significance in Gastric Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 788–794. [[CrossRef](#)]
30. Scott, M.S.; Ono, M. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* **2011**, *93*, 1987–1992. [[CrossRef](#)]
31. Mannoor, K.; Liao, J.; Jiang, F. Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochim. Biophys.* **2012**, *1826*, 121–128. [[CrossRef](#)]
32. Thorenor, N.; Slaby, O. Small nucleolar RNAs functioning and potential roles in cancer. *Tumor Biol.* **2014**, *36*, 41–53. [[CrossRef](#)]
33. Lung Cancer Prevention (PDQ®) - Patient Version. Available online: <https://www.cancer.gov/types/lung/patient/lung-prevention-pdq#section/all> (accessed on 13 February 2020).
34. Barta, J.A.; Henschke, C.I.; Flores, R.M.; Yip, R.; Yankelevitz, D.F.; Powell, C.A. Lung Cancer Diagnosis by Fine Needle Aspiration Is Associated With Reduction in Resection of Nonmalignant Lung Nodules. *Ann. Thorac. Surg.* **2017**, *103*, 1795–1801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rivera, M.P.; Mehta, A.C.; Wahidi, M.M. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **2013**, *143*, e142S–e165S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mlika, M.; Hofman, P.; Dziri, C.; Mezni, F. Liquid biopsy in lung cancer. *Tunis. Med.* **2017**, *95*, 965–971. [[PubMed](#)]

37. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Nicholson, A.G.; Yatabe, Y.M.; Austin, J.H.; Beth Beasley, M.; Chirieac, L.R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D.B.; et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1243–1260. [[CrossRef](#)]
38. Gurda, G.T.; Zhang, L.; Wang, Y.; Chen, L.; Geddes, S.; Cho, W.C.; Askin, F.; Gabrielson, E.; Li, Q.K. Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: A retrospective study of 246 fine needle aspiration cases. *Clin. Transl. Med.* **2015**, *4*, 16. [[CrossRef](#)]
39. Kashima, J.; Kitadai, R.; Okuma, Y. Molecular and morphological profiling of lung cancer: A foundation for “next-generation” pathologists and oncologists. *Cancers* **2019**, *11*, 599. [[CrossRef](#)]
40. Balsara, B.R.; Testa, J.R. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* **2002**, *21*, 6877–6883. [[CrossRef](#)]
41. Lin, J.J.; Shaw, A.T. Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 350–364. [[CrossRef](#)]
42. Shames, D.S.; Wistuba, I.I. The evolving genomic classification of lung cancer. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 121–133. [[CrossRef](#)]
43. Schallenberg, S.; Merkelbach-Bruse, S.; Buettner, R. Lung cancer as a paradigm for precision oncology in solid tumours. *Virchows Arch.* **2017**, *471*, 221–233. [[CrossRef](#)]
44. Gallant, J.N.; Lovly, C.M. Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer. *J. Pathol.* **2018**, *244*, 565–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hata, A.N.; Niederst, M.J.; Archibald, H.L.; Gomez-Caraballo, M.; Siddiqui, F.M.; Mulvey, H.E.; Maruvka, Y.E.; Ji, F.; Bhang, H.E.C.; Radhakrishna, V.K.; et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 262–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Doroshow, D.B.; Sanmamed, M.F.; Hastings, K.; Politi, K.; Rimm, D.L.; Chen, L.; Melero, I.; Schalper, K.A.; Herbst, R.S. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Facts and hopes. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 4592–4602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Mok, T.S.K.; Wu, Y.L.; Kudaba, I.; Kowalski, D.M.; Cho, B.C.; Turna, H.Z.; Castro, G.; Srimuninnimit, V.; Laktionov, K.K.; Bondarenko, I.; et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): A randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* **2019**, *393*, 1819–1830. [[CrossRef](#)]
48. Liao, J.; Yu, L.; Mei, Y.; Guarnera, M.; Shen, J.; Li, R.; Liu, Z.; Jiang, F. Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2010**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Gao, L.; Ma, J.; Mannoor, K.; Guarnera, M.A.; Shetty, A.; Zhan, M.; Xing, L.; Stass, S.A.; Jiang, F. Genome-wide small nucleolar RNA expression analysis of lung cancer by next-generation deep sequencing. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E623–E629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Nogueira Jorge, N.A.; Wajnberg, G.; Ferreira, C.G.; De Sa Carvalho, B.; Passetti, F. snoRNA and piRNA expression levels modified by tobacco use in women with lung adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)]
51. Pan, X.; Chen, L.; Feng, K.-Y.; Hu, X.-H.; Zhang, Y.-H.; Kong, X.-Y.; Huang, T.; Cai, Y.-D. Analysis of Expression Pattern of snoRNAs in Different Cancer Types with Machine Learning Algorithms. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2185. [[CrossRef](#)]
52. Templeton, A.K.; Miyamoto, S.; Babu, A.; Munshi, A.; Ramesh, R. Cancer stem cells: Progress and challenges in lung cancer. *Stem Cell Investig.* **2014**, *1*.
53. Vallette, F.; Olivier, C.; Lezot, F.; Oliver, L. Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: Four synonyms for the same target in cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *162*, 169–176. [[CrossRef](#)]
54. Dawson, C.C.; Intapa, C.; Jabra-Rizk, M.A. “Persisters”: Survival at the cellular level. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Eramo, A.; Lotti, F.; Sette, G.; Piloizzi, E.; Biffoni, M.; Di Virgilio, A.; Conticello, C.; Ruco, L.; Peschle, C.; De Maria, R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 504–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sharma, S.V.; Lee, D.Y.; Li, B.; Quinlan, M.P.; Takahashi, F.; Maheswaran, S.; McDermott, U.; Azizian, N.; Zou, L.; Fischbach, M.A.; et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* **2010**, *141*, 69–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Raha, D.; Wilson, T.R.; Peng, J.; Peterson, D.; Yue, P.; Evangelista, M.; Wilson, C.; Merchant, M.; Settleman, J. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3579–3590. [[CrossRef](#)]
58. Feng, J.; Qi, Q.; Khanna, A.; Todd, N.W.; Deepak, J.; Lingxiao, X.; Huijun, W.; Zhenqiu, L.; Yun, S.; Stass, S.A.; et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-Associated marker in lung cancer. *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7*, 330–338.
59. Mannoor, K.; Shen, J.; Liao, J.; Liu, Z.; Jiang, F. Small nucleolar RNA signatures of lung tumor-initiating cells. *Mol. Cancer* **2014**, *13*. [[CrossRef](#)]
60. Su, J.; Liao, J.; Gao, L.; Shen, J.; Guarnera, M.A.; Zhan, M.; Fang, H.B.; Stass, S.A.; Jiang, F. Analysis of small nucleolar RNAs in sputum for lung cancer diagnosis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 5131–5142. [[CrossRef](#)]
61. Sadik, N.; Cruz, L.; Gurtner, A.; Rodosthenous, R.S.; Dusoswa, S.A.; Ziegler, O.; Van Solinge, T.S.; Wei, Z.; Salvador-Garicano, A.M.; Gyorgy, B.; et al. Extracellular RNAs: A new awareness of old perspectives. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1740*, 1–15.
62. Shen, J.; Todd, N.W.; Zhang, H.; Yu, L.; Lingxiao, X.; Mei, Y.; Guarnera, M.; Liao, J.; Chou, A.; Lu, C.L.; et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab. Investig.* **2011**, *91*, 579–587. [[CrossRef](#)]
63. Xie, Y.; Todd, N.W.; Liu, Z.; Zhan, M.; Fang, H.B.; Peng, H.; Alattar, M.; Deepak, J.; Stass, S.A.; Jiang, F. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2010**, *67*, 170–176. [[CrossRef](#)]
64. Pardini, B.; Sabo, A.A.; Birolo, G.; Calin, G.A. Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Cancers* **2019**, *11*, 1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Savelyeva, A.V.; Kuligina, E.V.; Bariakin, D.N.; Kozlov, V.V.; Ryabchikova, E.I.; Richter, V.A.; Semenov, D.V. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 7404912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Su, Y.; Guarnera, M.A.; Fang, H.B.; Jiang, F. Small non-coding RNA biomarkers in sputum for lung cancer diagnosis. *Mol. Cancer* **2016**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tang, G.; Zeng, Z.; Sun, W.; Li, S.; You, C.; Tang, F.; Peng, S.; Ma, S.; Luo, Y.; Xu, J.; et al. Small nucleolar RNA 71A promotes lung cancer cell proliferation, migration and invasion via MAPK/ERK pathway. *J. Cancer* **2019**, *10*, 2261–2275. [[CrossRef](#)]
68. Siprashvili, Z.; Webster, D.E.; Johnston, D.; Shenoy, R.M.; Ungewickell, A.J.; Bhaduri, A.; Flockhart, R.; Zarnegar, B.J.; Che, Y.; Meschi, F.; et al. The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 53–58. [[CrossRef](#)]
69. Okugawa, Y.; Toiyama, Y.; Toden, S.; Mitoma, H.; Nagasaka, T.; Tanaka, K.; Inoue, Y.; Kusunoki, M.; Boland, C.R.; Goel, A. Clinical significance of SNORA42 as an oncogene and a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Gut* **2017**, *66*, 107–117. [[CrossRef](#)]
70. Mei, Y.P.; Liao, J.P.; Shen, J.; Yu, L.; Liu, B.L.; Liu, L.; Li, R.Y.; Ji, L.; Dorsey, S.G.; Jiang, Z.R.; et al. Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* **2012**, *31*, 2794–2804. [[CrossRef](#)]
71. Yi, C.; Wan, X.; Zhang, Y.; Fu, F.; Zhao, C.; Qin, R.; Wu, H.; Li, Y.; Huang, Y. SNORA42 enhances prostate cancer cell viability, migration and EMT and is correlated with prostate cancer poor prognosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *102*, 138–150. [[CrossRef](#)]
72. Zheng, D.; Zhang, J.; Ni, J.; Luo, J.; Wang, J.; Tang, L.; Zhang, L.; Wang, L.; Xu, J.; Su, B.; et al. Small nucleolar RNA 78 promotes the tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*. [[CrossRef](#)]
73. Sahai, E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 87–96. [[CrossRef](#)]
74. Ma, C.; Shi, X.; Zhu, Q.; Li, Q.; Liu, Y.; Yao, Y.; Song, Y. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5): A pivotal tumor suppressor long noncoding RNA in human cancers. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 1437–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Hou, J.; Aerts, J.; Den Hamer, B.; Van IJcken, W.; Den Bakker, M.; Riegman, P.; Van der Leest, C.; Van der Spek, P.; Foekens, J.A.; Hoogsteden, H.C.; et al. Gene Expression-Based Classification of Non-Small Cell Lung Carcinomas and Survival Prediction. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Penzo, M.; Montanaro, L.; Treré, D.; Derenzini, M. The Ribosome Biogenesis—Cancer Connection. *Cells* **2019**, *8*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

77. Hein, N.; Hannan, K.M.; George, A.J.; Sanij, E.; Hannan, R.D. The nucleolus: An emerging target for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 643–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Marcel, V.; Catez, F.; Diaz, J.J. Ribosome heterogeneity in tumorigenesis: The rRNA point of view. *Mol. Cell. Oncol.* **2015**, *2*. [[CrossRef](#)]
79. Jantsch, M.F.; Quattrone, A.; O'Connell, M.; Helm, M.; Frye, M.; Macias-Gonzales, M.; Ohman, M.; Ameres, S.; Willems, L.; Fuks, F.; et al. Positioning Europe for the EPITRANSCRIPTOMICS challenge. *RNA Biol.* **2018**, *15*, 829–831. [[CrossRef](#)]
80. Eroles, 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 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12934–12939. [[CrossRef](#)]
81. 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](#)]
82. Gachet, S.; El-Chaar, T.; Avran, D.; Genesca, E.; Catez, F.; Quentin, S.; Delord, M.; Thérizols, G.; Briot, D.; Meunier, G.; et al. Deletion 6q Drives T-cell Leukemia Progression by Ribosome Modulation. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1614–1631. [[CrossRef](#)]
83. 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](#)]
84. Hanna, J.; Hossain, G.S.; Kocerha, J. The potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Front. Genet.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Christopher, A.; Kaur, R.; Kaur, G.; Kaur, A.; Gupta, V.; Bansal, P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect. Clin. Res.* **2016**, *7*, 68. [[PubMed](#)]



© 2020 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/>).

2. Article : “Box C/D small nucleolar RNA-induced ribosomal RNA 2’Ome contributes to tyrosine kinase resistance in lung cancer”

Cet article scientifique dont je suis autrice en 4^{ème} position est actuellement en cours de préparation. Le manuscrit est inclus à la suite de cette introduction.

a. Contexte

Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) est l’un des cancers les plus meurtriers de notre époque. Aujourd’hui, on estime le pourcentage de survie à 5 ans à 40% pour les stades I et II de la maladie, et 5% pour les stades III et IV. Cette forte mortalité s’explique par le dépistage tardif de cette pathologie souvent asymptomatique et par l’apparition de résistance aux traitements. Les traitements disponibles pour le CBNPC sont variés et reposent essentiellement sur les thérapies ciblées qui permettent l’inhibition spécifique d’oncogènes impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, ces traitements sont capables de cibler spécifiquement les récepteurs à tyrosine-kinases mutés dans les cellules cancéreuses et qui drivent la tumorigenèse pulmonaire. Par exemple, les altérations génétiques « fusion EML4-ALK », provenant de la fusion de deux gènes codant des récepteurs à tyrosine-kinase EML4 et ALK, sont relativement rares (5% des cas de cancers CBNPC). Dans ce cas, les patients sont traités avec le crizotinib, un inhibiteur de ALK. Cependant, plus de 80% des patients traités développent une résistance dans les 9 premiers mois de traitement. Indépendamment de la nature de l’altération génétique, l’apparition de résistances aux thérapies ciblées peut être due à l’apparition d’une mutation génétique secondaire ou à l’activation d’une autre voie de prolifération cellulaire. Dans 40% des cas, le mécanisme de résistance reste inexplicé par un mécanisme génomique. Il émerge actuellement que des mécanismes non-génomique pourraient participer à la résistance aux inhibiteurs de récepteurs à tyrosine-kinases.

Notre article s’intéresse au rôle de la régulation traductionnelle, et donc du ribosome, dans la résistance aux inhibiteurs d’ALK dans les CBNPC.

b. Résultats principaux

Cette étude a été menée sur des lignées cellulaires de CBNPC possédant une fusion EML4-ALK (H3122), l’une parentale sensible au crizotinib (H3122-S) et la seconde résistante

au crizotinib (H3122-CR). En comparant les ARNm en cours de traduction (polysomes) entre les H3122-S et les H3122-CR, nous avons montré que plus de 800 gènes sont régulés traductionnellement entre cellules sensibles et résistantes au crizotinib. De ce fait, notre intérêt s'est porté sur la composition du ribosome comme acteur central de la régulation traductionnelle. Nous avons ainsi montré qu'il existe une altération du pattern de 2'O-ribose méthylation (2'Ome) dans les cellules résistantes au crizotinib par rapport aux cellules sensibles, et que cette altération de 2'Ome au site 28S_Cm1327 est médiée par une diminution de l'expression du snoARN guidant cette méthylation (*SNORD104*) dans les cellules H3122-CR.

L'inhibition de l'expression de *SNORD104* par traitement Antisens LNA GapmeR dans les cellules sensibles a montré une augmentation de leur résistance au traitement au crizotinib. Ce résultat a également été confirmé par la génération de lignées CRISPR/Cas9 hétérozygotes pour l'expression de *SNORD104*. Ces résultats ont pu être corrélée avec l'inhibition de l'expression l'ARNm pro-apoptotique *BAX* dans les cellules déficientes en *SNORD104*. D'un point de vue traductionnel, l'inhibition de *SNORD104* dans les lignées sensibles au crizotinib induit l'augmentation de la traduction IRES-dépendante.

L'étude de l'expression basale de *SNORD104* dans d'autres contextes de résistance aux thérapies ciblées montre une tendance à l'augmentation dans des modèles de fusion EML4-ALK résistants au cévétinib et à l'alectinib, ainsi que dans un modèle de mutation du récepteur EGFR résistants à l'erlotinib. Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude semblent spécifiques du modèle CBNPC possédant une fusion EML4-ALK et résistants au crizotinib.

c. Ma contribution

Pour cet article, j'ai participé à la mise au point des traitements Antisens LNA GapmeR pour inhiber l'expression et l'activité de *SNORD104*, ainsi qu'à l'analyse de l'expression de *SNORD104* par RT-qPCR en réponse au crizotinib ou au traitement Antisens LNA GapmeR. Ces travaux constituaient mon sujet de stage volontaire de 3^{ème} année de Licence (avril-juillet 2018) et avaient été présentés sous forme d'un rapport et d'une présentation orale.

d. Manuscrit (en préparation)

Box C/D small nucleolar RNA-induced ribosomal RNA 2’Ome contributes to tyrosine kinase resistance in lung cancer

Nour-El-Houda Mourksi¹, Caroline Isaac¹, Julie Ripoll², Chloé Morin¹, Hermes Paraqindes¹, Camille Jouines¹, Julie Radermecker¹, Mariam Jafaar¹, Thomas Boyer¹, Déborah Monchiet¹, Laury Baillon¹, Fleur Bourdelais¹, Frédéric Catez¹, Sébastien Durand¹, Céline Mandier², Virginie Marchand³, Youri Motorin⁴, Rita Khoueir⁵, Christine Lovly⁶, Pierre Saintigny¹, Eric Rivals², Sandra Ortiz-Cuaran¹, Jean-Jacques Diaz¹, Virginie Marcel^{1,*}

Affiliations

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, CEDEX 08, F-69373 Lyon, France

² LIRMM, MAB, UMR 5506, Univ. Montpellier, CNRS, France

³ Université de Lorraine, UAR2008 IBSLor CNRS-UL-INSERM, Biopôle UL, 9, Avenue de La Forêt de Haye, 54505, Vandoeuvre-Les-Nancy, France

⁴ Université de Lorraine, UMR7365 IMoPA CNRS-UL, Biopôle UL, 9, Avenue de La Forêt de Haye, 54505, Vandoeuvre-Les-Nancy, France

⁵ Epigenomics and Mechanisms Branch, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France

⁶ Vanderbilt-Ingram Cancer Center, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232, USA

* Corresponding author: virginie.marcel@lyon.unicancer.fr

Keywords

Lung adenocarcinoma, resistance, ALK-EML4, tyrosine kinase, translation, polysome profiling

Running title

Translation in LUAD resistant cells

Abstract

While ribosome has been considered for 40 years as a neutral actor of gene expression, it recently emerged that ribosomal RNA (rRNA) activity is finely regulated by chemical modifications. Remarkably, these rRNA modifications are mediated by another family of non-coding RNAs, the small nucleolar RNAs (snoRNAs) that guide enzymes at specific rRNA sites. Here, we reported that lung adenocarcinoma (LUAD) cells resistant to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) display alteration in both their translational program and their snoRNAs and rRNA 2’Ome profiles. In particular a concomitant decrease in SNORD104 and 2’Ome at its associated 28S_Cm1327 rRNA site has been detected in cells resistant to a panel of ALK inhibitors and of the EGFR inhibitor, Osimertinib. In addition, we showed that the dynamic SNORD104-induced abolition of 2’Ome at 28S_Cm1327 has no effect on translation or cell viability in basal condition, while it affects translation and promotes resistance to Crizotinib. Interestingly, SNORD104 overexpression restores Crizotinib sensitivity. Overall, our data demonstrate that a single rRNA 2’Ome site plays a key role in cell adaptation in response to stress. More importantly, they support a role of snoRNA-altered rRNA 2’Ome in resistance to TKIs in LUAD, but also the importance of translation, as a novel non-genomic mechanism in drug resistance in LUAD.

1 Introduction

2 Lung cancer is the first cause of cancer death, lung adenocarcinoma (LUAD) being the most
3 frequent subtypes (*GloboCan*, gco.iarc.fr). Since more than 60% of LUAD are driven by
4 genomic alterations in tyrosine kinases (*e.g.*, *EGFR*, *ALK*), the main anti-cancer therapeutic
5 approach used in clinical routine consists in specifically targeting these oncogenic drivers using
6 tyrosine kinase inhibitors (TKIs)¹. Although TKIs contributed in increasing patient survival, lung
7 cancer remains an aggressive disease with a mean 5-years overall survival of only 14% mainly
8 due to drug resistance². For instance, *ALK*-translocations have been reported in 7% of LUAD
9 and are targeted by Crizotinib in the first line setting, which shows strong efficacy, while all
10 patients ultimately relapse within the first year of treatment³. The only therapeutic option
11 available at present to overcome treatment resistance is the early detection of secondary
12 actionable genomic alterations, constituting numerous, successive lines of treatment for a
13 single patient. However, only 40% of resistance cases can be explained by genomic alteration.

14 It recently appeared that non-genomic mechanisms can also drive drug resistance, including
15 translational control^{4,5}. For instance, translational reprogramming has been shown to promote 5-
16 FU chemoresistance in colorectal cancer^{6,7}. Translational control is also crucial to the survival
17 of cancer cells to TKIs, in particular in melanoma⁵. Increased translation of *HIF1a* mRNA
18 through a codon-specific mechanism indeed promotes resistance to BRAF inhibitor of
19 melanoma cells⁸.

20 Among the regulators of translation, ribosome emerge as an innovative one⁹. Indeed,
21 ribosomes exhibit different compositions that are hypothesized to regulate the translation of
22 specific mRNAs. In addition to ribosomal proteins, variation in ribosome composition also relies
23 on chemical modifications of the ribosomal RNAs (rRNAs), including 112 2’-O-ribose
24 methylations (2’Ome)^{9,10}. It has been reported that rRNA 2’Ome reflects the inter-tumoral
25 heterogeneity in solid and haematological cancers, and affects translation of some specific
26 mRNAs, through IRES (Internal Ribosome Entry Sites)- or elongation rate-dependent
27 mechanisms for example^{11–16}. The precise positions of rRNA 2’Ome are determined by C/D
28 boxes small nucleolar RNAs (snoRNAs), or SNORD, that hybridize rRNA in a sequence-
29 specific manner^{10,17,18}. Notably, some snoRNAs have been directly involved in lung
30 tumorigenesis and in cancer resistance, such as SNORD3A, which induces doxorubicin-
31 resistance in osteosarcoma^{17,19}. However, whether these snoRNAs contribute in tumorigenesis
32 and resistance by modulating rRNA chemical modifications remains to be deciphered.

33 To date, the translational landscape of TKIs-resistant LUAD has never been yet deciphered,
34 nor the associated changes in ribosome composition. Here, we used genome-wide

35 approaches to depict the translational landscape and determine the role of snoRNA-induced
36 alteration of rRNA 2’Ome in TKIs-resistant LUAD.

37 **Results**

38 **Translational reprogramming contributes to acquisition of biological processes in** 39 **Crizotinib-resistant LUAD**

40 To depict the translational landscape of TKIs-resistant LUAD, we analyzed the change in
41 translation occurring in a pair of LUAD H3122 cell lines displaying *ALK-EML4* translocation
42 that exhibit either sensitivity (H3122-S) or resistance to Crizotinib, an ALK inhibitor (H3122-
43 CR) (Figure 1A)³.

44 Alteration in global protein synthesis was first investigated using puromycylation assay
45 (Supplementary Figures S2A-B). Compared to H3122-S, H3122-CR exhibit a significant 30%
46 decrease in puromycylation incorporation, indicating that LUAD Crizotinib-resistant cells have
47 a lower global protein synthesis rate than sensitive ones. Since a strong correlation exists
48 between the rate of protein synthesis and ribosome biogenesis, we quantified the levels of
49 ribosomal RNAs (rRNAs) (Supplementary Figures S2C-D). No difference was observed in 18S
50 nor 28S rRNA levels between H3122-S and -CR, suggesting that decrease in protein synthesis
51 does not result from a decrease in ribosome biogenesis. Interestingly, H3122-CR display a
52 significant decrease in their levels of polysomes (*i.e.*, actively translated mRNAs) compared to
53 H3122-S, supporting the notion that Crizotinib-resistant cells show lower protein synthesis
54 compared to sensitive ones (Figures 1A-B, Supplementary Figure S2E-G).

55 To determine whether specific mRNA translation is also altered, mRNAs purified from
56 cytoplasm and polysomes were sequenced and subsequently referred as to RNA-seq (*i.e.*,
57 mRNA steady-state level) and POLY-seq (*i.e.*, actively translated mRNA level), respectively
58 (Figures 1A-D). Robustness of log₂ fold-change (FC) values between H3122-CR and -S cells,
59 obtained for RNA-seq and POLY-seq, were validated on 77 randomly chosen genes ($p <$
60 0.0001 and $r^2 = 0.8$) (Supplementary Figures S2H-I). Then, comparison of log₂(FC) in RNA-
61 seq and POLY-seq allows identifying three categories of mRNAs, depending on their
62 regulatory events (Figures 1C-D). Most of the significantly deregulated mRNAs ($n=2,976$)
63 display a concomitant change in both steady-state and polysome-associated mRNA levels
64 (“BOTH”). Among them, 5 out of the 20 most significantly down-regulated genes in H3122-CR
65 compared to H3122-S previously identified by beads-arrays, were also found in our dataset,
66 validating our observation (*PHLDA1*, *ODC1*, *STMN3*, *ITGB5* and *HMGAI1*)³. This concomitant
67 decrease in cytoplasmic and polysomal-associated mRNAs has been already described as the

68 translational buffering, where change in mRNA steady-state levels mechanically affect the
69 ones of mRNA translation²⁰.

70 Two additional categories of mRNAs were identified that correspond to mRNAs regulated at
71 translational level however with different mechanisms (Figures 1C-D). First, 567 mRNAs are
72 significantly deregulated at steady-state levels without any change in their polysome-
73 associated levels (“RNA”). They correspond to mRNAs, whose protein synthesis is maintained
74 to a normal translation rate even in response to any change in their steady-state levels.
75 Conversely, 748 mRNAs are significantly deregulated at polysome-associated levels without
76 any change in their steady-state levels (“POLY”) (Figures 1C-E). Thus, Crizotinib-resistant
77 LUAD cells display not only a distinct transcriptome but also a distinct translational landscape.

78 Gene ontology (GO) analyses were then performed to determine the biological processes
79 associated with these mRNAs regulated at different levels (Figures 1F-G, Supplementary
80 Figures S2). Among the top 15 enriched biological processes, most of the GO terms were
81 similar between the three categories (*i.e.*, BOTH, RNA and POLY), and whatever the fact
82 mRNAs are up- or down-regulated. As already described in transcriptomic or proteomic
83 analyses, an enrichment in genes involved in cell signaling, cell movement and immunity were
84 observed^{21,22}. In addition, genes involved in nitrogen and heterocycle metabolism were
85 enriched in H3122-CR compared to H3122-S, a biological process directly dependent upon
86 the metabolism of Crizotinib, which is a nitrogen-containing heterocycle compound^{23,24}. These
87 data indicate that Crizotinib-resistance relies on distinct acquired phenotypes, which result
88 from regulation in gene expression at multiple layers.

89 Altogether, although a global decrease in protein synthesis is observed in Crizotinib-resistant
90 LUAD cells, not only translation of some mRNAs is maintained or increased but also mRNAs
91 regulated at translational level contribute, like the ones regulated at transcriptional level, to the
92 acquisition of biological processes, which characterized Crizotinib-resistant LUAD cells.

93 **Crizotinib-resistant LUAD cells express a concomitant decrease in the level of C/D box** 94 **snoRNA and 2’Ome rRNA**

95 Knowing the emerging role of rRNA 2’Ome in regulating translation^{9,10,15,16,25}, we investigated
96 whether rRNA 2’Ome is altered in resistance to Crizotinib using RiboMethSeq. A significant
97 change in 2’Ome levels was observed for 10 out of the 112 rRNA sites (Figure 2A). In H3122-
98 CR compared to H3122-S cells, 2’Ome level is increased in all except one rRNA sites,
99 28S_Cm1327, whose 2’Ome level decrease by 12% (Supplementary Figure S3A). To
100 determine whether this alteration in rRNA 2’Ome was conserved in mature, actively translating

101 ribosomes, 2’Ome was quantified on the previously generated polysomal fractions (Figures 1B
102 and 2B). Like for total cellular extract, a significant change in 2’Ome level was observed for 9
103 common rRNA sites, which display no particular location in the human ribosome
104 (Supplementary Figures S3B-C). It suggests that analysis of total RNA is a surrogate of
105 polysome-associated ribosome, at least in these cell lines. Once again, the 2’Ome level at
106 28S_Cm1327 is the only one to decrease in polysome-associated ribosomes of H3122-CR
107 compared to the one of H3122-S (Figure 2B, Supplementary Figure S3D). Thus, 2’Ome is
108 altered in mature and active ribosomes of Crizotinib-resistant LUAD cells, including at
109 28S_Cm1327 site.

110 To determine by which mechanism alteration of rRNA 2’Ome occurs, we first evaluated change
111 in expression of the four proteins composing the rRNA 2’Ome complex (NOP56, NOP58,
112 NHP2L1 and FBL). Indeed, a strong correlation has been described between levels of the FBL
113 methyl-transferase and rRNA 2’Ome^{14,15,25}. However, these four proteins display similar levels
114 in H3122-CR and -S cells (Supplementary Figures S3E-F). In addition to proteins, the rRNA
115 2’Ome complex contains one C/D box small nucleolar RNA (snoRNA or SNORD), which
116 hybridizes rRNA in a sequence specific manner to guide FBL^{18,26}. To determine whether
117 change in rRNA 2’Ome level relies on SNORD expression in Crizotinib-resistant cells, we used
118 our previously published GSE49508 dataset (Figure 2C)³. snoRNA analyses were first
119 validated by comparing the log₂(FC) values between H3122-CR and -S of 7 SNORDs obtained
120 by beads-array and RT-qPCR ($p < 0.05$ and $r^2 = 0.86$) (Supplementary Figure S3G). From
121 GSE49508 dataset, a significant decrease in two SNORDs was observed in H3122-CR
122 compared to -S cells, the most down-regulating one corresponding to SNORD104, which
123 specifically guides 2’Ome at the 28S_Cm1327 rRNA site (Figure 2C) (snoDB v2.0:
124 <http://scottgroup.med.usherbrooke.ca/snoDB/>)¹⁸. This decreased level in SNORD104 levels
125 was also detected in H3122 cells resistant to X356, another ALK inhibitor, in the GSE49508
126 dataset (Supplementary Figures S3H-I). We then validated that SNORD104 levels decrease
127 in H3122-CR compared to -S cells (Figures 2D-E). Of note, expression levels of its host gene
128 *SNHG25* is also concomitantly decreased, suggesting a transcriptional event regulating both
129 *SNHG25* and SNORD104 that however does not involve DNA methylation of the *SNORD104-
130 SNHG25* locus (Figure 2F, Supplementary Figures S3J-K). Thus, while no change in levels of
131 the protein components of the rRNA 2’Ome complex, Crizotinib-resistant LUAD cells display
132 alteration in SNORDs.

133 Altogether, our data demonstrate that a concomitant decrease in levels of SNORD104 and
134 2’Ome at its associated 28S_Cm1327 rRNA site characterizes Crizotinib-resistant LUAD cells.

135 **Depletion of SNORD104 abolishes 2’Ome at 28S_Cm1327 and alters translation**

136 To determine whether SNORD104-induced alteration in 2’Ome at 28S_Cm1327 contributes in
137 Crizotinib-resistance, we first characterized the impact of SNORD104 depletion on ribosome
138 composition and translation. SNORD104 knock-down was performed using Antisense LNA
139 Gapmer approach in H3122-S cells. At 72 hrs post gymnosis treatment, LNA-SNORD104
140 treated cells showed significant 70% decrease in SNORD104 levels compared to non-treated
141 and LNA-ctrl treated cells, while no change in the level of its host gene SNHG25 was observed
142 (Figures 3A-C). In addition, only the level of 2’Ome at 28S_Cm1327 was reduced in LNA-
143 SNORD104 compared to LNA-ctrl treated cells, its levels being completely abolished in
144 response to SNORD104 knock-down (Figure 3E). It has to be noted that reduction of 2’Ome
145 level at 28S_Cm1327 was detected as soon as 24 hrs, its complete abolition being observed
146 from 48 hrs (Supplementary Figures S4A-B). Moreover, decrease in SNORD104 levels and
147 abolition in 2’Ome at 28S_Cm1327 remain effective under LNA-SNORD104 treatment for one
148 month (Supplementary Figures S4A-B). Finally, removal of LNA-SNORD104 from the medium
149 progressively and concomitantly restore levels of SNORD104 and 2’Ome at 28S_Cm1327.
150 These data demonstrate that H3122-S cells tolerate complete abolition of 2’Ome at the
151 28S_Cm1327 for at least one month, this abolition being reversible. Thus, SNORD104
152 depletion dynamically and specifically alters ribosome composition at a single rRNA 2’Ome
153 site.

154 To determine whether SNORD104-induced loss in 2’Ome at 28S_Cm1327 impacts translation,
155 we analysed global protein synthesis using puromycylation assay and cap-independent
156 translation using a bicistronic reporter assay containing the 5’UTR of IGF-1R mRNA. Indeed,
157 2’Ome has been shown to regulate cap-independent translation of *IGF-1R* mRNA^{15,25}. In
158 H3122 sensitive cells, LNA-ctrl and -SNORD104 treatments do not affect global protein
159 synthesis, while cap-independent translation slightly decreases of 20% in LNA-SNORD104
160 compared to -ctrl, suggesting that SNORD104 depletion has only a slight impact on translation
161 in basal condition (Figures 3F-H and Supplementary Figures S5). In contrast, in response to
162 Crizotinib, a 2-fold increase in both global protein synthesis and cap-independent translation
163 occurs in LNA-SNORD104 compared to LNA-ctrl treated cells. Difference in bicistronic reporter
164 assay does not result from any change in Renilla or Firefly mRNA levels but rather from an
165 increased Firefly activity (Supplementary Figures S5). Overall, SNORD104-induced loss in
166 2’Ome at 28S_Cm1327 is associated with alteration in both global protein synthesis and cap-
167 independent translation however mostly in response to Crizotinib.

168 **Depletion of SNORD104 promotes resistance to Crizotinib**

169 We then investigated whether SNORD104 depletion contributes to Crizotinib-resistance. Live
170 cell number was first determined in H3122-S LUAD cells pre-treated with LNA-SNORD104 or
171 – ctrl, in response or not to Crizotinib exposure. While no significant difference was observed
172 in non-treated cells, the number of alive LNA-SNORD104 cells was significantly higher than
173 the one of LNA-ctrl in response to Crizotinib (Figure 4A). These data indicate that SNORD104
174 depletion promotes resistance to Crizotinib. Similarly, compared to LNA-ctrl treated H3122-S
175 cells, no difference was observed in colony number issued of LNA-SNORD104 cells in vehicle
176 condition, while a significant increase in colony number occurred in LNA-SNORD104 pre-
177 treated cells in response to Crizotinib (Figures 4B-C). Finally, monitoring of cell number for 16
178 days also revealed a difference in response to Crizotinib but not in basal condition, between
179 LNA-SNORD104 and -ctrl treated H3122-S cells (Figures 4D-E). While a 90% decrease in
180 LNA-ctrl cell number occurs from day 4 in response to Crizotinib, a delay is observed in LNA-
181 SNORD104 cells, which reach the 90% decrease only at day 8. Thus, SNORD104 depletion
182 has no effect in basal condition, although it promotes increased cell viability and colony
183 formation in response to Crizotinib.

184 Recently, it has been described that a subpopulation of drug-tolerant persister cells (DTPs)
185 constitute a reservoir from which resistant cells may emerge²⁷. In melanoma, DTPs are
186 characterized by a slow-proliferative phenotype, a change in cell identity and a global decrease
187 in protein synthesis associated with the maintenance of translation of a mRNA subgroup
188 allowing DTPs to bypass the selective pressure^{5,28}. To determine whether SNORD104
189 depletion favours appearance of DTPs in 2-weeks exposure to Crizotinib, we compared LNA-
190 ctrl and -SNORD104 treated H3122-S cells, the latter one maintaining a decrease in
191 SNORD104 level over time without any change in the expression of its host gene SNHG25
192 (Supplementary Figures S6A-B). LNA-SNORD104 and -ctrl treated cells exhibit similar
193 variation in levels of mRNAs encoding stem or cell cycle markers in response to Crizotinib
194 (Supplementary Figures S6C). In addition, similar decrease in S phase was observed in
195 response to Crizotinib in both LNA-SNORD104 and -ctrl pre-treated cells (Supplementary
196 Figures S6D-E). The Crizotinib-resistance induced by SNORD104 depletion is not associated
197 with an increase in DTPs. We finally investigated apoptosis. In response to Crizotinib, caspase
198 3/7 activation increased in a time-dependent manner in LNA-ctrl cells (Figure 4F). In contrast,
199 only a slight increase stabilized from 24 hrs was observed in response to Crizotinib in LNA-
200 SNORD104 cells. Altogether, it demonstrates that SNORD104 depletion, which abolishes
201 2’Ome level at its associated 28S_Cm1327 rRNA site and alters translation, promotes
202 resistance to Crizotinib by decreasing apoptosis.

203 **SNORD104 restores sensitivity to Crizotinib-resistant LUAD**

204 Since reduction of SNORD104 promotes resistance to Crizotinib, we investigated whether
205 increasing SNORD104 level might restore sensitivity to Crizotinib. Indeed, we observed that
206 increased levels of SNORD104 correlate with sensitivity to Crizotinib (Figure 5). We observed
207 a dose- and time-dependent increase in SNORD104 level, but not in its host gene SNHG25,
208 in H3122-S but not in H3122-CR in response to increasing concentration of Crizotinib that
209 parallel their cell viability. These data support the notion that SNORD104 contributes to
210 sensitivity to Crizotinib.

211 To evaluate whether SNORD104 re-expression in Crizotinib-resistant LUAD cells restore drug
212 sensitivity, we established H3122-CR cells expressing inducible SNORD104. In response to
213 doxycycline induction, while no change in both SNORD104 and its host gene SNHG25 was
214 observed in H3122-CR-Empty cells, H3122-CR-SNORD104 cells display a dose-dependent
215 increase in SNORD104 but not in SNHG25 (Figures 6A-B and Supplementary Figures S7A-
216 B). Interestingly, 0.5 µg/ml doxycycline increases SNORD104 level in H3122-CR-SNORD104
217 to a RNA level equivalent to the basal one of H3122 sensitive cells (Supplementary Figure
218 S7A). Moreover, increased expression of SNORD104 is associated with a specific increase in
219 2’Ome level at 28S_Cm1327 site, no difference being observed in H3122-CR-Empty cells
220 (Figure 6C and Supplementary Figure S7C).

221 Using this system, we first evaluate viability of SNORD104 overexpressing H3122-CR cells in
222 response to increasing doses of Crizotinib for 72 hrs. While we detected no difference between
223 -Empty and -SNORD104 cell lines at 0.5 µg/ml doxycycline, an increase in cell viability was
224 observed in 0.1 µg/ml doxycycline-induced H3122-CR-Empty cells but not in H3122-CR-
225 SNORD104 cells (Supplementary Figures S7D-E). It suggests that the Crizotinib-resistance
226 induced by doxycycline in H3122-CR-Empty cells is abolished by SNORD104 overexpression
227 in H3122-CR-SNORD104. In addition, while no difference in colony formation was observed
228 between non-treated and Crizotinib treated H3122-CR-Empty cells, SNORD104
229 overexpression slightly but reproducibly decreases number of cell colonies only in response to
230 Crizotinib (Figures 6D-E).

231 Altogether, these data suggest that SNORD104 overexpression, which increases rRNA 2’Ome
232 level at 28S-Cm1327, restores drug sensitivity of Crizotinib-resistant LUAD cells.

233 **SNORD104-induced decreased in 2’Ome level at 28S_Cm1327 occurs in different TKI-**
234 **resistant and genomic contexts**

235 As previously described, decrease in SNORD104 levels in Crizotinib-resistant H3122 cells
236 compared to sensitive ones, also occurred in a second pair of H3122 cells that include a cell
237 line resistant to another ALK inhibitor, X356 (Supplementary Figures S3H-I). To determine
238 whether it corresponds to a general characteristic of resistance to ALK inhibitors, we compared
239 Lorlatinib-resistant H3122 cells (H3122-LR) and sensitive ones. Like for H3122-CR,
240 SNORD104 level, as well as levels of its host gene SNHG25 and 2’Ome at its associated
241 28S_Cm1327, is significantly lower in H3122-LR compared to H3122-S (Figures 7A-C).
242 Comparison was then extended to another genomic context, EGFR mutation. Once again,
243 Osimertinib-resistant H1975 cells expressing EGFR-Thr790Met mutant (H1975-OR) express
244 a lower level of SNORD104 than H1975-S (Figure 7D). Moreover, H1975-OR cells also display
245 a lower 2’Ome level than H1975-S, while no difference in the host gene SNHG25 was observed
246 (Figures 7E-F). These data not only reinforce the concomitant alteration of SNORD104 and
247 2’Ome level at its associated 28S_Cm1327 site in TKIs resistance, but also suggest that it is
248 a hallmark of LUAD resistant cells independently of the genomic context.

249 **Discussion**

250 Drug resistance remains an on-going clinical challenge to improve survival of cancer patients,
251 in particular in lung adenocarcinoma where all patients relapse within the first year of TKIs
252 treatment². Although all the effort made to identify novel actionable targets, the discovery that
253 non-genomic mechanisms contribute to TKIs resistance open-up novel avenues⁴. Here, we
254 accumulated data demonstrating that snoRNA-induced alteration in rRNA 2’Ome at a single
255 site contributes in TKIs resistance.

256 Several snoRNAs have been shown to play role in cancer, including in lung tumorigenesis or
257 drug resistance¹⁷. Although most studies assume that snoRNAs play role through their
258 canonical function in guiding rRNA chemical modifications, it remains to be demonstrated.
259 Here, we attempted to address this critical point. First, most snoRNAs are encoded by
260 nucleotide sequences located in the intron of host genes and evaluating whether modulating
261 snoRNAs affect expression of their host gene allows to dismiss putative side-effect^{29,30}. For
262 instance, migration of ovarian cells is impaired by knocking-down both SNORA19, which also
263 reduces expression of its host gene EIF3A, and EIF3A itself, suggesting that impact of snoRNA
264 depletion on cell migration is caused at least in part by the host gene³¹. In our study, we
265 validated in all our models that SNORD104 modulation does not affect expression of its host

266 gene SNHG25. Second, it emerges that snoRNAs display non-canonical functions and
267 regulate gene expression in a ribosome-independent manner, by controlling RNA splicing or
268 stability for examples^{32,33}. Only one study reported a biological role of SNORD104 in cancer³⁴.
269 Like us, they showed that SNORD104 depletion promotes apoptosis, however in basal
270 condition. Moreover, they reported that SNORD104 increases stability and nuclear localization
271 of PARP1 mRNA by adding 2’Ome on its novel mRNA target³⁴. Here, no change in PARP1
272 mRNA or protein levels was observed in response to SNORD104 depletion (data not shown).
273 To go a step forward the demonstration that SNORD104 plays a role in TKIs resistance through
274 its canonical function, we systematically quantified rRNA 2’Ome level by RiboMethSeq and
275 showed that SNORD104 modulation correlates with specific change in rRNA 2’Ome level at
276 its associated 28S_Cm1327 site. Moreover, we also demonstrated that SNORD104 depletion
277 impairs translation, supporting that SNORD104 contributes to TKIs resistance through rRNA
278 2’Ome.

279 In contrast to what has been previously shown³⁴, we reported that SNORD104-induced
280 modulation of 2’Ome has no effect in basal condition, while it affects molecular and cellular
281 processes in response to Crizotinib. Indeed, impact on protein synthesis rate and cap-
282 independent translation, as well as on cell viability and colony formation, in response to
283 SNORD104-induced modulation of 2’Ome, was observed only in presence of Crizotinib. These
284 data suggest that 2’Ome at 28S_Cm1327 site is not compulsory in basal condition, and rather
285 plays a role in cell adaptation to stress response. To our knowledge, the few studies
286 demonstrating biological role of rRNA 2’Ome focused only on basal condition by depleting
287 either the methyl-transferase FBL or a single SNORD¹⁴⁻¹⁶. However, alteration of rRNA 2’Ome
288 has been described in response to diverse stresses, including hypoxia, chemotherapy or
289 oncogenic activation, supporting a role of rRNA 2’Ome in adaptation to stress
290 response^{10,16,35,36}. Here, the dynamic and reversibility of rRNA 2’Ome at 28S_Cm1327 in
291 response to SNORD104 modulation, reinforce its role in TKIs adaptation.

292 Therapeutic interventions indeed change the selective pressures applied on cancer cells, thus
293 shaping cancer evolution through elimination of drug-sensitive subpopulations and selection
294 or expansion of resistant subpopulations²⁷. Non-genetic mechanisms start to emerge as an
295 innovative source of therapeutic targets⁴. In particular, the role of translational regulation and
296 the translational machinery in drug resistance starts to emerge⁵. Translation is indeed an
297 efficient molecular mechanism for rapid cell adaptation to environmental pressure by directly
298 acting on protein synthesis³⁷. In melanoma, combined exposure to BRAF inhibitors and the
299 initiation translational factor eIF4A is sufficient to reduce tumor growth in melanoma BRAF-
300 resistant mouse xenograft³⁸. Furthermore, a phase I/II clinical trial reports that inhibitor of

301 another translational factor, eIF4E, stabilizes the disease of half of the irinotecan-refractory
302 colorectal cancer patients³⁹. Here, we demonstrated that translational reprogramming is a
303 novel molecular levels distinguishing Crizotinib-resistant cells from sensitive ones, regulation
304 of mRNA levels and their translation allowing to acquire, and maintain, similar TKIs-resistant
305 characteristics. These data support the notion that translation contributes to TKI-resistance in
306 LUAD. Recently, it has been reported that the ribosome itself promotes chemo-resistance.
307 Ribosomes having integrated 5-FU increase cap-independent translation of IGF1-R mRNA,
308 which favours cell survival⁷. Our data support a role SNORD104-induced modulation of 2’Ome
309 in Crizotinib adaptation to survive by limiting apoptosis. However, it seems not to be limited to
310 a particular couple of genomic complex/TKI, supporting a broader impact. Here, we
311 demonstrated that in response to Crizotinib, abolition of 2’Ome at 28S_Cm1327 increases
312 global protein synthesis rate probably through cap-independent mechanisms. Thus, rRNA
313 2’Ome might favours the translation of particular mRNAs to promote cell survival. Moreover,
314 the 28S_Cm1327 site is located within the exit peptide tunnel and change in ribosome
315 composition might contribute to regulate co-translational protein folding, an emerging function
316 of ribosome⁴⁰⁻⁴². These data suggest that snoRNA-induced change in rRNA 2’Ome is a novel
317 non-genomic mechanism involved in TKIs resistance.

318 While several studies report that heterogeneity in ribosome composition has been extensively
319 described at the rRNA 2’Ome levels in different physio-pathological contexts, only few studies
320 demonstrate the role of rRNA 2’Ome in regulating translation or specifying a particular
321 phenotype. Even with the previously discussed limitations, this study represents a step forward
322 the demonstration of specialized ribosome based on rRNA 2’Ome, by demonstrating that rRNA
323 2’Ome contributes to TKIs resistance. Moreover, our data demonstrate that the emerging role
324 of rRNA epitranscriptomics in cancer might shed into light yet unexplored non-genomic
325 mechanisms of TKI resistance.

Materials and Methods

Cell culture and treatment

H3122 (ATCC CRL-5806), H3122-mCherry, H1975 (ATCC CRL-5908) and H1975-mCherry cells were cultured in RPMI 1640 media (Gibco, 21875034) supplemented with 5 % fetal bovine serum (Capricorn Scientific, FBS-12A) and 1 % Penicillin-Streptomycin. Resistant cells were derived from sensitive cells through increasing doses of tyrosine kinase inhibitors as previously described³. H3122 cells resistant to Crizotinib (H3122-CR) or Lorlatinib (H3122-LR), and H1975 cells resistant to Osimertinib (H1975-Osi) were maintained in 1 μ M Crizotinib (Selleckchem, PF-02341066), 1 μ M Lorlatinib (Selleckchem, PF-6463922) and 1 μ M Osimertinib (Selleckchem, AZD9291), respectively. DMSO 0.1 % is used as vehicle and control of tyrosine kinase inhibitors. All cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂.

Modulation of SNORD104 expression

Reduction of SNORD104 levels in sensitive cells was induced through gymnosis by supplemented culture medium with 100 nM Antisense Locked Nucleic Acids (LNA) GapmeR (Qiagen, LNA-SNORD104 or LNA-ctrl) in suspended cell at the time of plating (Supplementary Table S1). Stable H3122 crizotinib-resistant cells (H3122-CR) with integration of inducible SNORD104- or Empty-GFP locus were derived using pBTag plasmid and transposase (Supplementary Table S1). Two rounds of selection were performed to obtain polyclonal cell lines using 1 μ g/ml puromycin and then GFP-based cell sorting after 0.5 μ g/ml doxycycline induction (Sigma, D9891-25G). Prior cell plating for the different assays, $1.5 \cdot 10^6$ cells were pretreated in T75cm² for 72 hrs with either 100 nM LNA or 0.5 μ g/ml doxycycline.

Polysome profiling

H3122-S and -CR cell lines were seeded at $2 \cdot 10^6$ cells in 15 cm dish for 48 hrs prior incubation for 15 min with 25 μ g/ml emetin while cells reached around 70% of confluence. Cytosolic fractions were prepared in lysis buffer (25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 7% sucrose, 2 mM DTT, 0.5% NP40, 10 U/ml RNase OUT and 1X inhibitor of protease by mechanical lysis using the PreCellys device (Ozyme) and two successive 10 min centrifugation at 800 and 12,000 g to pellet nucleus and mitochondria, respectively. Two mg of cytosolic

fraction quantified by Bradford dosage were loaded onto a 10-50% sucrose gradient and sedimented by ultra-centrifugation at 38,000 rpm for 2 hrs at 4°C using SW41 Ti rotor, OPTIMA XPN Beckman ultracentrifuge. Gradient collection and absorbance profiles were generated at 254 nm using an ISCO UA-6 detector. Polysomal fractions were pooled. Total RNA from polysomal and cytosolic fractions was purified using Trizol reagent as described by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific) and RNA pellet resuspended in RNase-free water.

RNA sequencing

RNA samples issued from 3 independent experiments were processed using TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina) according to manufacturer’s protocol. Briefly, mRNA molecules containing polyA tails were purified using poly-T oligo attached magnetic beads. Purified polyA-containing RNA was fragmented and reverse transcribed in complimentary DNA (cDNA) using reverse transcriptase and random primers. In a second strand cDNA synthesis step, dUTP replaced dTTP to achieve strand specificity. In the final steps, adenine and thymine bases were added to fragment ends and adapters were ligated. The resulting library was purified and selectively amplified for sequencing. Next-generation sequencing was performed on NovaSeq 6000 System (Illumina) using S1 Flowcell to reach a minimum of 50 million reads per samples.

Bioinformatic analysis of polysome profiling

Data processing and analysis were performed as previously described⁷ with some adaptations function of data quality. Briefly, libraries read quality were assessed using FastQC v0.11.9 (Babraham Institute, Cambridge, UK). Reads were filtered (quality threshold Q35) and trimmed of 8 bases at their start, using Cutadapt v3.2⁴³. Only high-quality reads higher than 50 were aligned using STAR v2.7.7⁴⁴ and annotated using Ensembl annotation file, on the Homo sapiens reference genome (version GRCh38 release 100). Quantification of mapped reads was performed using featureCounts v2.0.1 from the subread R package⁴⁵. Statistical differential analyses were performed between the H3122-S and H3122-CR cell lines using the Wald test from DESeq2 R package⁴⁶. All samples were normalized together to avoid any comparison problems between fractions (cytosolic, RNA-seq, and polysomes, POLY-seq). The comparison of these fractions was then visualized by a log-log plot, and the data were filtered according to their RNA-seq and POLY-seq DGE (differential gene expression) levels using pandas v1.3.2⁴⁷. For this, p-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg method⁴⁸. Genes were considered significant if the adjusted p-value was < 0.05 with a log₂(FC) threshold of 1.

Functional annotations were then performed using gProfiler2 R package ⁴⁹ with an FDR threshold < at 0.05, and genome Ensembl GRCh38 release v104 as background. The biological process (BP) and molecular function (MF) GO terms were classified according to their depths and levels using GOATOOLS v1.3.1 ⁵⁰. Terms with a level of 4 to more were selected and plotted according to the best adjusted p-value threshold using ggplot2 ⁵¹.

Puromycylation assay

About $1.30 \cdot 10^5$ cells were seeded in 6 wells plates for 48h hrs prior 5min of 10 μ g/mL puromycin treatment. After trypsination, 400 000 cells were lysed in 12 μ l buffer (0.125M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 200mMDTE, 20% glycerol) supplemented with protease inhibitor (Complete EDTA free, Roche). All protein lysates 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 the anti-puromycin primary antibody (Millipore, MABE343, clone 12D10). StarBright 700 mouse secondary antibody was used for the detection of neo synthesised proteins by fluorescence (ChemiDoc, Bio-Rad).

RNA extraction and RTqPCR

RNA was extracted using Direct-ZOL RNA purification kit (ZYMO, R2073) and quantified using the spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Reverse transcription was performed on 200 ng of purified RNA using the PrimeScript RT kit (Takara, RR037B) 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). Quantitative PCR (qPCR) was performed using Light Cycler 480 SYBRGreen Master Mix (Roche, 4887352001) with adequate primer couples (Supplementary Table S2) on the LigthCycler® 96 Instrument. Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak et al, Methods 2001).

Northern blot

Five μ g of total RNA were loaded on a 1 mm thick 12% polyacrylamide gel and transferred on nylon membrane (Whatman® Nytran™ N nylon blotting membranes). Following transfer, membrane was UV-crosslinked (254 nm; 1200 mJ) and pre-hybridized in hybridization buffer (25 % deionized formamide, 1X SSC, 0.5 % SDS, 200 μ g/mL salmon sperm DNA, 5X Denhardtts) for 90 min at 42°C. Hybridization was performed at 42°C overnight with appropriate

fluorescent oligo probes (Table S3) at 200 nM in hybridization buffer. Signals were revealed using Chemidoc MP and quantified with Image Lab Software (BioRad).

RiboMethSeq and snoRNA differential expression

rRNA 2’Ome was quantified using 100 ng of RNA by RiboMethSeq as previously described^{12,52}. Briefly, RNA was partially and randomly fragmented under alkaline conditions prior library preparation using the NEBNext Multiplex Small RNA Library kit (New England Biolabs). Sequencing was performed using Illumina HighSeq or NovaSeq sequencer in single-end mode (SR50). Data processing was performed using ribomethseq-nf pipeline to extract 5’-end read counts from fastq data (<https://github.com/RibosomeCRCL/ribomethseq-nf>). Quality control, adjustment and C-scores computation (flanking window of +/- 6 nucleotides) were performed using the rRMSAnalyzer package (<https://github.com/RibosomeCRCL/rRMSAnalyzer>).

GSE49508 dataset was used to analyse differential gene expression (DGE) of snoRNAs between H3122-S et H3122 resistant cells. DGE analysis was performed using GEO2R tools of NCBI GEO Profile portal with costumed cut-off values (adjusted p-values based on Benjamini & Hochberg = 0 and Log₂(FC) = 0) prior extraction of snoRNA (SNORD* or SNORA* gene symbol) using R.

Cell viability assays

Numeration of dead cells were first determined using Trypan blue (Invitrogen, T10282). Second, IC₅₀ was determined with Cell Titer 96 Aqueous one (Promega, G3581) either systematically verified after thawing or as cell viability assay. H3122 were plated at 1,500 cells per well in 96-wells plate and treated the next day with a range of 0.1 to 10 μM Crizotinib or 0.1 % of DMSO (vehicle) for 72h. As described by the manufacturer, 20μL of the dye were added prior incubation for 4h at 37°C in the dark. Luminescence was measured at 490nm using the TECAN Spark. Finally, cell growth and proliferation were monitored in real-time using Incucyte device (Sartorius, Incucyte® S3). LNA or doxycycline pretreated cells were plated at 1,500 cells per well in 96-wells plate and supplemented the next day with tyrosine kinase inhibitors or vehicle. Imaging analyses were performed using the Incucyte 2022B Rev2 software. Numeration of cell number was performed using either the optical or fluorescent (mCherry) fields. Apoptotic cells were counted using Incucyte® Caspase 3/7 Green or Red Dye as recommended by the manufacturer (Stratorius).

Colony formation

LNA or doxycycline pretreated cells were plated in 6-wells plates at 1,000 cells per well. After 24 h, cells were treated by different concentrations of Crizotinib. Cells were washed with 1X PBS and the medium was changed, once a week with Crizotinib and once a week with both LNA/doxycycline and Crizotinib. Cells were cultured during 2 or 3 weeks to obtain clones (a cluster of about 50 cells). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature under agitation. Cells were colored by 1% crystal violet for 15 min at room temperature under agitation. Cells were dried for 1 h. The Pugin JAVA “clonogenic assay” was used to count the clones.

Luciferase reporter assays

H3122-S expressing a bicistronic renilla/firefly luciferase reporter gene were derived using lentiviral infection⁷. This reporter gene contains the complete 5'UTR of *IGF1R* mRNA as a surrogate of cap-independent translation. LNA pretreated cells were plated in 96-wells plate at 3,500 cells per well. Cells were treated the next day by Crizotinib for 24 hrs. The firefly and renilla luciferase activities were determined with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1960) using TECAN spark as detailed by the manufacturer.

Statistical analyses and graphical visualisation

Except for omics analyses detailed above, statistical analyses and data visualization were performed using GraphPad Prism v9.4.3 software (GraphPad Software, Inc). Mean comparison was performed using Mann-Whitney t tests (2 conditions) or ANOVA (> 2 conditions) on independent biological replicates. Correlation was evaluated using Spearman test. P-value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Conflict of interest

The authors declare that there have no competing interests.

Fundings

This study was funded by Ligue Nationale Contre le Cancer (PME 2016; PPE 2018), ITMO Cancer (2018, 18CN044-00), INCa (PLBio 2019-138 MARACAS; PLBio 2022-079 CLAIRE; PLBio INCa_18375 RnaSIST), ARC (Labellisation consortium 2023 ARCPGA2022120005656_6376), SIRIC Program (LYRICAN+ 2023, INCa-DGOS-INSERM-ITMO cancer_18003). NEHM, CM, HP and CJ were recipients of PhD fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer.

Authors’ contribution

NEHM, CI, CMo, CJ, MJ, TB, DM, LB, FB, FC, SD, VMarchand and RK performed and analysed experiments. JRi, HP, JRa, CMa, YM and ER performed bioinformatic analyses. NEHM, ER, SOC, JJD and VM analysed and interpreted the data. CL, PS and SOC provided cellular models. NEHM, ER, SOC and VM supervised the daily experiments. VM shaped the research question and coordinated the project. NEHM and VM wrote the first draft of the manuscript. All authors agreed the submitted version of the manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank platforms’ staffs that have not been referred as co-authors: Cancer genomic NGS Platform (CRCL, Lyon, France); Bioinformatics Gilles Thomas Platform (CRCL, Lyon, France); Bioinformatics and Imaging Platforms (CRCL, Lyon, France).

Data availability

RNA sequencing data of polysome profiling are available at the NCI Gene Expression Omnibus database under accession number GSE. Datasets of polysome profiling are available as Supplementary data 1 and gene enrichment analyses in Supplementary data 2. RiboMethSeq data (C-score) are available as Supplementary data 3.

References

1. Heist, R.S., and Engelman, J.A. (2012). SnapShot: Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 21. 10.1016/J.CCR.2012.03.007.
2. Lin, J.J., and Shaw, A.T. (2016). Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer. *Trends in Cancer* 2, 350–364. 10.1016/j.trecan.2016.05.010.
3. Lovly, C.M., McDonald, N.T., Chen, H., Ortiz-Cuaran, S., Heukamp, L.C., Yan, Y., Florin, A., Ozretić, L., Lim, D., Wang, L., *et al.* (2014). Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion positive lung cancer. *Nat. Med.* 20, 1027. 10.1038/NM.3667.
4. Marine, J.C., Dawson, S.J., and Dawson, M.A. (2020). Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 20, 743–756. 10.1038/S41568-020-00302-4.
5. Fabbri, L., Chakraborty, A., Robert, C., and Vagner, S. (2021). The plasticity of mRNA translation during cancer progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* 21, 1–20. 10.1038/s41568-021-00380-y.
6. Bash-Imam, Z., Thérizols, G., Vincent, A., Lafôrets, F., Espinoza, M.P., Pion, N., Macari, F., Pannequin, J., David, A., Saurin, J.-C., *et al.* (2017). Translational reprogramming of colorectal cancer cells induced by 5-fluorouracil through a miRNA-dependent mechanism. *Oncotarget* 8, 46219–46233. 10.18632/oncotarget.17597.
7. Therizols, G., Bash-Imam, Z., Panthu, B., Machon, C., Vincent, A., Ripoll, J., Nait-Slimane, S., Chalabi-Dchar, M., Gaucherot, A., Garcia, M., *et al.* (2022). Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance. *Nat. Commun.* 13. 10.1038/S41467-021-27847-8.
8. Rapino, F., Delaunay, S., Rambow, F., Zhou, Z., Tharun, L., De Tullio, P., Sin, O., Shostak, K., Schmitz, S., Piepers, J., *et al.* (2018). Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. *Nature* 558, 605–609. 10.1038/S41586-018-0243-7.
9. Genuth, N.R., and Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: From genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* 19, 431–452. 10.1038/s41576-018-0008-z.
10. Jaafar, M., Paraqindes, H., Gabut, M., Diaz, J.-J., Marcel, V., and Durand, S. (2021). 2’O-Ribose Methylation of Ribosomal RNAs: Natural Diversity in Living Organisms, Biological Processes, and Diseases. *Cells* 10, 1948. 10.3390/CELLS10081948.
11. Marcel, V., Kielbassa, J., Marchand, V., Natchiar, K.S., Paraqindes, H., Nguyen Van Long, F., Ayadi, L., Bourguignon-Igel, V., Lo Monaco, P., Monchiet, D., *et al.* (2020). Ribosomal RNA 2’O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer* 2. 10.1093/NARCAN/ZCAA036.

12. Paraqindes, H., Mourksi, N.-E.-H., Ballesta, S., Hedjam, J., Bourdelais, F., Fenouil, T., Picart, T., Catez, F., Combe, T., Ferrari, A., *et al.* (2023). IDHwt and IDHmut adult-type diffuse gliomas display distinct alterations in ribosome biogenesis and 2’O-methylation of ribosomal RNA. *Neuro. Oncol.* 10.1093/NEUONC/NOAD140.
13. Krogh, N., Asmar, F., Côme, C., Munch-Petersen, H.F., Grønbaek, K., and Nielsen, H. (2020). Profiling of ribose methylations in ribosomal RNA from diffuse large B-cell lymphoma patients for evaluation of ribosomes as drug targets. *NAR Cancer* 2. 10.1093/NARCAN/ZCAA035.
14. Zhou, F., Aroua, N., Liu, Y., Rohde, C., Cheng, J., Wirth, A.K., Fijalkowska, D., Göllner, S., Lotze, M., Yun, H., *et al.* (2022). A Dynamic rRNA Ribomethylome Drives Stemness in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* 13, 332. 10.1158/2159-8290.CD-22-0210.
15. Eroles, 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. U. S. A.* 114, 12934. 10.1073/PNAS.1707674114.
16. Jansson, M.D., Häfner, S.J., Altinel, K., Tehler, D., Krogh, N., Jakobsen, E., Andersen, J. V., Andersen, K.L., Schoof, E.M., Ménard, P., *et al.* (2021). Regulation of translation by site-specific ribosomal RNA methylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 28, 889–899. 10.1038/s41594-021-00669-4.
17. Mourksi, N.-E.-H., Morin, C., Fenouil, T., Diaz, J.-J., and Marcel, V. (2020). snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management. *Cells* 9, 541. 10.3390/cells9030541.
18. Bergeron, D., Paraqindes, H., Fafard-Couture, É., Deschamps-Francoeur, G., Faucher-Giguère, L., Bouchard-Bourelle, P., Elela, S.A., Catez, F., Marcel, V., and Scott, M.S. (2023). snoDB 2.0: an enhanced interactive database, specializing in human snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 51, D291–D296. 10.1093/NAR/GKAC835.
19. Godel, M., Morena, D., Ananthanarayanan, P., Buondonno, I., Ferrero, G., Hattinger, C.M., Di Nicolantonio, F., Serra, M., Taulli, R., Cordero, F., *et al.* (2020). Small Nucleolar RNAs Determine Resistance to Doxorubicin in Human Osteosarcoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19. 10.3390/IJMS21124500.
20. Kusnadi, E.P., Timpone, C., Topisirovic, I., Larsson, O., and Furic, L. (2021). Regulation of gene expression via translational buffering. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1869, 119140. 10.1016/J.BBAMCR.2021.119140.
21. Kim, S.J., Kim, S., Kim, D.W., Kim, M., Keam, B., Kim, T.M., Lee, Y., Koh, J., Jeon, Y.K., and Heo, D.S. (2019). Alterations in PD-L1 Expression Associated with Acquisition of Resistance to ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Res. Treat.* 51,

1231. 10.4143/CRT.2018.486.
22. An, R., Wang, Y., Voeller, D., Gower, A., Kim, I.K., Zhang, Y.W., and Giaccone, G. (2016). CRKL mediates EML4-ALK signaling and is a potential therapeutic target for ALK-rearranged lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 7, 29199. 10.18632/ONCOTARGET.8638.
 23. Ling, Y., Hao, Z.Y., Liang, D., Zhang, C.L., Liu, Y.F., and Wang, Y. (2021). The Expanding Role of Pyridine and Dihydropyridine Scaffolds in Drug Design. *Drug Des. Devel. Ther.* 15, 4289. 10.2147/DDDT.S329547.
 24. Joyce, J.R., and Richards, D.S. (2011). Kinetic Control of Protonation in Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 360–368. 10.1007/S13361-010-0037-0.
 25. 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. 10.1016/J.CCR.2013.08.013.
 26. Puppo, M., Jaafar, M., Diaz, J.J., Marcel, V., and Clézardin, P. (2022). MiRNAs and snoRNAs in Bone Metastasis: Functional Roles and Clinical Potential. *Cancers (Basel)*. 15, 242. 10.3390/CANCERS15010242.
 27. Leonce, C., Saintigny, P., and Ortiz-Cuaran, S. (2022). Cell-Intrinsic Mechanisms of Drug Tolerance to Systemic Therapies in Cancer. *Mol. Cancer Res.* 20, 11–29. 10.1158/1541-7786.MCR-21-0038/672990/AM/CELL-INTRINSIC-MECHANISMS-OF-DRUG-TOLERANCE-TO.
 28. Shen, S., Faouzi, S., Bastide, A., Martineau, S., Malka-Mahieu, H., Fu, Y., Sun, X., Mateus, C., Routier, E., Roy, S., *et al.* (2019). An epitranscriptomic mechanism underlies selective mRNA translation remodelling in melanoma persister cells. *Nat. Commun.* 10. 10.1038/S41467-019-13360-6.
 29. Fafard-Couture, É., Bergeron, D., Couture, S., Abou-Elela, S., and Scott, M.S. (2021). Annotation of snoRNA abundance across human tissues reveals complex snoRNA-host gene relationships. *Genome Biol.* 22. 10.1186/S13059-021-02391-2.
 30. Boivin, V., Deschamps-Francoeur, G., and Scott, M.S. (2018). Protein coding genes as hosts for noncoding RNA expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 75, 3–12. 10.1016/J.SEMCDB.2017.08.016.
 31. Faucher-Giguère, L., Roy, A., Deschamps-Francoeur, G., Couture, S., Nottingham, R.M., Lambowitz, A.M., Scott, M.S., and Abou Elela, S. (2022). High-grade ovarian cancer associated H/ACA snoRNAs promote cancer cell proliferation and survival. *NAR Cancer* 4. 10.1093/NARCAN/ZCAB050.
 32. Bergeron, D., Faucher-Giguère, L., Emmerichs, A.K., Choquet, K., Song, K.S.,

-
- Deschamps-Francoeur, G., Fafard-Couture, É., Rivera, A., Couture, S., Churchman, L.S., *et al.* (2023). Intronic small nucleolar RNAs regulate host gene splicing through base pairing with their adjacent intronic sequences. *Genome Biol.* 24. 10.1186/S13059-023-03002-Y.
33. Danny Bergeron, Fafard-Couture, É., and Scott, M.S. (2020). Small nucleolar RNAs: continuing identification of novel members and increasing diversity of their molecular mechanisms of action. *Biochem. Soc. Trans.* 48, 645. 10.1042/BST20191046.
 34. Lu, B., Chen, X., Liu, X., Chen, J., Qin, H., Chen, S., and Zhao, Y. (2022). C/D box small nucleolar RNA SNORD104 promotes endometrial cancer by regulating the 2'-O-methylation of PARP1. *J. Transl. Med.* 20. 10.1186/S12967-022-03802-Z.
 35. Metge, B.J., Kammerud, S.C., Pruitt, H.C., Shevde, L.A., and Samant, R.S. (2021). Hypoxia re-programs 2'-O-Me modifications on ribosomal RNA. *iScience* 24. 10.1016/J.ISCI.2020.102010.
 36. Burke, M.F., McLaurin, D.M., Logan, M.K., and Hebert, M.D. (2019). Alteration of 28S rRNA 2'-O-methylation by etoposide correlates with decreased SMN phosphorylation and reduced Drosha levels. *Biol. Open* 8. 10.1242/BIO.041848.
 37. Liu, B., and Qian, S.B. (2013). Translational reprogramming in stress response. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 301. 10.1002/WRNA.1212.
 38. Boussemart, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., Thomas, M., Basmadjian, C., Ribeiro, N., Thuaud, F., *et al.* (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* 513, 105–109. 10.1038/NATURE13572.
 39. Duffy, A.G., Makarova-Rusher, O. V., Ulahannan, S. V., Rahma, O.E., Fioravanti, S., Walker, M., Abdullah, S., Raffeld, M., Anderson, V., Abi-Jaoudeh, N., *et al.* (2016). Modulation of tumor eIF4E by antisense inhibition: A phase I/II translational clinical trial of ISIS 183750—an antisense oligonucleotide against eIF4E—in combination with irinotecan in solid tumors and irinotecan-refractory colorectal cancer. *Int. J. cancer* 139, 1648. 10.1002/IJC.30199.
 40. Ahn, M., Włodarski, T., Mitropoulou, A., Chan, S.H.S., Sidhu, H., Plessa, E., Becker, T.A., Budisa, N., Waudby, C.A., Beckmann, R., *et al.* (2022). Author Correction: Modulating co-translational protein folding by rational design and ribosome engineering. *Nat. Commun.* 13, 1–1. 10.1038/s41467-022-33270-4.
 41. Guzman-Luna, V., Fuchs, A.M., Allen, A.J., Staikos, A., and Cavagnero, S. (2021). An intrinsically disordered nascent protein interacts with specific regions of the ribosomal surface near the exit tunnel. *Commun. Biol.* 4, 1–17. 10.1038/s42003-021-02752-4.
 42. Liutkute, M., Samatova, E., and Rodnina, M. V. (2020). Cotranslational Folding of

-
- Proteins on the Ribosome. *Biomolecules* 10, 97. 10.3390/BIOM10010097.
43. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12. 10.14806/EJ.17.1.200.
 44. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15. 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635.
 45. Liao, K.H., Hon, W.K., Tang, C.Y., and Hsieh, W.P. (2019). MetaSMC: a coalescent-based shotgun sequence simulator for evolving microbial populations. *Bioinformatics* 35, 1677–1685. 10.1093/BIOINFORMATICS/BTY840.
 46. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15. 10.1186/S13059-014-0550-8.
 47. McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. Proc. 9th Python Sci. Conf. 445, 51–56.
 48. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300. 10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X.
 49. Peterson, H., Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., and Vilo, J. (2020). gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. *F1000Research* 9. 10.12688/F1000RESEARCH.24956.2.
 50. Klopfenstein, D. V., Zhang, L., Pedersen, B.S., Ramírez, F., Vesztröcy, A.W., Naldi, A., Mungall, C.J., Yunes, J.M., Botvinnik, O., Weigel, M., *et al.* (2018). GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses. *Sci. Rep.* 8. 10.1038/S41598-018-28948-Z.
 51. Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag New York).
 52. Marchand, V., Ayadi, L., El Hajj, A., Blanloeil-Oillo, F., Helm, M., and Motorin, Y. (2017). High-throughput mapping of 2’-O-Me residues in RNA using next-generation sequencing (Illumina ribomethseq protocol). *Methods Mol. Biol.* 1562, 171–187. 10.1007/978-1-4939-6807-7_12/COVER.
 53. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. 10.1006/METH.2001.1262.
 54. Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645. 10.1038/nature14427.

Figure legends

Figure 1. Crizotinib-resistant LUAD cells display a translational reprogramming. (A) Schematic summary of polysome profiling. Cytoplasmic extracts of the LUAD H3122 sensitive (S) or resistant to Crizotinib (CR) cells were separated on gradient sucrose to collect actively translated mRNAs (polysomes) or free RNAs and ribosomal subunits (40S, 60S and 80S), prior RNA purification. Cytoplasmic mRNAs and polysome-associated mRNAs were analyzed by RNA-seq, subsequently termed RNA-seq and POLY-seq, respectively. IC50: Half maximal inhibitory concentration. **(B)** Comparison of polysomes profiles. Compared to H3122-S cells (green), H3122-CR cells (orange) exhibit a decrease in polysomes. 40S: small ribosomal subunits; 60S: large ribosomal subunits; 80S: mature ribosomes; polysomes: actively translated mRNAs. **(C-D)** mRNA significantly deregulated between H3122-CR and -S. Log-log plots of $\log_2(\text{FC})$ values between H3122-CR and -S issued from RNA-seq and POLY-seq is shown for each gene (C). The small dashed lines refer to the selected threshold for $\log_2(\text{FC})$ values. Only significantly deregulated genes appear as colored circles: gray: non-significant; blue: significant change in both RNA-seq and POLY-seq (category “BOTH”: p value adjusted < 0.05 and $\log_2(\text{FC}) > |1|$ for both RNA-seq and POLY-seq), identifying mRNAs subjected to concomitant change in cytoplasmic and polysome-associated levels; red: significant change in RNA-seq but not POLY-seq (“RNA”: p value adjusted < 0.05 $\log_2(\text{FC}) > |1|$ for RNA-seq, and p value adjusted > 0.05 for POLY-seq), identifying mRNAs whose cytoplasmic levels vary independently of polysomes-associated ones; yellow: significant change in POLY-seq but not RNA-seq (“POLY”: p value adjusted > 0.05 for RNA-seq, and p value adjusted < 0.05 and $\log_2(\text{FC}) > |1|$ for POLY-seq), identifying mRNAs whose polysomes-associated levels vary independently of cytoplasmic ones. The number of deregulated mRNAs in each category is given as donut circle (D). **(E)** Visualisation of mRNAs constituting the POLY category. Volcano plot with thresholds for $-\log_{10}(\text{padj})$ and $\log_2(\text{FC})$ between H3122-CR and -S used for POLY-seq shows the significantly deregulated mRNAs at polysome-associated levels. Gene names are given for gene involved in ferroptosis. Red: significantly up-regulated mRNAs associated to polysomes; blue: significantly down-regulated mRNAs associated to polysomes. **(F-G)** Analysis of gene enrichment. Gene enrichment was performed using the “POLY” mRNA lists compared to biological process and molecular function annotations of gene ontology. The top 20 of each list is shown in descending order of adjusted p-values for up- (F) or down- (G) regulated mRNAs at polysomes-associated levels.

Figure 2. rRNA 2’Ome and snoRNA expression profiles are altered in LUAD Crizotinib-resistant cells. (A-C) Comparison of rRNA 2’Ome and snoRNA profiles. rRNA 2’Ome and snoRNA expression was compared by RiboMethSeq (A-B) and bead-microarray (C, GSE49508), respectively, between H3122 resistant to Crizotinib (CR) and sensitive (S) cells. rRNA 2’Ome levels were analyzed in cellular (A) and polysomal (B) RNA fractions. A significant, concomitant decreased in levels of 2’Ome at rRNA 28S_Cm1327 site and its guided C/D box snoRNA, SNORD104, is observed in H3122 Crizotinib-resistant cells compared to H3122 sensitive ones. Gray: non-significant variation; blue: significant down-regulated level; red: significant up-regulated level. **(D-F)** Expression levels of SNORD104 and its host gene. Expression levels of SNORD104 (D-E) and its host gene SNHG25 (F) were analyzed by RT-qPCR (D, E) or Northern blot (F). Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. ****: $p < 0.0001$.

Figure 3. SNORD104 expression increases in a dose- and time-dependent manner in response to Crizotinib exposure in LUAD sensitive but not resistant cells. (A-B) Comparison of cell viability in response to Crizotinib exposure. Cell viability was monitored by MTS assay in H3122 sensitive (A) and Crizotinib-resistant (B) cells upon increasing concentration of Crizotinib throughout time. **(C-F)** Expression levels of SNORD104 and its host gene in response to Crizotinib exposure. Expression levels of SNORD104 (C-D) and its host gene SNHG25 (E-F) were analyzed by RT-qPCR in H3122-S (C, E) and H3122-CR (D, F) in response to increasing concentration of Crizotinib throughout time. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

Figure 4. SNORD104 knocking-down in LUAD sensitive increases translation in response to Crizotinib exposure. (A-D) Specific knocking-down of SNORD104. In H3122-S, expression levels of SNORD104 (A, C-D) and its host gene SNHG25 (B) were analyzed by RT-qPCR (A-B) or Northern blot (C-D) in response to 72 hrs of LNA treatment. **(E)** Specific decrease in 2’Ome level at the associated 28S_Cm1327 rRNA site. In response to LNA-induced decrease in SNORD104 levels, rRNA 2’Ome was determined by RiboMethSeq. Upper panel: absolute C-score (*i.e.*, rRNA 2’Ome level); grey: LNA-ctrl; blue: LNA-SNORD104; lower panel: Δ mean C-score: C-score(LNA-SNORD104) - C-score(LNA-ctrl). **(F-G)** Comparison of global protein synthesis. Puromycylation assay followed by western blot (F) was performed to compare the levels of neo-synthesized proteins for 5 min (G) in response to decreased SNORD104 levels and/or Crizotinib exposure. **(H)** Comparison of cap-independent translation

reporter assay. Using stable H3122-S cell line expressing a bicistronic reporter assay including the *IGF1R* 5’UTR between the Renilla (R) and Firefly (F) luciferase coding sequences, reporter assay was performed to compare cap-independent translation of H3122-S in response to decreased SNORD104 levels and/or exposure to Crizotinib. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$.

Figure 5. SNORD104 knocking-down in LUAD sensitive increases resistance to Crizotinib. (A) Comparison of dead cell number. In response to SNORD104 knock-down and Crizotinib exposure, H3122-S dead cells were counted using trypan blue staining. (B-C) Comparison of colony formation. In response to SNORD104 knock-down and increasing concentration of Crizotinib for 2-3 weeks, number of H3122-S colonies (B) were numerated (C). (D-E) Monitoring of cell proliferation. In response to SNORD104 knock-down, H3122-S-mCherry cell proliferation was monitored for 16 days either in untreated (D) or Crizotinib treated (E) conditions. (F) Monitoring of apoptosis. In response to SNORD104 knock-down, number of Cas3/7 stained H3122-S-mCherry cell was monitored for 72 hrs in response to Crizotinib exposure. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

Figure 6. Over-expression of SNORD104 re-sensitizes LUAD Crizotinib-resistant cells. (A-B) Specific over-expression of SNORD104. Expression levels of SNORD104 (A) and its host gene *SNHG25* (B) were analyzed by RT-qPCR in H3122-CR-Empty or -SNORD104 cell lines in response to 72 hrs of doxycycline treatment. (C) Specific increase in 2’Ome level at the associated 28S_Cm1327 rRNA site. In response to 72 hrs of doxycycline treatment, rRNA 2’Ome level in H3122-CR-SNORD104 cell lines was determined by RiboMethSeq. Upper panel: absolute C-score (*i.e.*, rRNA 2’Ome level); grey: untreated H3122-CR-SNORD104 cells; red: doxycycline treated H3122-CR-SNORD104 cells; lower panel: Δ mean C-score: C-score(untreated) - C-score (doxycycline treated). (D-E) Comparison of colony formation. In response to doxycycline treatment and Crizotinib for 2-3 weeks, number of H3122-CR-Empty and -SNORD104 colonies (D) were numerated (E). (F-G) Comparison of global protein synthesis. Puromycylation assay followed by western blot (F) was performed to compare the levels of neo-synthesized proteins for 5 min (G) in response to increased SNORD104 levels in H3122-CR-Empty and -SNORD104, and/or Crizotinib exposure. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; *: $p < 0.05$.

Figure 7. SNORD104 expression and activity in additional LUAD tyrosine kinase inhibitors-resistant cells. (A-B) Comparison of SNORD104 and its host gene levels in additional LUAD pairs. Expression levels of SNORD104 (A, C) and its host gene SNHG25 (B, D) were analyzed by RT-qPCR in pairs of H3122 sensitive and Lorlatinib-resistant (LR, ALK inhibitor) cells (A-B) and of H1975 sensitive and Osimertinib-resistant (OR, EGFR inhibitor) cells (C-D). **(E-F)** Comparison of rRNA 2’Ome in additional LUAD pairs. rRNA 2’Ome levels were compared by RiboMethSeq between H3122 sensitive and Lorlatinib-resistant (LR) (E) cells and of H1975 sensitive and Osimertinib-resistant (OR) cells (F). Gray: non-significant variation; blue: significant down-regulated level; red: significant up-regulated level. **(G-H)** Monitoring of apoptosis. In response to SNORD104 knock-down, number of Cas3/7 stained H3122-S-mCherry (G) and H1975-S-mCherry (H) cells was monitored for 72 hrs in response to Lorlatinib of Osimertinib, respectively. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; ****: $p < 0.0001$.

Supplementary information

Supplementary Materials and Methods

rRNA quantification

H3122 sensitive and crizotinib resistant cells were seeded at $4 \cdot 10^6$ cells in 10 cm dishes for 24 hrs. Extraction of total RNA was performed on increasing cell amount (7.5, 5.0 and 2.5×10^5 cells) using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) and resuspended in 20 μ l of RNase-free water. Three different constant fractions of the purified total RNA (2.5, 5.0 and 10.0 μ l) were then loaded on 1% agarose gel revealed with ethidium bromide. 28S and 18S bands were revealed using UV light (Quantum ST5 V16.08G instrument, Vilber) and quantified using the Image J software and normalized to the H3122 sensitive cell line.

Medium through-put RTqPCR

Gene expression levels were quantified by real-time qPCR with Master Mix 2X EvaGreen (BioRad) and primers (Supplementary Table S2) using BioMarkHD device (StarLab) as previously described¹⁷. Relative fold-changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method⁵³, using Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen) as control sample for inter-run normalization and median of 5 housekeeping genes. Each sample was quantified in triplicate.

Western blotting

Proteins were purified using Laemmli (125mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 200mM DTE, 20% glycerol) supplemented with inhibitors of proteases and phosphatases (ThermoScientific, #1861280) before denaturation at 95°C for 5min and centrifugation 5min at 7,000g. Protein lysates were quantified with TCA, subjected to SDS-PAGE with the appropriate percentage of acrylamide/bis-acrylamide and blotted onto 0.2 μ m nitrocellulose membranes (Amersham™ Protran™, 10600009). Membranes were blocked in TBS solution containing 0.05% Tween 20 and 5% BSA (Sigma, A7030) and incubated with primary antibodies overnight (Supplementary Table S4). Fluorescent secondary antibodies (StarBright Blue 700 Fluorescent Secondary Antibodies, Bio-rad) were used and signals were revealed using Chemidoc MP and quantified with Image Lab Software (BioRad).

Flow cytometry

LNA pretreated cells were plated at $9.7 \cdot 10^5$ cells in 10 cm dishes, the day before exposition to 1 μ M Crizotinib or 0.1% vehicle. After 24 hrs, cells were harvested, washed and resuspended in 1X annexin-binding buffer at $1 \cdot 10^6$ cells/mL. 5 μ L of FITC Annexin V and 1 μ L of 100 μ g/mL Propidium Iodide working solution were added to the cell suspension. Cells were incubated for 15 min and then, 100 μ L of 1X annexin-binding buffer were added. Cells were mixed gently and kept on ice. Finally, fluorescence emission at 530nm and >575nm of stained cells were measured by flow cytometry.

For review only

Supplementary Tables

Table S1. Oligonucleotides used for modulating SNORD104 expression

Gene name	Oligonucleotides	Sequence (5’-3’)
SNORD104	Antisense LNA Gapmer	AGT CTA ACA CGT GCT T
ctrl	Antisense LNA Gapmer	Qiagen, LNA Negative Control A, LG00000002

Table S2. Primer sequences used for RTqPCR

Gene name	Forward (5’-3’)	Reverse (5’-3’)
SNORD104	GCC TGC TGT GAT GAC ATT CC	TCA GAC TCC AGT TCG CAT CA
SNHG25	CGT CGG ATG TCA TCG TCC TT	TGG GTT CAA ACC ACT TTA TTG ACG
HPRT1*	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT
ALDH1A1	CGA GAG GGG GCG ACT ATT AT	TCC ACC ATT CAT TGA CTC CA
CD24	GAG ACT CAG GCC AAG AAA CG	TTG GAT GTT GCC TCT CCT TC
CD44	CCA CGT GGA GAA AAA TGG TC	CGA TGC TCA GAG CTT TCT CC
CDK1	GGA AGG GGT TCC TAG TAC TGC	AGC ACA TCC TGA AGA CTG ACT
CHEK1	CCC GCA CAG GTC TTT CCT T	GGC TGG GAA AAG CTG ATC C
NANOG	ATA CCT CAG CCT CCA GCA GA	TCT GGA ACC AGG TCT TCA CC
SOX2	ACA CTG CCC CTC TCA CAC AT	CCC ATT TCC CTC GTT TTT CT
SOX9	AGT ACC CGC ACT TGC ACA AC	GCT TCT CGC TCT CGT TCA GA
Renilla	AAC GCG GCC TCT TCT TAT TT	ACC AGA TTT GCC TGA TTT GC
Firefly	AAC ACC CCA ACA TCT TCG AC	TTT TCC GTC ATG GTC TTT CC

*Housekeeping genes

Table S3. Primer sequences used for Northern blot

Gene name	Probe (5’-3’)
SNORD104	Part 1: DY782-gtgctttaattggaatgcatcacagc-DY782 Part 2: DY782-ttcgcatcaccgctcagcagctct-DY782
7SL*	Part 1: DY682-ttcccccctccttaggcaacctgggtggtccccgctcccgaggagtcacc-DY682 Part 2: DY682- gcgcatcccactactgatcagcagggagtttgacctgctccgtttcc-DY682

*Housekeeping genes

Table S4. Antibodies

Gene name	Brand, reference	Dilution
puromycin	Millipore, MABE343 [12D10]	1/5000
GAPDH	Merck, G9545	1/5000
FBL	Abcam, ab166630	1/1000
NHP2L1	Proteintech, 15802-1-AP	1/1000
NOP56	Sigma, AMAB91013	1/1000
NOP58	Abcam, ab155969 [EPR10721]	1/1000

For review only

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1. Comparison of protein synthesis in LUAD sensitive and Crizotinib-resistant cells. (A-B) Global protein synthesis. Puromycylation assay followed by western blot (A) was performed to compare the levels of neo-synthesized proteins for 5 min (B) between H3122-S and -CR. H3122-CR cells display a significantly lower global protein synthesis compared to H3122-S. Emetin: inhibitor of translation, negative control. **(C-D)** rRNA levels. Total RNA was purified at constant number of cells and levels of 18S (C) and 28S (D) rRNAs were quantified on agarose gel. H3122-S and -CR express similar 18S and 28S rRNA levels. **(E-G)** Polysome profiles. Cytoplasmic extracts were separated on gradient sucrose to isolate actively translated mRNAs (polysomes) from free RNAs and ribosomal subunits (40S, 60S and 80S), as verified by agarose gel (E-F). Compared to H3122-S cells (E), H3122-CR cells (F) exhibit a significant decrease in actively translated mRNAs (G). **(H-I)** Validation of RNA-seq and POLY-seq data. Log₂(FC) values between H3122-CR and -S obtained for cytoplasm (RNA-seq, H) and polysomes (POLY-seq, I) were validated by medium through-put RTqPCR for 77 randomly chosen mRNAs using 5 independent experiments. A significant and strong correlation of absolute values is observed, validating the omics data credibility. (B, C, D, G) Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; **: $p < 0.01$.

Supplementary Figure 2. Gene enrichment.

Supplementary Figure 3. Comparison of rRNA 2’Ome methylation and snoRNA expression levels in LUAD sensitive and Crizotinib-resistant cells. (A) rRNA 2’Ome levels at 28S_Cm1327 site in total RNA. Comparison of rRNA 2’Ome levels at the 28S_Cm1327 site between H3122 sensitive (S) and Crizotinib-resistant (CR) cells was performed in total cellular RNA fractions. 2’Ome levels at the site 28S_Cm1327 is decreased in H3122-CR cells compared to H3122-S. **(B)** Comparison of rRNA 2’Ome in total and polysomal RNA. rRNA 2’Ome profile was determined by RiboMethSeq in H3122-S and -CR cells. rRNA sites whose 2’Ome level is significantly altered in H3122-CR compared to -S cells, were compared depending on their subcellular origin, *i.e.*, cellular (green) and polysomal (orange) extracts. Nine 2’Ome sites were commonly affected in total cellular and polysomal rRNAs. Blue: significant down-regulated 2’Ome level; red: significant up-regulated 2’Ome level. **(C)** Localization of Crizotinib-resistant associated rRNA 2’Ome sites. The 9 rRNA sites whose

2’Ome level is significantly altered in both total cellular and polysomal RNAs display no particular location on the human ribosome (PDB 4UG0 structure; ⁵⁴). Blue: ribosomal proteins; orange: 18S rRNA; yellow: 5S, 5.8S and 28S rRNAs; blue site: significant down-regulated 2’Ome level; red site: significant up-regulated 2’Ome level. **(D)** rRNA 2’Ome levels at 28S_Cm1327 site in polysomal RNA. Comparison of rRNA 2’Ome levels at the 28S_Cm1327 site between H3122 sensitive (S) and Crizotinib-resistant (CR) cells was performed in polysomal RNA fractions. 2’Ome levels at the site 28S_Cm1327 is decreased in H3122-CR cells compared to H3122-S. **(E-F)** Expression levels of rRNA 2’Ome complex factors. Protein levels of the four proteins composing the rRNA 2’Ome complex (NOP56, NOP58, FBL and NHP2L1) were compared in H3122-S and -CR cells by western blot (E) prior quantification (F). No difference was observed. A representative western blot is given and each dot represents a biological replicate. GAPDH: loading control. **(G)** Validation of snoRNA profiling. Log₂(FC) values of snoRNAs between H3122-XR and -S were validated by RTqPCR for 7 snoRNAs. A significant and strong correlation of absolute values is observed, validating the snoRNA profiling. **(H)** snoRNA profiling in H3122-S and X356-resistant cells. Differential expression of snoRNAs between H3122 sensitive (S) and resistant to X356 (XR), an ALK inhibitor, was performed using GSE49508 dataset. A global significant decrease in snoRNA expression was observed in H3122-XR compared to -S cells. Blue: significant down-regulated expression level. **(I)** Comparison of snoRNA differential expression. snoRNAs whose expression level is significantly altered in H3122 resistant compared to sensitive cells, were compared depending on the nature of the ALK inhibitor, *i.e.*, Crizotinib (orange) and X356 (yellow). Expression of 2 snoRNAs was commonly decreased in ALK inhibitors resistant cells. Blue: significant down-regulated expression level. **(J-K)** Pyrosequencing of *SNORD104* locus. Seven CpG island regions in the vicinity of *SNORD104* locus (J) were analyzed by pyrosequencing (K). No significant change was observed, although a slight increase in DNA methylation was observed in H3122-CR compared to H3122-S.

Supplementary Figure 4. Maintenance and reversion of SNORD104 knocking-down and decreased 28S_Cm1327 2’Ome level in response to Antisense LNA Gapmer treatment.

(A-B) Dynamic of SNORD104 levels in response to LNA treatment. In H3122-S, expression levels of SNORD104 were analyzed by RT-qPCR in response to short (A) or long (B) term LNA treatment. Compared to LNA-ctrl, LNA-SNORD104 significantly decreases by 50% SNORD104 levels from 24 hrs until time of LNA removal, which results in a time-dependent increase in SNORD104 levels, 10 days being required to return back to a basal SNORD104 level. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-

significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. **(C-D)** Dynamic of 2’Ome levels at the associated 28S_Cm1327 rRNA site in response to LNA treatment. In H3122-S, rRNA 2’Ome levels were quantified by RiboMethSeq in response to short (C) or long (D) term LNA treatment. Compared to LNA-ctrl, LNA-SNORD104 abolishes 2’Ome at the associated 28S_Cm1327 rRNA site from 48 hrs. Like SNORD104 expression, absence of 2’Ome at the 28S_Cm1327 site is maintained until time of LNA removal, which results in a time-dependent increase in 2’Ome levels, 10 days being required to return back to a basal 2’Ome level at 28S_Cm1327.

Supplementary Figure 5. Comparison of cap-independent translation using luciferase reporter assay. In H3122-S cell lines expressing a bicistronic luciferase reporter assay composed of the two coding sequences of Renilla and Firefly luciferase separated by the 5’UTR of IGF1R mRNA, activities (A) and mRNA levels (B) of Renilla and Firefly were analyzed by luminescence absorption and RT-qPCR, respectively. Knocking-down SNORD104 levels decreases cap-dependent translation in basal condition but not in response to Crizotinib exposure, while it decreases cap-independent translation in both untreated and Crizotinib treated conditions (A). Such effect on Renilla and Firefly activities does not result from change in their transcript levels (B).

Supplementary Figure 6. Cell proliferation in LUAD cells sensitive to Crizotinib in response to SNORD104 knocking-down. (A) Cell viability. In response to SNORD104 knock-down and increasing concentration of Crizotinib, viability of H3122 sensitive cells was analyzed by MTS assay. A slight but reproducible increase in Crizotinib IC50 was observed in response to knocking-down SNORD104. A representative graph is shown based on X technical replicates over X biological replicates. **(B-C)** Expression levels of SNORD104 and its host gene SHNG25. Expression levels of SNORD104 (B) and its host gene *SNHG25* (C) were analyzed by RT-qPCR in response to Crizotinib exposure for 13 days in LNA-ctrl and LNA-SNORD104 H3122-S treated cells. Compared to LNA-ctrl, LNA-SNORD104 maintains a significant reduction of SNORD104 but not of SNHG25 levels over time. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$. **(D)** Expression levels of stem and cell cycle markers. In response to SNORD104 knock-down and exposure to Crizotinib for 13 days, RNA levels of genes involved in stem cell and cell cycle were quantified by medium-throughput RT-qPCR. No significant difference was observed between LNA-ctrl and LNA-SNORD104 H3122 sensitive cells. **(E-F)** Cell cycle. In response to SNORD104 knock-down, cell cycle was analyzed by flow

cytometry in response to 72 hrs of Crizotinib exposure in LNA-ctrl (E) or LNA-SNORD104 (F) treated H3122 sensitive cells. No difference in cell cycle was observed between the different conditions.

Supplementary Figure 7. Characterization of over-expressing SNORD104 Crizotinib-resistant LUAD cells. (A-B) Specific over-expression of SNORD104. Expression levels of SNORD104 (A) and its host gene *SNHG25* (B) were analyzed by RT-qPCR in H3122-CR-Empty or -SNORD104 cell lines in response to 72 hrs of increasing concentration of doxycycline. A dose-dependent increase in SNORD104, but not *SNHG25*, levels was observed in H3122-CR-SNORD104 cell lines that is not observed in H3122-CR-Empty cell lines. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$. **(C-D)** 2’Ome level in H3122-CR-Empty cell line. In response to 72 hrs of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline treatment, rRNA 2’Ome level in H3122-CR-Empty cell line was determined by RiboMethSeq. Upper panel: absolute C-score (*i.e.*, rRNA 2’Ome level); grey: untreated H3122-CR-Empty cells; yellow: doxycycline treated H3122-CR-Empty cells; lower panel: Δ mean C-score: C-score(untreated) - C-score (doxycycline treated). **(D-E)** Cell viability. In response to 0.5 (D) or 1 (E) $\mu\text{g/ml}$ doxycycline and increasing concentration of Crizotinib, viability of H3122 Crizotinib-resistant cells expressing Empty or SNORD104 was analyzed by MTS assay. An increased cell viability was observed in H3122-CR-Empty, but not in -SNORD104, in response to doxycycline, indicating that first, 1 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline treatment increase cell viability, and second, that this effect is impaired by SNORD104 overexpression. A representative graph is shown based on X technical replicates over X biological replicates.

Supplementary Figure 8. snoRNA expression in additional LUAD tyrosine kinase inhibitors-resistant cells. (A-B) snoRNA expression. Expression levels of several snoRNAs were analyzed by RT-qPCR in the pairs of H3122 sensitive and Lorlatinib-resistant (LR, ALK inhibitor) cells (A) and of H1975 sensitive and Osimertinib-resistant (OR, EGFR inhibitor) cells (B). As observed in H3122-S and Crizotinib-resistant cells, a significant decrease in snoRNA expression was observed in resistant cells compared to sensitive ones. **(C-D)** Specific knocking-down of SNORD104. In H3122-S (C) and H1975-S (D), expression levels of SNORD104 were analyzed by RT-qPCR in response to 72 hrs of LNA treatment. Each dot represents a biological replicate. Statistical t-test has been performed. Ns: non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

Figure 1

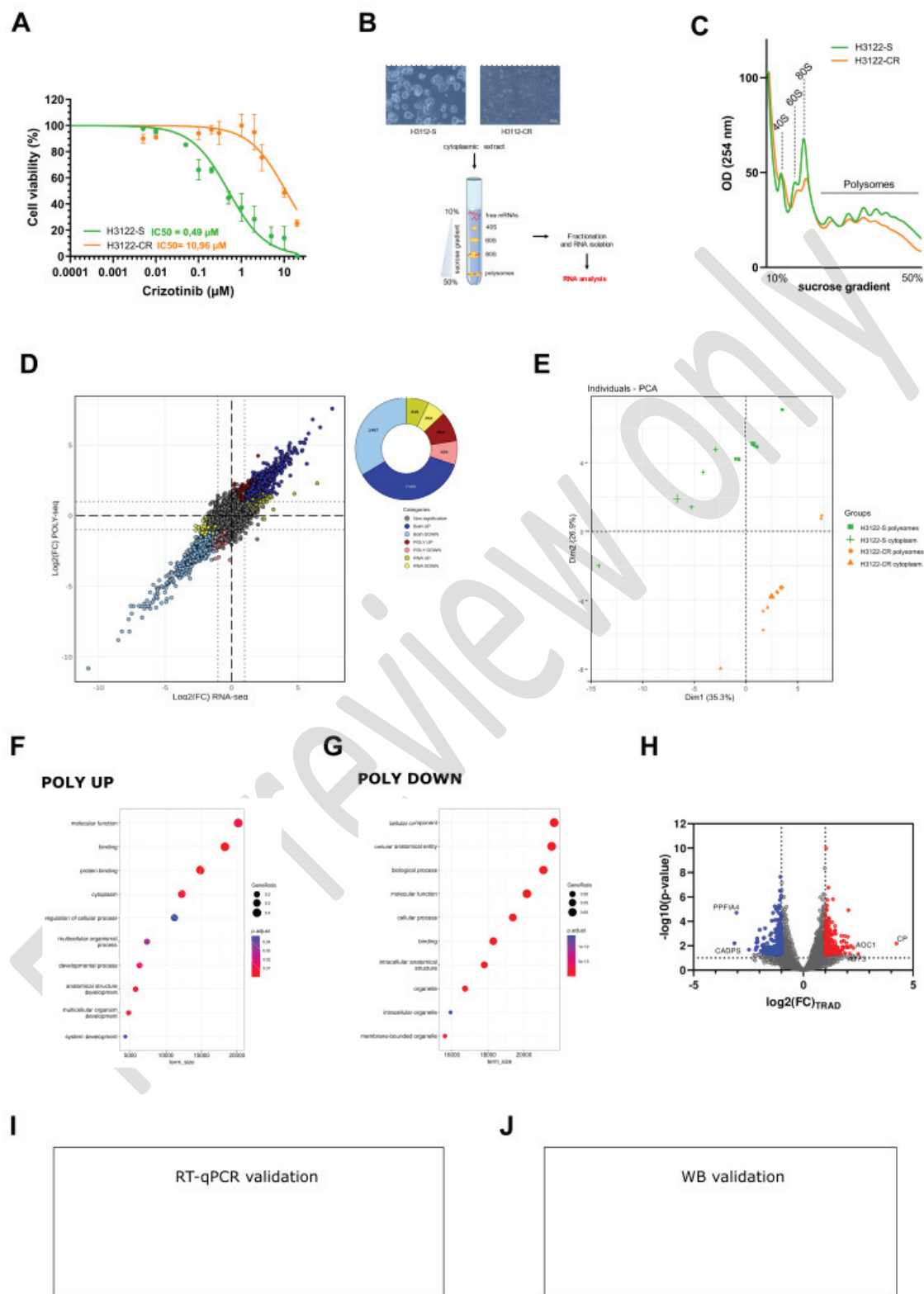


Figure 2

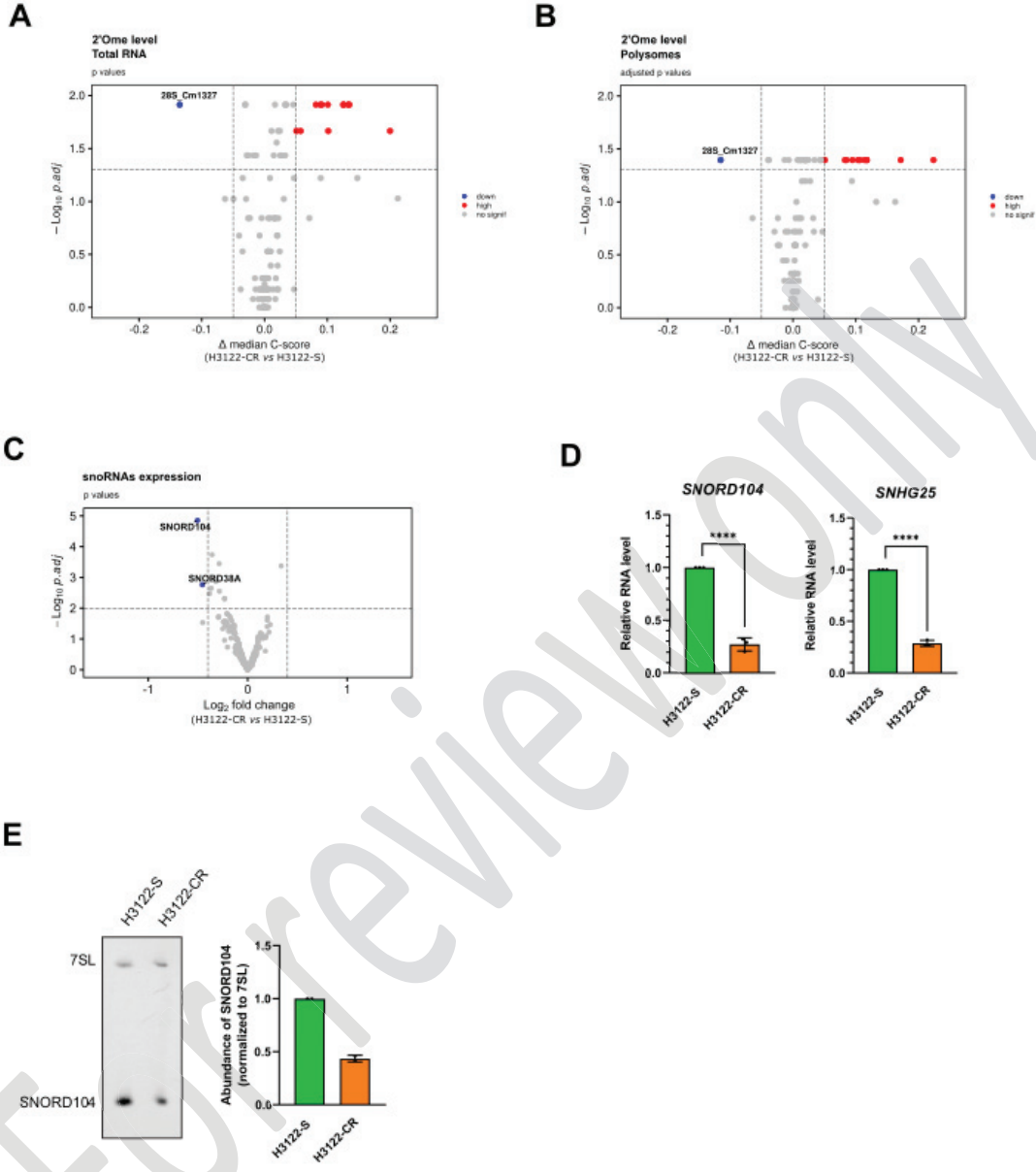


Figure 3

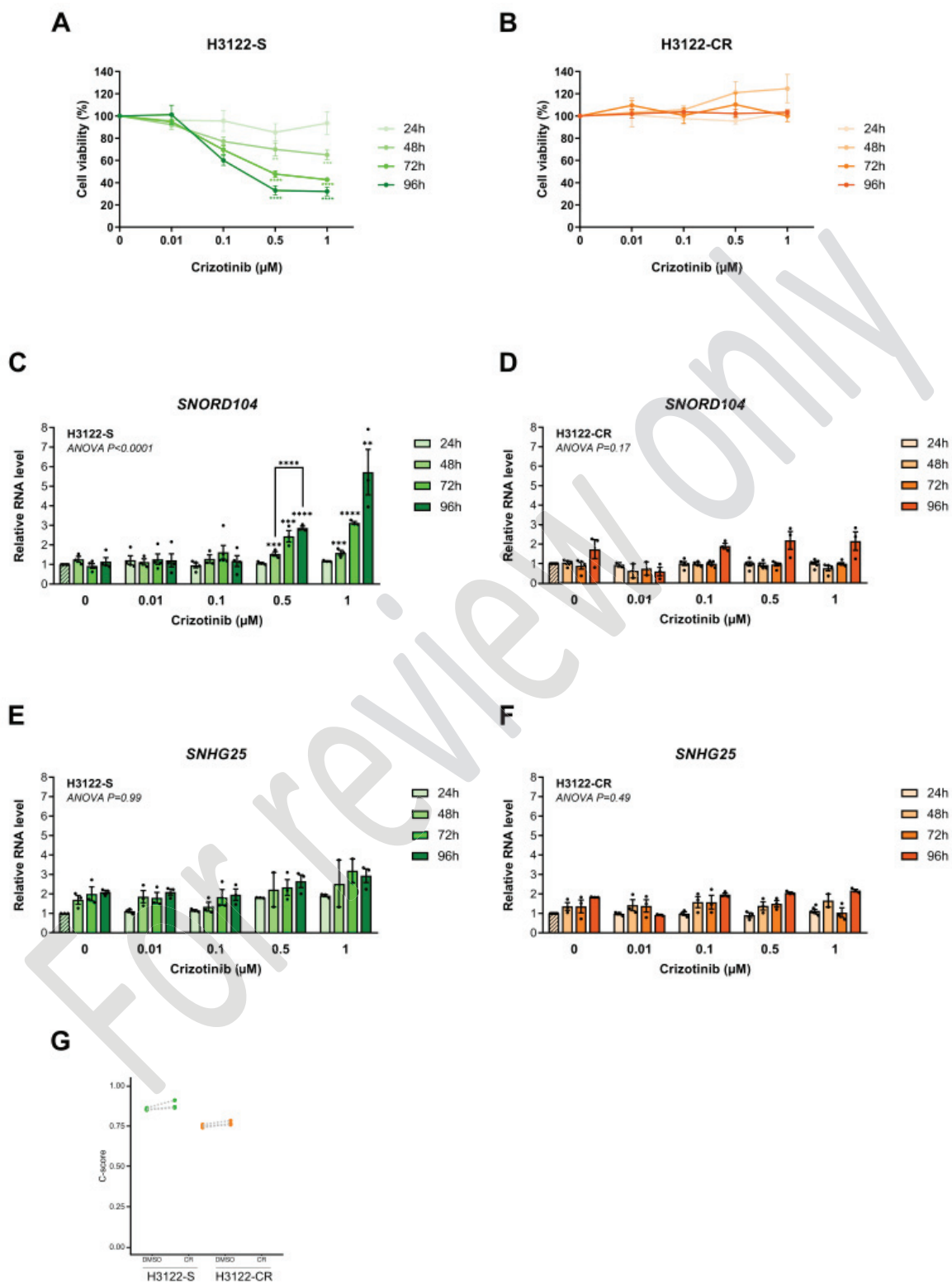


Figure 4

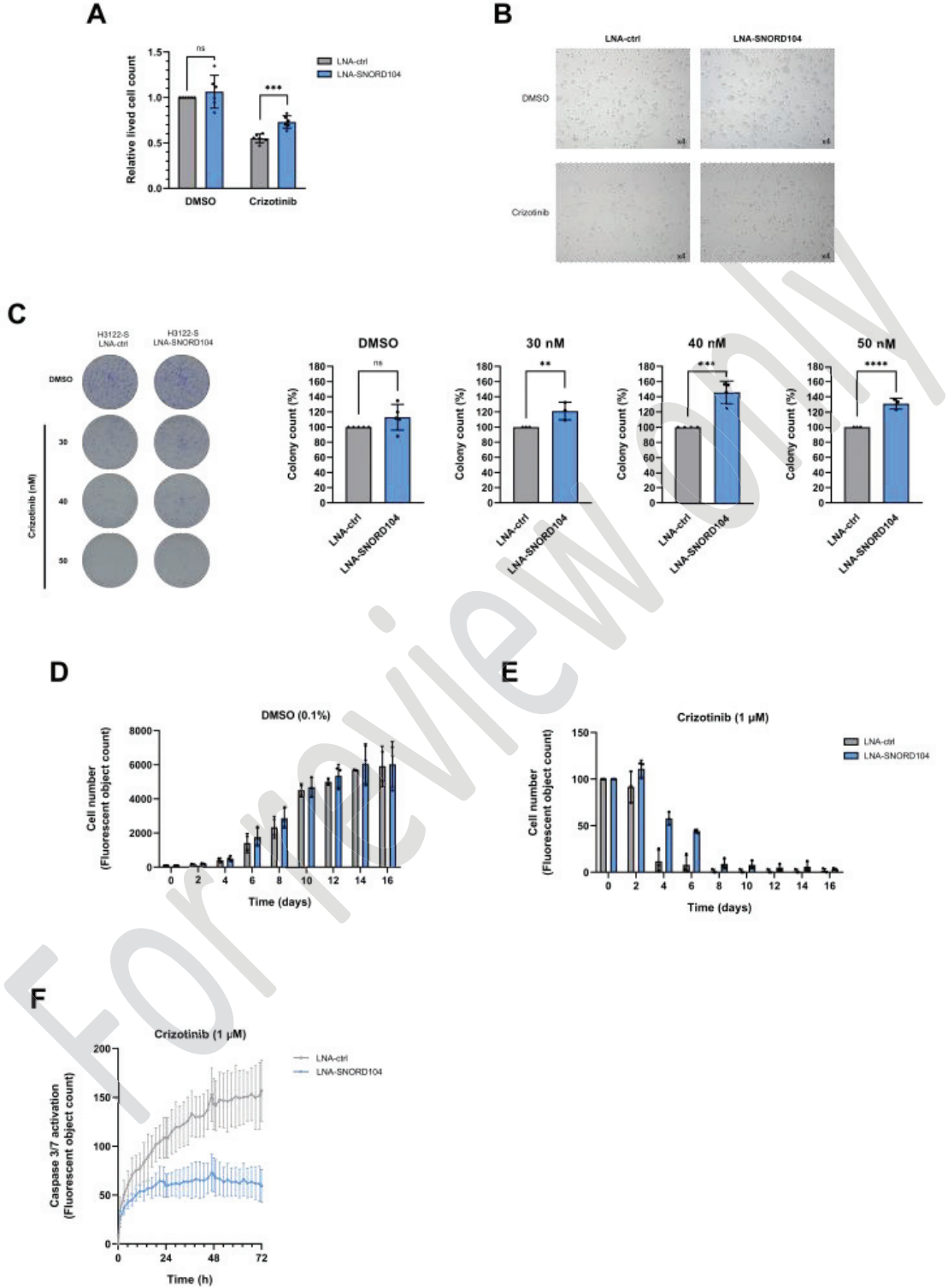


Figure 5

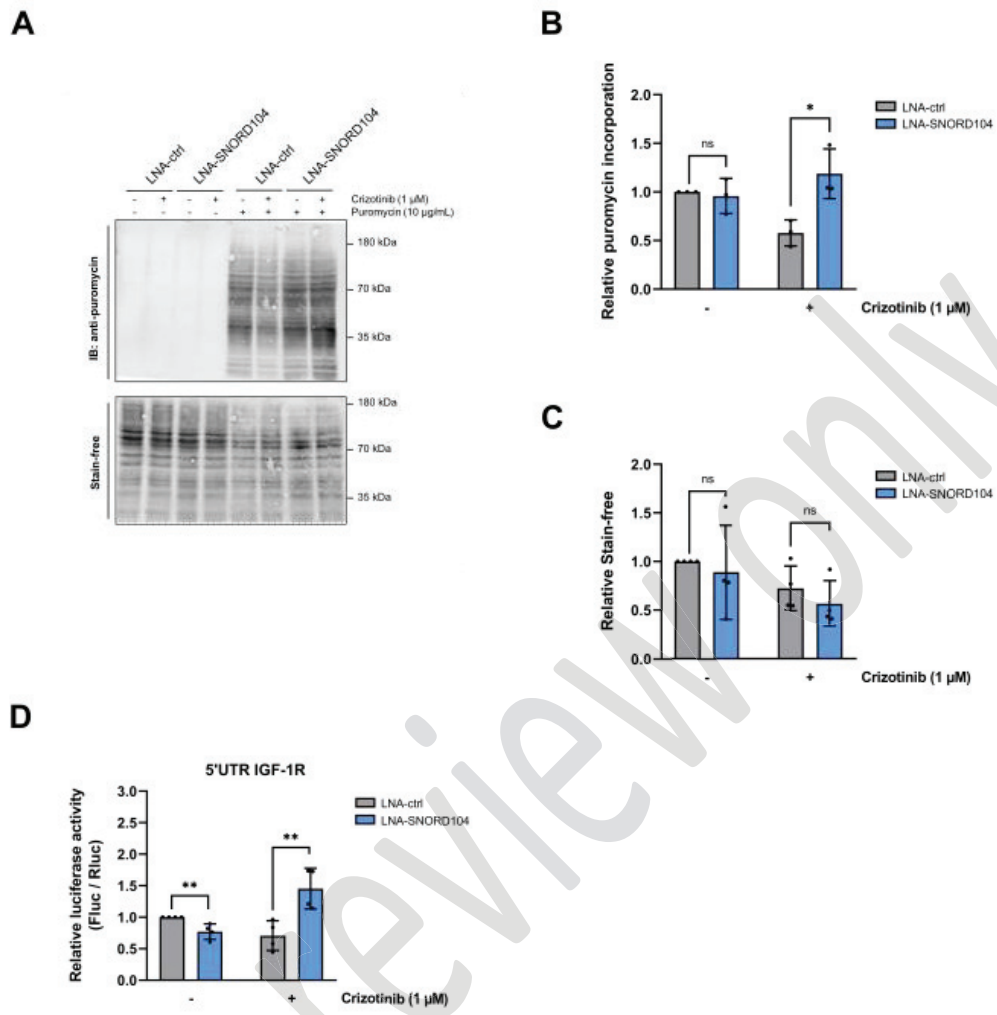
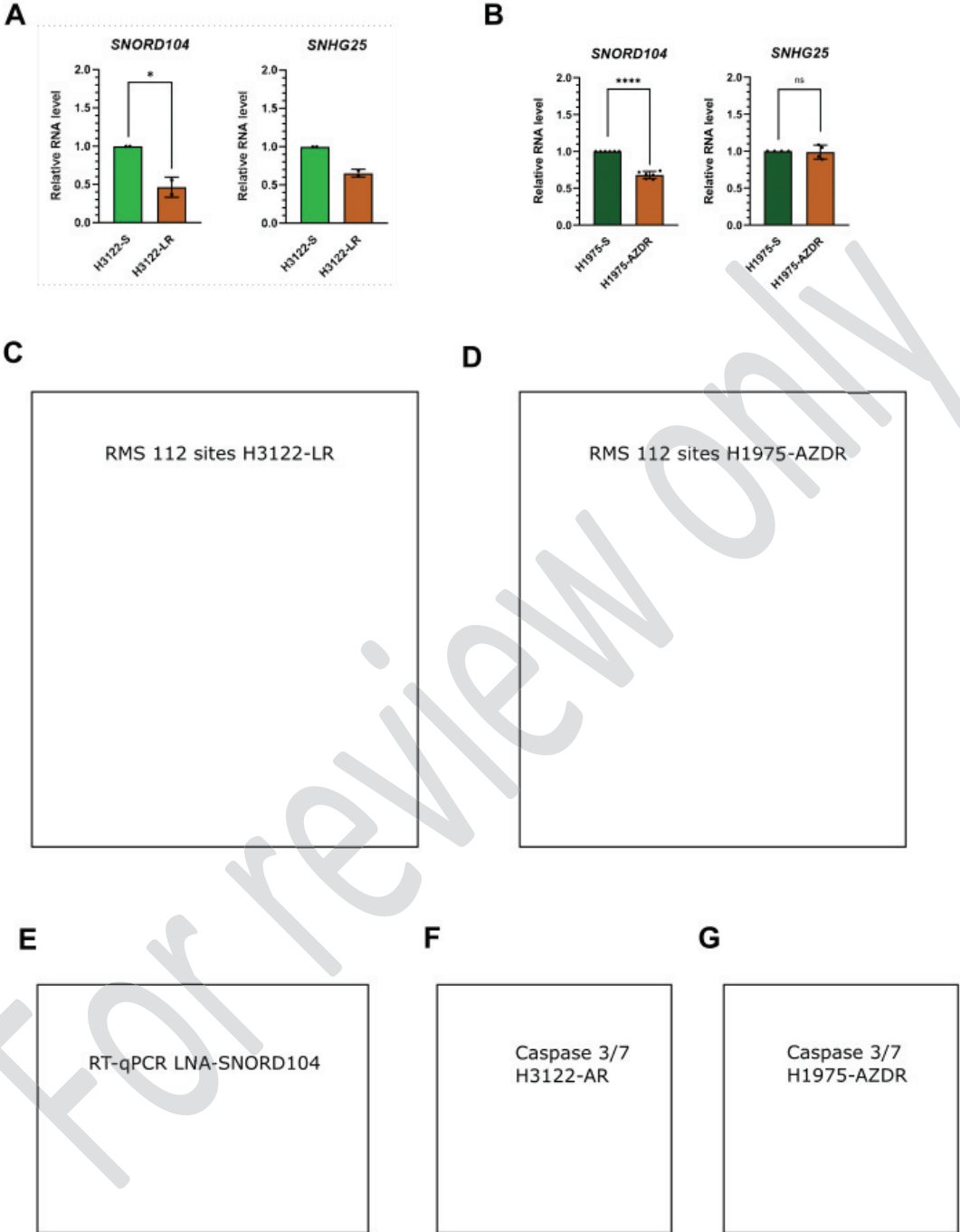
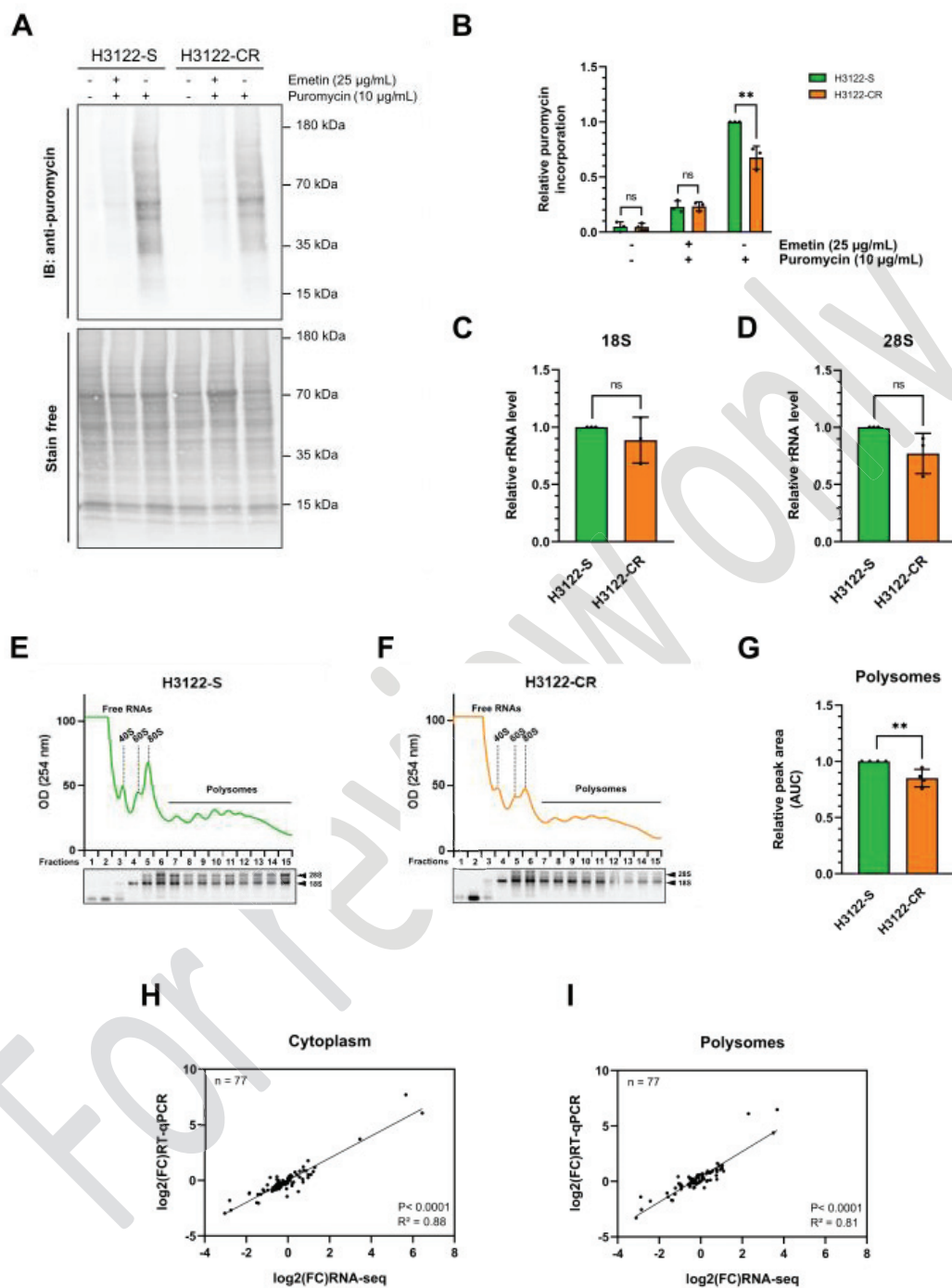


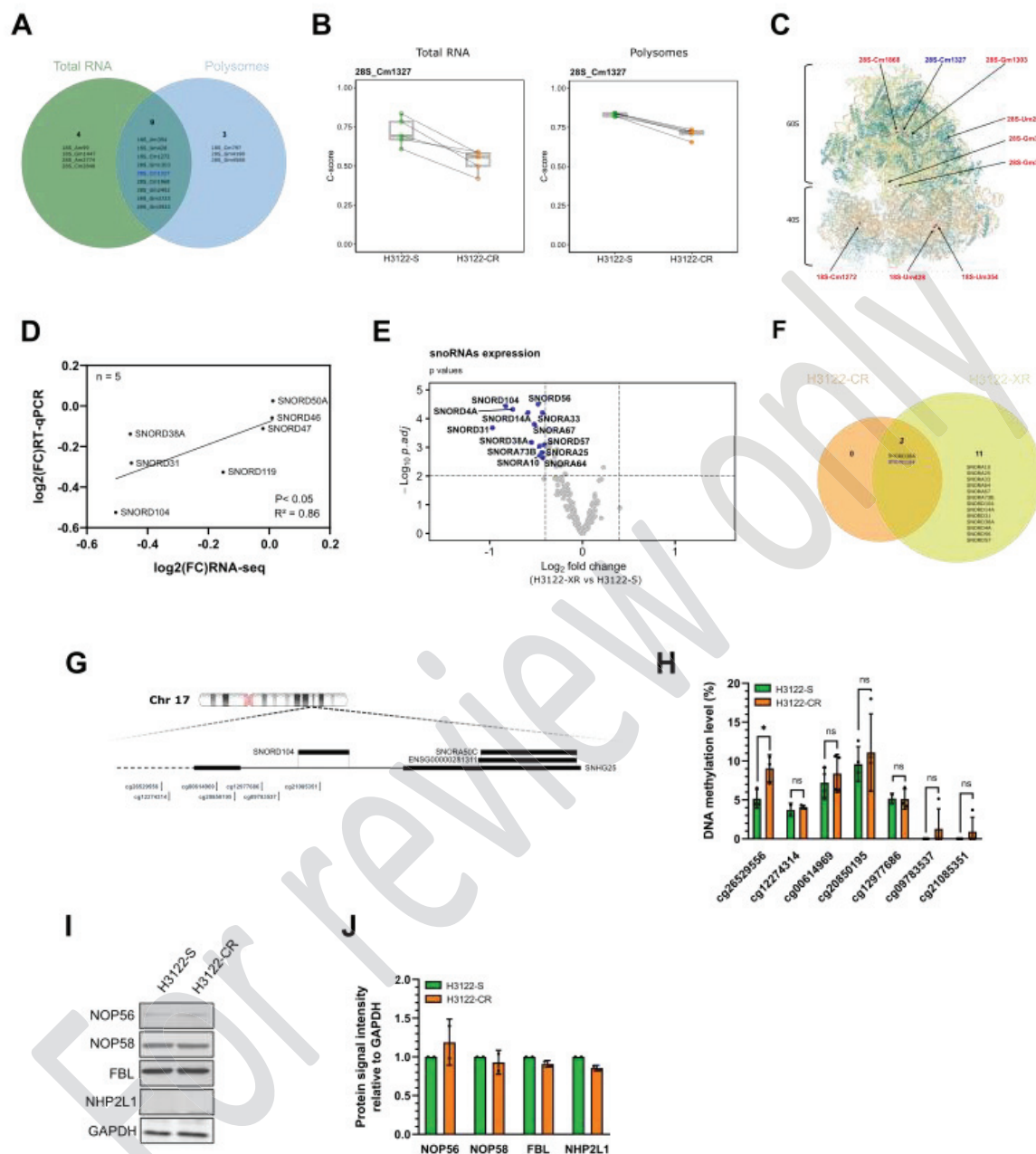
Figure 7



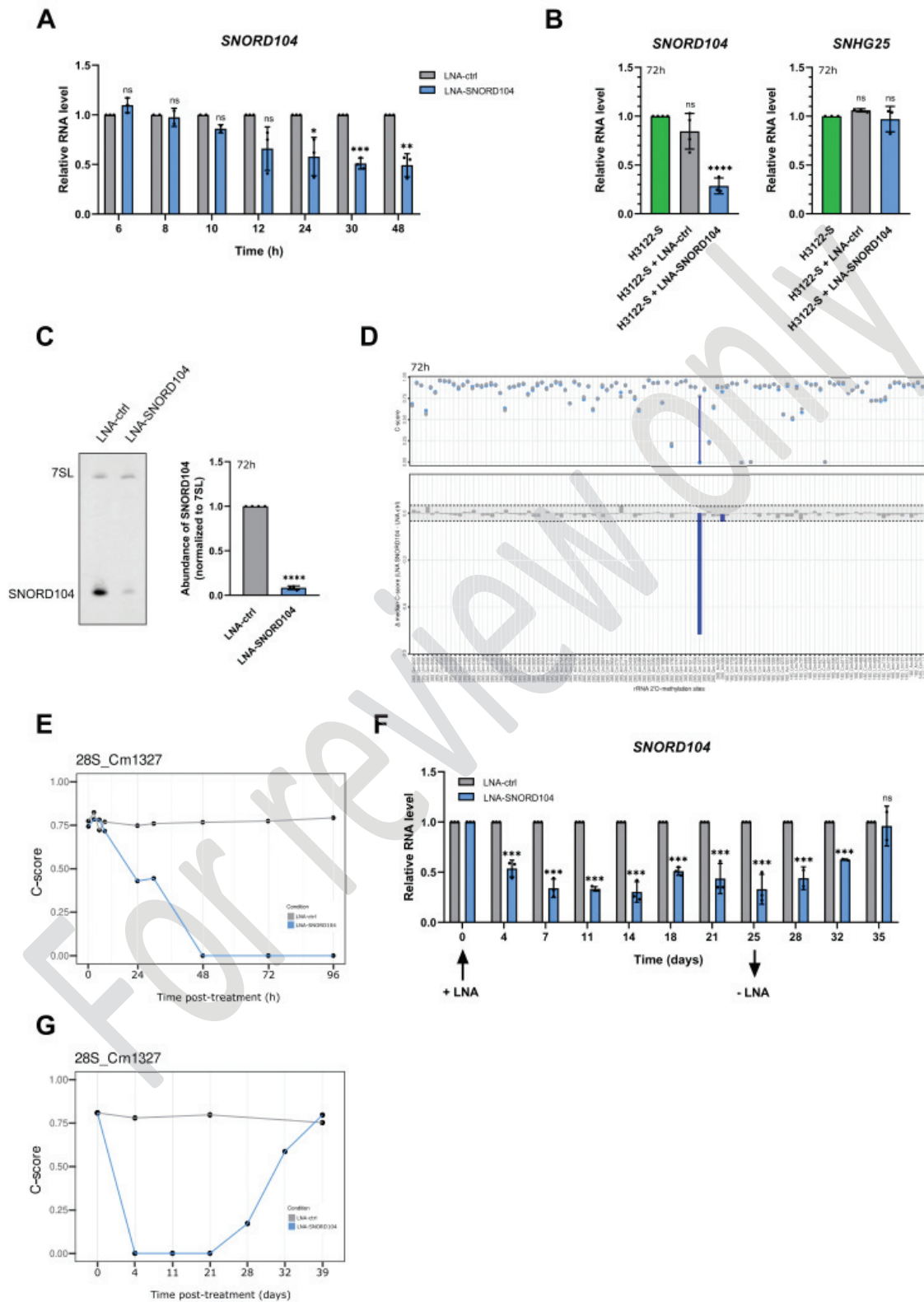
Supplementary Figure 1



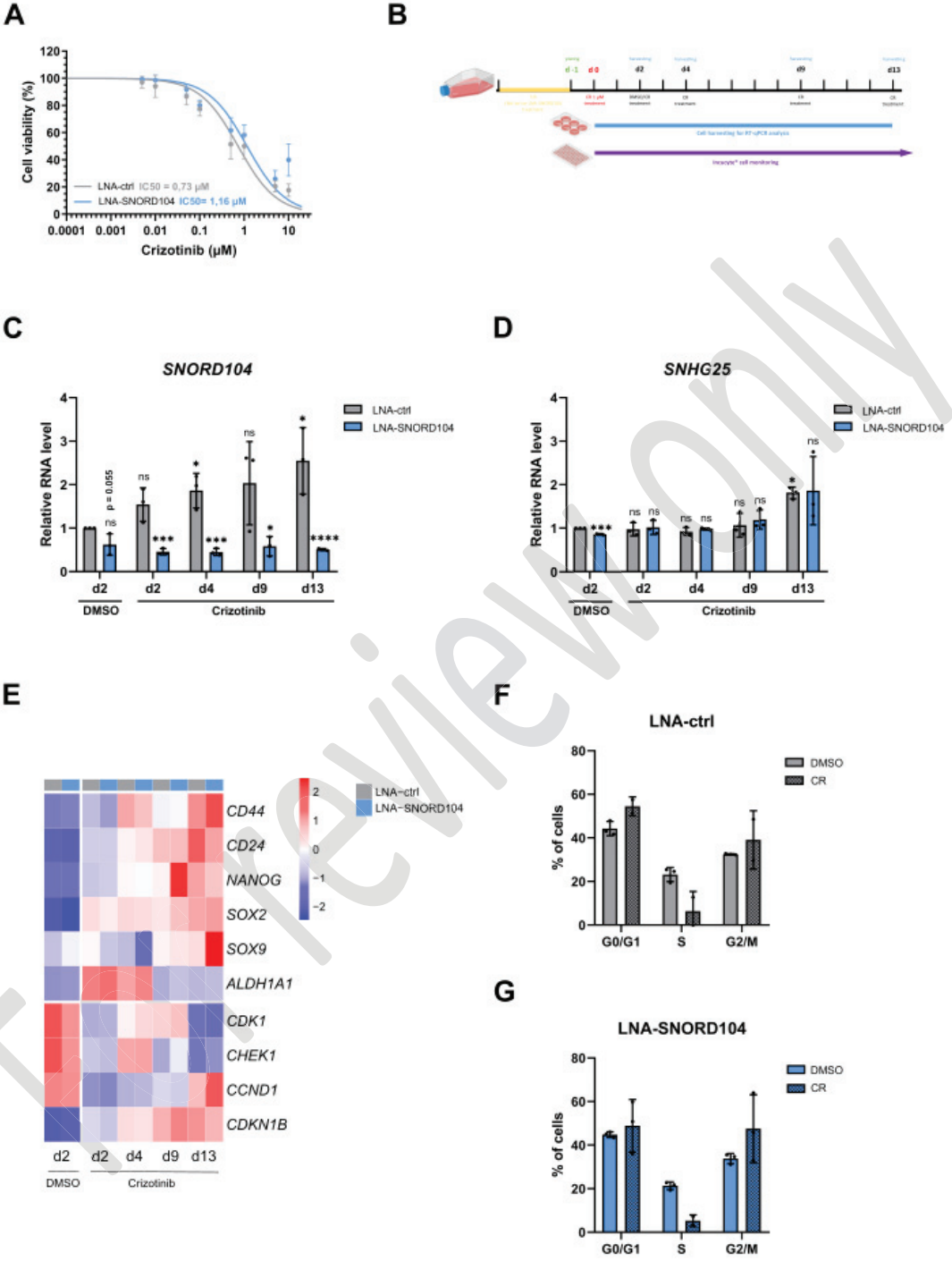
Supplementary Figure 2



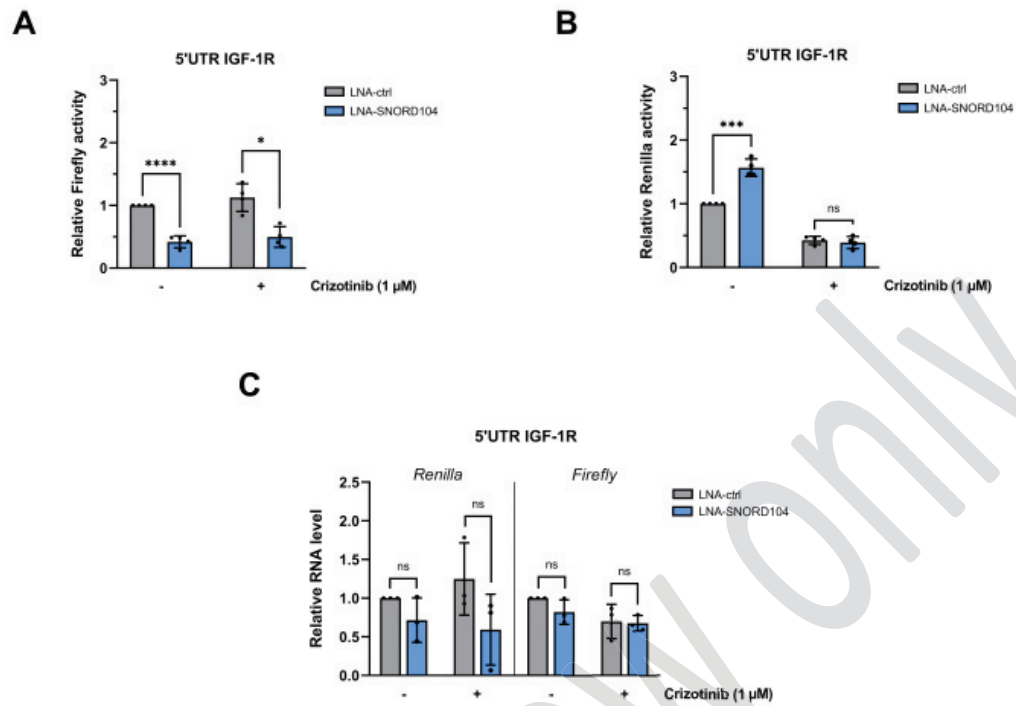
Supplementary Figure 3



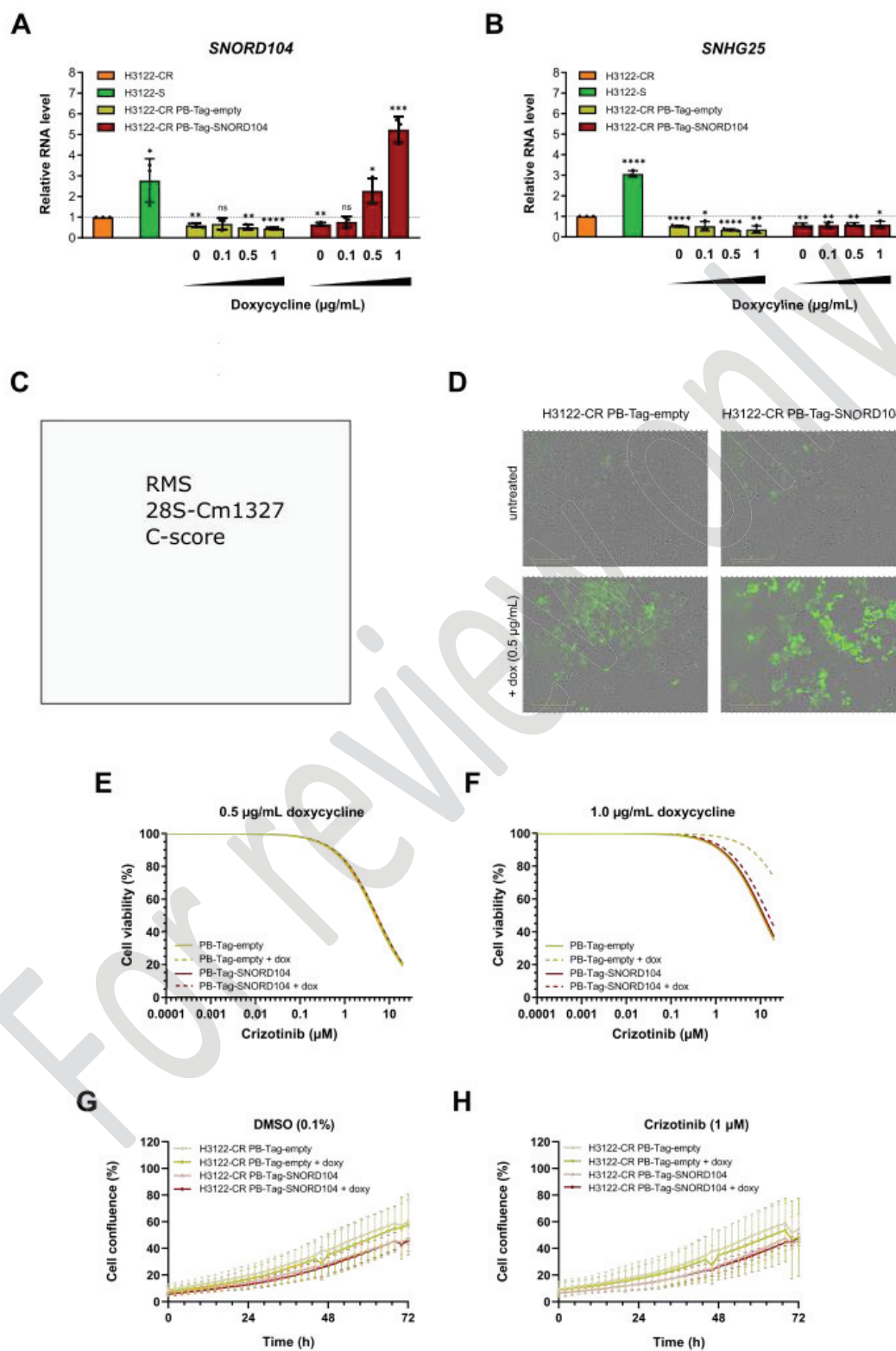
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



3. Rapport d'activité : 5^{ème} Symposium International du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)

Ce manuscrit dont je suis autrice en 8^{ème} position a été publié en 2023 dans le journal Bulletin du Cancer. Le manuscrit est inclus à la suite de cette introduction et correspond à un compte-rendu du Symposium International organisé tous les 2 ans par le CRCL.

a. Contexte

Le 5^{ème} Symposium International du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon s'est tenu du 2 au 4 Novembre 2022 au Centre des Congrès de Lyon. Cet évènement, réunissant plus de 600 personnes dont plusieurs Prix Nobel, a mis l'accent sur la complexité du processus tumoral, au travers de la régulation de l'expression génique et la dynamique d'interaction des cellules tumorales entre elles et avec leur environnement. Cette édition a également permis la réflexion sur les approches thérapeutiques combinatoires, en réponse à cette complexité tumorale.

b. Résultats principaux

Ce 5^{ème} Symposium International du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon a été divisé en 4 sessions de conférences.

La première session traitait de l'expression génique et sa régulation, ainsi que de la problématique de résistance aux thérapies permettant le ciblage spécifique de certaines étapes de l'expression génique. Dans un premier temps, Michael D. Taylor et Laurent Le Cam ont présenté, respectivement, leurs travaux sur les altérations génétiques de CBFA dans le médulloblastome et de p53 chez la souris. Stéphane Vagner, Virginie Marcel et Célio Pouponnot ont ensuite traité de l'apport de l'épitranscriptomique et de la régulation traductionnelle dans la compréhension des mécanismes d'oncogenèse. De plus, différentes perspectives thérapeutiques ont été soulevées dans les domaines de la régulation traductionnelle (Célio Pouponnot), de l'épigénétique (Mirjam Zeisel) et des récepteurs à dépendance (Patrick Mehlen). Enfin, Jacob Househam et Eduard Batle ont apporté leur regard sur l'initiation et la plasticité des cellules cancéreuses.

La deuxième session portait sur le lien entre système immunitaire et cellules cancéreuses. Ewout Landeloos, Julie Caramel et Mathilde Ruggiu ont présentés leurs travaux sur l'effet bénéfique des traitements anti-PD-1 sur le microenvironnement des ganglions lymphatiques drainant les tumeurs. Par ailleurs, Niels Halama et Anaïs Eberhardt ont abordé le rôle des cellules Natural Killer (NK) dans l'immunité anti-tumorale. Enfin, Garry Nolan a présenté les apports de l'utilisation de l'imagerie tissulaire multiplexée CODEX associée à des algorithmes d'apprentissage pour le développement d'immunothérapies spécifiques pour les cancers dont le taux de réponse aux immunothérapies classiques est faible.

La troisième session de conférence s'est penchée sur les mécanismes de mort cellulaire dans les cancers. Les dernières découvertes concernant les mécanismes de l'apoptose, la nécroptose et la mort lysosomale ont été présentées respectivement par Lisa Frydman, Ruby Alonso Ramirez et Kathrin Weber. Le rôle de la libération de l'ADN mitochondrial dans la mort cellulaire indépendante des caspases a été présenté par Stephen Tait et Julien Prudent. Le rôle de la mitochondrie a également été souligné dans la pyroptose par Heidi McBride. Enfin, l'impact de la mort cellulaire induite par les thérapies dans l'activation du système immunitaire a été présenté par Guido Kroemer.

La quatrième et dernière session portait sur la plasticité et le microenvironnement dans le cancer. L'impact des contraintes physiques et de composition de la matrice extracellulaire sur le comportement des cellules tumorales ont été soulevés par Jing Yang et Julien Ablain dans différents contextes cellulaires. De plus, les rôles du système immunitaire et des cytokines circulantes ont été discutés respectivement par Marion Guérin et Julie Pannequin. Enfin, la régulation intracellulaire des phénomènes de plasticité a été présentée par Cédric Blanpain (plasticité EMT) et Fabrice Laval (reprogrammation cellulaire).

c. Ma contribution

J'ai participé à la rédaction de la partie traitant de la quatrième session de présentations. Ainsi, j'ai participé, en collaboration avec mes co-auteurs, à la prise de note et la rédaction des différentes versions de cette partie du manuscrit.

d. Manuscrit

Actualités en recherche en oncologie : l'essentiel du 5^{eme} Symposium International 2022 du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Marie Alexandra Albaret¹, Eliezer Aimontché¹, Nathalie Bendriss-Vermare¹, Jean-Jacques Diaz¹, Clara Gil¹, Jordan Hedjam¹, Gabriel Ichim¹, Chloé Morin¹, Nour-El-Houda Mourksi¹, Trang Thi Minh Nguyen¹, Valentin Picant¹, Emilie Picard¹, Nikolay Popgeorgiev¹, Franck Tirode¹, Hélène Vanacker¹, Alain Puisieux², Patrick Mehlen¹

¹UnivLyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon-Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 rue Laennec, Lyon, France

²Institut Curie, 73 rue Claude Bernard, Paris 5^{eme} arrondissement, France

Le 5^e Symposium International du CRCL (UMR Inserm 1052 - CNRS 5286 - UCBL - CLB) s'est déroulé au Centre de Congrès de Lyon du 2 au 4 novembre 2022 et a réuni plus de 600 participants. L'événement, qui a vocation à rassembler les chercheurs, cliniciens et industriels intéressés par les dernières avancées de la recherche en cancérologie, était organisé autour de quatre sessions plénières et de conférences principales données par de prestigieux conférenciers invités qu'ont été Elaine Fuchs, Scott W. Lowe et William G. Kaelin, prix nobel de physiologie ou médecine 2019. Cette édition a mis en avant la notion d'intégration de la complexité du processus tumoral depuis l'intégration moléculaire des différents niveaux de l'expression génique (génomique, épigénétique, contrôle transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel et métabolisme) jusqu'à l'intégration cellulaire et tissulaire de la dynamique d'interactions des cellules cancéreuses et de son environnement. Tenant compte de cette complexité, l'implication d'approches thérapeutiques combinatoires a été exposé dans cette édition. Retour sur les communications des quatre sessions plénières.

Session 1 - De l'ADN à la protéine dans le cancer

Hélène Vanacker, Nour-El-Houda Mourski, Jordan Hedjam, Franck Tirode, Jean-Jacques Diaz

L'ADN constitue le support de l'information génétique contenu dans chaque cellule. L'expression des gènes ou génotype se dévoile alors par le phénotype de la cellule qui lui confère ses caractéristiques propres ainsi que ces fonctions biologiques. Ce processus d'expression génique se déroule en de multiples étapes. Chacune de ces étapes est finement régulée pour adapter l'expression génique tout au long de la vie de la cellule. Ainsi des mécanismes moléculaires complexes, faisant intervenir de nombreux facteurs, entrent en jeu à chaque niveau de l'expression génique. La pertinence du ciblage de certains de ces facteurs n'est plus à démontrer pour développer des thérapies anti-cancer efficaces. Toutefois, pour contourner les limites des thérapies existantes, comme l'échappement progressif aux traitements, et développer des stratégies innovantes basées sur des étapes de l'expression génique encore peu explorées en oncologie, il est nécessaire de déterminer dans quelle mesure les altérations identifiées perturbent l'expression géniques et participent à l'initiation de la pathologie cancéreuse, de son évolution et de son échappement aux thérapies anti-cancer. Lors de cette session, plusieurs altérations intervenant dans les différentes étapes de l'expression génique et identifiées dans diverses tumeurs ont été discutées.

Au cours du développement embryonnaire, les cellules constituant le système nerveux central évoluent constamment, spatialement et temporellement, grâce à des régulations précises de l'expression de certains gènes au niveau transcriptionnel. Cette versatilité complexifie l'étude du développement du cerveau et rend difficile la compréhension de l'origine des tumeurs embryonnaires cérébrales. Le medulloblastome (MB) est un cancer pédiatrique du cervelet catégorisé en quatre sous-groupes : Wnt, Shh, groupe 3 et groupe 4. C'est à ce dernier groupe, qui est le moins bien décrit même s'il s'agit de celui présentant la plus grande prévalence (40% environ des MB), que s'est intéressé le Dr **Michael D. Taylor** (Université de Toronto, Canada). En étudiant par séquençage ADN le statut mutationnel de 326 tumeurs MB de groupe 4, son équipe a identifié dans la majorité des cas des mutations ciblant le complexe CBFA (« core binding factor alpha ») incluant les co-represseurs transcriptionnels CBFA2T2 et CBFA2T3¹. Bien que le rôle précis du complexe CBFA dans le développement embryonnaire ne soit pas connu, l'équipe a révélé que CBFA2T2 est spécifiquement exprimé dans les cellules progénitrices humaines de la zone subventriculaire de la lèvre rhombique (RL^{SVZ}) du cervelet indiquant l'origine cellulaire potentielle du MB. De façon intéressante ce motif n'a pas été retrouvé chez la souris ni chez le macaque ce qui suggère une prédisposition évolutive chez l'humain au développement de MB. **Michael D. Taylor** propose alors de prévenir l'apparition de MB chez le nouveau-né en détectant par imagerie les lésions pré-tumorales du RL^{SVZ}. Ces travaux ont ainsi permis de mettre en évidence que des altérations génétiques du complexe CBFA entraîne un défaut de la différenciation de la région RL^{SVZ} du cervelet lors du développement embryonnaire à l'origine du MB de groupe 4, la forme la plus commune.

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur *TP53* n'est plus à présenter en oncologie comme l'atteste la myriade d'études décryptant les mécanismes moléculaires impliquant la protéine p53 dans la survenue des nombreux cancers. Les travaux de de **Laurent LE CAM** (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, France) s'inscrivent dans les études récentes qui visent à comprendre la fonction de p53 dans le métabolisme². Pour cela, son équipe a généré des modèles murins arborant diverses mutations de p53 seules ou associées à des mutations de facteurs de la voie p53 (MDM4, MDM2, E4F1). L'intégration des résultats obtenus par différentes approches à haut débit (transcriptomique, protéomique et exométabolomique) a permis d'établir une carte du réseau d'interaction de p53 avec les acteurs du métabolisme. Ainsi, un lien étroit entre p53 et le métabolisme du cholestérol et des acides gras a, entre autres, pu être mis en évidence³ et que, **Laurent LE CAM** replace dans le contexte du rôle concomitant de p53 et de E4F1 dans la régulation du métabolisme du pyruvate, grâce à des démonstrations *in vitro* mais aussi *in vivo* chez la souris. Ainsi, E4F1 et p53 contrôlent l'activité de la pyruvate déshydrogénase et de la pyruvate carboxylase ce qui assure le maintien d'un métabolisme mitochondrial adéquat. En outre, une adaptation du métabolisme a été observé dans des lignées de carcinomes hépatocellulaires déficientes en p53 et dont le réseau métabolique est altéré. Ces travaux sont d'un enjeu majeur car elles ouvrent la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques sur la base du réseau métabolique sous le contrôle de p53.

La traduction des ARNm par le ribosome est l'une des étapes ultimes de l'expression génique et peut être dorénavant considéré comme une « hallmark » du cancer, comme l'a souligné **Virginie Marcel** (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France) lors de sa présentation du rôle des ribosomes dans le cancer. Longtemps considéré comme simple effecteur de la synthèse protéique, le ribosome apparaît maintenant comme un régulateur de la traduction via des modifications chimiques

des ARN ribosomiques (ARNr) qui le composent. Parmi ces modifications, la 2'O-méthylation (2'Ome) des ARNr est la plus abondante et son altération dans les cancers serait à l'origine de ribosomes modifiés qui présentent des fonctions altérées. Le développement de la technologie appelée RiboMethSeq, qui permet d'évaluer le taux de méthylation des ARNr pour chacune de la centaine de positions apte à être méthylée, a favorisé les découvertes sur la fonction de la 2'Ome. Sur la base de cette technologie, les travaux conduits par **Virginie Marcel** ont montré, d'une part l'existence d'une hétérogénéité de la 2'Ome des ribosomes dans les cancers du sein et les gliomes et, d'autre part que cette variabilité affecte directement l'activité traductionnelle des ribosomes qui traduisent préférentiellement certains ARNm^{4,5,6,7}. Un autre exemple a été présenté dans le contexte de la résistance aux thérapies ciblées dans le cancer du poumon : en effet, la modulation de la 2'Ome à un site particulier a pour conséquence une modulation de la traduction lors du traitement qui est associée à la résistance à celui-ci. Ainsi, le ribosome est maintenant perçu comme un acteur important de la régulation épitranscriptomique de la traduction et également comme une cible thérapeutique innovante offrant de nouvelles promesses dans le traitement des cancers.

D'intenses recherches sont actuellement en cours pour décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents à la formation des cellules qui échappent aux traitements anti-cancer. Les recherches présentées par **Stéphan Vagner** (Institut Curie, France) s'inscrivent dans un champ de la biologie du cancer en plein essor qui consiste à étudier la contribution des mécanismes non-génomiques dans l'échappement thérapeutique. Ces mécanismes conduisent à l'apparition de cellules difficilement détectables au début du traitement et désignées comme cellules 'persistantes'. En s'intéressant au complexe eIF4F, **Stéphan Vagner** a mis en évidence que la régulation épitranscriptomique de la traduction contribuait à l'acquisition de mutations des cellules persistantes. Il a montré que les cellules persistantes traduisaient de façon préférentielle des ARNm présentant une N⁶-méthyladénosine (m⁶A) dans leur 5'UTR et que cette sélectivité de traduction était abolie par l'inhibition d'eIF4A (composant d'eIF4F). Parmi les ARNm préférentiellement traduits figurait celui de 53BP1, une protéine impliquée dans le mécanisme de réparation des cassures double-brin NHEJ, dont l'expression est augmentée dans les cellules persistantes. Au terme de sa présentation, **Stéphan Vagner** a proposé un modèle selon lequel une modification épitranscriptomique modifie la spécificité de la traduction, favorisant un mécanisme de réparation de l'ADN spécifique augmentant ainsi la mutabilité des cellules persistantes.

Un autre modèle de réponse cellulaire au stress a été présenté par **Célio Pouponnot** (Institut Curie, France). Ce dernier nous a présenté ses travaux sur le rôle d'un autre facteur d'initiation de la traduction, eIF2 α , dans la réponse au stress du reticulum endoplasmique (RE) appelé UPR pour « Unfolded Protein Response ». Ses travaux ont contribué à la compréhension du rôle de la protéine HSPA5 dans le groupe 3 (G3) du médulloblastome dans lequel elle est surexprimée, sous-type considéré de faible pronostic. En absence de stress du RE, HSPA5 inhibe la voie de l'UPR et lorsque le stress du RE survient, HSPA5 est délocalisée permettant ainsi la réponse UPR. Cette réponse repose notamment sur la phosphorylation d'eIF2 α , un évènement clé permettant l'inhibition de la traduction globale. Un « knock-down » de HSPA5 dans le G3 du médulloblastome induit une baisse de la viabilité *in vitro* et retarde la croissance tumorale *in vivo*. **Célio Pouponnot** a identifié que la voie PERK de l'UPR était l'effecteur de cette mort par la phosphorylation d'eIF2 α . De façon intéressante, le « knock-down » de la phosphatase PPR15B (CreP), dont la surexpression est de mauvais pronostic, réduit la viabilité *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*. Ainsi, **Célio Pouponnot** a illustré que les cellules du

G3 du médulloblastome sont sensibles à la sur-activation de l'UPR, faisant de la phosphorylation d'eIF2 α et de ses phosphatases de futurs acteurs d'intérêt dans la recherche thérapeutique.

La présentation réalisée par **Mirjam Zeisel** (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France) a porté sur le rôle des enzymes EZH2 et OGT dans les carcinomes hépatocellulaires (HCC). Ses travaux ont illustré l'importance de ces deux protéines dans la modulation épigénétique de gènes impliqués dans différentes voies associées au cancer. EZH2 et OGT sont par exemple recrutées au promoteur d'*ID1* (impliqué dans la prolifération des cellules d'HCC) où elles activent directement sa transcription. Plus particulièrement, l'absence d'OGT réduit la présence d'EZH2 au promoteur d'*ID1*, suggérant un rôle d'OGT dans la localisation d'EZH2. En montrant l'interaction entre ces deux protéines dans le contexte des HCC les travaux de **Mirjam Zeisel** apportent une nouvelle opportunité de ciblage thérapeutique combiné pour ce mécanisme moléculaire qui avait également été identifiée dans d'autres modèles de cancers.

Patrick Mehlen (Directeur du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France) a présenté la trajectoire de ses recherches sur netrin-1 et la voie des récepteurs à dépendance, depuis la description de leur mécanisme jusqu'à leur ciblage thérapeutique en oncologie. Les récepteurs à dépendance sont une famille de récepteurs membranaires dont la spécificité est qu'en absence de ligand, ils induisent la mort cellulaire, via la formation de complexes induisant l'activation des caspases. L'équipe de **Patrick Mehlen** a montré que netrin-1, une molécule initialement impliquée dans le guidage axonal au cours du développement embryonnaire⁸, est un ligand des récepteurs à dépendances DCC et UNC5B. DCC et UNC5B ont été démontré comme des suppresseurs de tumeurs via leur activité pro-apoptotique et en conséquence netrin-1 est trouvée surexprimée dans la majorité des cancers comme un mécanisme qui promeut la tumorigénèse. Un anticorps monoclonal humanisé ciblant netrin-1, le NP137, a pu être développé, constituant le premier traitement ciblant un couple ligand/récepteur à dépendance. En pré-clinique, NP137 a montré son efficacité sur lignées cellulaires et son innocuité dans des modèles murins et simiens, expliquée par l'absence d'expression de netrin-1 dans les tissus sains adultes⁹. Les résultats de la première administration du NP137 chez l'homme, lors d'un essai clinique de phase 1 incluant 48 patients atteints de cancers métastatiques réfractaires, a montré une très bonne tolérance du NP137 sans toxicité limitante. Cet essai a également fait la preuve du concept de réponse anticancéreuse au ciblage de netrine-1 chez deux patientes : deux réponses objectives chez une patiente atteinte de carcinome endométrial et une patiente atteinte de carcinome épidermoïde du col utérin¹⁰. L'analyse de biopsies avant et sous traitement, en transcriptomique spatiale, a confirmé les analyses pré-cliniques démontrant que le blocage de netrin-1 conduit à une diminution du nombre de cellules cancéreuses et à une transition vers un phénotype plus épithélial. L'EMT étant impliqué dans la résistance aux traitements par chimiothérapie et par immunothérapie, des essais de phase II combinant le NP137 avec une chimiothérapie et/ou une immunothérapie sont en cours. Le plus avancé d'entre eux est un essai de phase II à 4 bras (NCT04652076) dédiés aux cancers gynécologiques, qui a confirmé la bonne tolérance de ces combinaisons et dont les analyses d'efficacité seront réalisées prochainement.

Jacob Househam (The Institute of Cancer Research, Royaume Uni) a présenté ses travaux sur la plasticité phénotypique dans le cancer colorectal. Les contributions respectives des variations génétiques, épigénétiques et transcriptionnelle dans l'hétérogénéité intra tumorale et dans l'évolution tumorale restent mal connues, notamment dans le cancer colorectal où les principales mutations pilotes sont connues pour être précoces et clonales. Afin de mieux comprendre l'hétérogénéité intra-

tumorale, des profils d'expression spatialisés multi-régions appariés à des analyses génomiques (séquençage du génome entier), épigénomiques (ATAC-seq; identification des régions chromatiniennes ouvertes) et transcriptomiques ont été réalisés. Ces analyses spatialisées ont été couplées à une modélisation informatique pour caractériser l'inférence de l'évolution phylogénique de l'hétérogénéité phénotypique. Au total, l'analyse de 297 biopsies différentes provenant de 27 cancers colorectaux, a montré que les variations génomiques étaient peu impliquées dans les variations d'expressions des différents clones. Les expressions géniques montraient une forte variabilité inter- et intra-tumeur et étaient cohérentes avec les classifications antérieures. Les altérations génétiques, souvent clonales, semblaient être sans grande conséquences phénotypiques alors que les plasticités transcriptomique et épigénétique seraient déterminantes. Ainsi, certaines altérations génétiques sous-clonales n'apparaîtraient pas par sélection, ni ne seraient nécessairement à l'origine d'une variation phénotypique. Seule une petite proportion des variations transcriptomiques (<1% gènes <5% des voies) seraient transmises au long de l'évolution tumorale. Les résultats présentés ont été récemment publiés dans Nature s'agissant du rapport entre plasticité phénotypique et génétique ¹¹ ainsi que des variations épigénétiques ¹².

Eduard Batlle (Institut de Recherche en Biomédecine, Espagne), a présenté des analyses sur les mécanismes d'initiation et de progression des carcinomes colorectaux. Comme précédemment mentionné, les altérations génétiques (mutations d'APC, p53, KRAS) étant précoces dans les cancers colorectaux, les mécanismes permettant la dissémination métastatique ne sont pas clairement établis. Afin de comprendre les mécanismes conduisant au développement de métastases, des analyses transcriptomiques sur cellule unique ont été réalisées sur des tumeurs primitives opérées et leurs métastases. Un ensemble de 2530 gènes associé aux métastases a été identifié dont la majorité seraient surexprimés dans les cellules du microenvironnement, en particulier par des fibroblastes. Un certain nombre de gènes épithéliaux surexprimés proviendraient d'une sous-population cellulaire précise, dite de haute-récidive (HRCs), et qui s'avère distincte des cellules souches cancéreuse LGR5+ communément incriminées dans le processus de récurrence. Ces HRCs expriment en particulier la protéine *EMP1* (epithelial membrane protein 1), dont l'inhibition dans des modèles murins diminue la rechute métastatique a fortiori lorsque l'inhibition est précoce, avant la chirurgie. Enfin, l'évolution dynamique des micro-métastases riches en HRCs vers une exclusion progressive des lymphocytes T a été montrée, ainsi que l'efficacité d'une immunothérapie néo-adjuvante (anti CTLA4 et PD1) chez des souris porteuses de tumeurs colorectales sans instabilité micro-satellitaires. L'ensemble de ces résultats caractérisant les HRCs dans les cancers colorectaux a été publié dans Nature en novembre 2022 ¹³.

Session 2 -Immunologie et cancer

Emilie Picard, Valentin Picant, Nathalie Bendriss-Vermare

Le succès récent des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire des lymphocytes T, comme les anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1, reste limité à certains patients et certains cancers. Il est important d'identifier les mécanismes de résistance et des biomarqueurs de réponse aux immunothérapies actuelles, mais également de nouvelles cibles potentielles au-delà des lymphocytes T, pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques agissant en synergie. Cette session a été grandement consacrée à l'immunothérapie du cancer, abordant une nouvelle dimension préventive et un intérêt croissant pour le ciblage des cellules de l'immunité innée, et soulignant que le

succès de l'approche repose fortement sur la connaissance des mécanismes d'immunosurveillance, d'évasion immunitaire, de résistance aux traitements et de la complexité cellulaire et spatiale du microenvironnement tumoral.

Une perte récurrente du nombre de copies (CN) du génome, à un ou plus de sept loci chromosomiques, notamment les loci 3p et 9p, au stade précancer serait associée à un risque accru de cancer invasif. Déterminer si ces pertes de CN sont des marqueurs non spécifiques de l'instabilité chromosomique ou si des altérations spécifiques des CN sont impliquées dans la progression tumorale est un objectif poursuivi par **Scott Lippman** (Moore's Cancer Center, University of California, San Diego, USA) dans le contexte des cancers de la tête et du cou (HNSC) HPV^{négatif}. Alors que la perte de 3p semble être un marqueur de substitution de l'instabilité chromosomique ayant un impact direct limité sur l'évolution de la maladie, son équipe a découvert que la perte de 9p est de loin le facteur le plus important de la transition des CSNH d'un système immunitaire chaud à un système immunitaire froid pendant l'invasion et la progression du précancer. Grâce à une série d'études approfondies, impliquant des cohortes de patients et des lignées cellulaires, son groupe a identifié des déséquilibres 9p spécifiques qui entraînent des changements dans la composition des cellules immunitaires des tumeurs et qui, à leur tour, dictent la réactivité à l'immunothérapie. En accord avec les travaux de **Scott Lowe** présentés en ouverture de ce congrès ¹⁴, son équipe a montré que la perte de CN centrée sur 9p21.3 déclenchait des transitions immunitaires et invasives dans les lésions précancéreuses, caractérisées par la suppression intracellulaire de la sénescence, la suppression extracellulaire de la famille des chimiokines CXCL9/10 et un « switch » vers un phénotype d'évasion immunitaire (ou tumeurs froides) dans les HNSC HPV-négatifs, et était également associée à une résistance primaire aux anti-PD-1, dans le contexte de délétions 9p plus importantes centrées sur 9p21 ¹⁵. Ces résultats contribuent à répondre à un besoin médical majeur en matière d'immunothérapie de précision, et ont conduit au développement d'un test génomique prédictif dans la perspective d'une nouvelle approche thérapeutique, et potentiellement préventive.

Bien que les anticorps ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ont nettement amélioré le pronostic de patients atteints de mélanome avancé, ils n'en restent pas moins inefficaces dans plus de la moitié d'entre eux. L'identification de biomarqueurs prédictifs de réponse et l'élucidation des mécanismes de résistance, sont donc des enjeux majeurs aujourd'hui en immuno-oncologie. Les cellules cancéreuses de mélanomes sont douées d'une grande plasticité et sont particulièrement sensibles aux processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), leur conférant des propriétés métastatiques et de résistance aux traitements. **Ewout Landeloos** (VIB, Belgique) a présenté des résultats d'analyses transcriptomiques par RNA-seq sur cellule unique d'échantillons de tumeurs de patients atteints de mélanomes, avant et après traitement par anti-PD1. Cette étude a permis d'identifier plusieurs nouveaux états cellulaires de mélanome, en plus des états mélanocytaires (MITF^{fort}) et mésenchymateux (MITF^{faible}) décrits précédemment, illustrant une grande hétérogénéité intratumorale. L'utilisation de marqueurs tels que CDH19, S100A1, MITF et SOX10, a permis de démontrer l'existence de ces cellules *in situ* chez les patients par des approches d'immunohistochimie multiplex. Ce travail ¹⁶ a également permis d'identifier une forte expression de TCF4 dans les cellules de mélanome « mesenchymal-like », dont la présence est associée à la résistance au traitement anti-PD-1, ouvrant vers une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle combinant le ciblage de TCF4 et de PD-1. De façon intéressante, ces états transcriptionnels de mélanome ne découlent pas de la génétique mais dépendent du microenvironnement tumoral. En effet, leur diversité est retrouvée dans

des souris immunocompétentes, et limitée dans des souris immunodéficientes, suggérant un rôle majeur du système immunitaire dans l'émergence de cette plasticité cellulaire. Par ailleurs, une caractérisation approfondie du microenvironnement immunitaire tumoral a permis d'identifier 20 types de cellules immunitaires majeures dont le lien avec la résistance au traitement anti-PD-1 est en cours d'analyse. Des analyses complémentaires de séquençage VDJ et d'accessibilité de la chromatine (ATAC-seq), ainsi que de transcriptomique spatiale sont en cours pour caractériser en profondeur le microenvironnement des mélanomes avancés et sa dynamique lors d'un traitement anti-PD-1. En lien avec ce travail, un focus sur le rôle de ZEB1 au sein des cellules de mélanome sur l'infiltration immunitaire dans ces tumeurs et la réponse aux immunothérapies a été apporté par **Julie Caramel** (CRCL, France). ZEB1 est un facteur de transcription majeur de l'EMT régulant la plasticité des cellules de mélanome. Des analyses spatiales par immunofluorescence multiplex d'échantillons de mélanome humain ont montré qu'une expression élevée de ZEB1 dans les cellules tumorales est associée à une faible infiltration en lymphocytes T CD8+, indépendamment de l'activation de la voie β -caténine¹⁷. De plus, des expériences de gain ou de perte de fonction de ZEB1 dans des modèles syngéniques murins de mélanome ont montré que ZEB1 induit une évasion immunitaire des tumeurs en inhibant notamment la production de la chimiokine CXCL10, nécessaire au recrutement des lymphocytes T CD8+. La sur-expression de CXCL10 est capable de rétablir en partie l'infiltration des lymphocytes T CD8 et de contrôler la croissance des tumeurs sur-exprimant ZEB1. De plus, la sur-expression de ZEB1 favorise l'émergence de résistance aux anti-PD-1 *in vivo* tandis que le knock-out de ZEB1 dans les cellules de mélanome est capable de resensibiliser les tumeurs au traitement par anti-PD1. Ces résultats révèlent que ZEB1 pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique dans le mélanome métastatique. Un nouvel aspect original de la réponse aux anti-PD-1 a été abordé par **Mathilde Ruggiu** (Institut Pasteur Paris, France) en questionnant leur action sur les lymphocytes T CD8⁺ en périphérie et non dans les tumeurs. Dans un modèle murin d'adénocarcinome de colon, le ralentissement de la croissance tumorale induit par un anticorps anti-PD-1 s'accompagne du recrutement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la tumeur dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur, selon un processus dépendant des interférons de type I. De manière intéressante, l'effet thérapeutique de l'anti-PD-1 est en partie abrogé par injection concomitante de FTY720, connu pour empêcher les lymphocytes T de quitter les ganglions lymphatiques et de migrer vers les tissus périphériques. Le traitement anti-PD-1 induit *de novo* la mobilisation, la prolifération et l'activation de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la tumeur dans les ganglions drainants. Ces effets reposent sur une meilleure stabilisation des contacts entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques visualisée en microscopie par excitation à deux photons, et d'autre part par un changement de l'environnement cytokinique dans les ganglions lymphatiques, avec une augmentation de la production des ligands de CXCR3. Ces travaux démontrent que le traitement anti-PD-1 a des effets majeurs sur le microenvironnement des ganglions lymphatiques drainants la tumeur, promouvant la réponse anti-tumorale des lymphocytes T spécifiques de la tumeur, et contribuant très probablement à son activité thérapeutique.

Le ciblage des cellules de l'immunité innée a récemment émergé comme une stratégie thérapeutique intéressante, complémentaire aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire des lymphocytes T. Il existe notamment un enjeu majeur dans les cancers colorectaux (CRC) et du pancréas (PDAC), où les anti-PD-1/PD-L1 se sont révélés efficaces uniquement chez une faible proportion de patients qui présentent des tumeurs avec une instabilité microsatellitaire (MSI) (15% et 1-2% des patients CRC et PDAC respectivement). Ces tumeurs sont caractérisées par un fort infiltrat en lymphocytes T et une charge importante en néoantigènes, contrairement aux tumeurs à

microsatellites stables (MSS). Dans ce contexte, **Niels Halama** (DKFZ, Centre allemand de recherche sur le cancer, Allemagne) a proposé de moduler les macrophages, cellules de l'immunité innée, via l'inhibition des chimiokines inflammatoires immunosuppressives/protumorales CXCL12 et CCL5. L'essai clinique OPERA de phase I/II combinant NOX-A12, un inhibiteur de CXCL12, et le pembrolizumab (anti-PD-1) chez des patients atteints de CRC ou PDAC MSS métastatiques a montré des résultats encourageants (NCT03168139). En l'absence de toxicité, une stabilisation de la maladie a été observée chez 25% des patients et la majorité d'entre eux ont présenté un allongement de la durée du traitement par rapport à leur dernier traitement précédant leur inclusion dans cet essai clinique. Les réponses cliniques et biologique au sein du tissu sont associées à une signature cytokinique de type Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-16) en contexte d'inhibition de CXCL12 chez la moitié des participants. De plus, un faible taux de CXCL12 et un pourcentage élevé de cellules monocytiques CD11b+ CD14+ CD15+ dans la biopsie avant traitement prédisent la réponse au NOX-A12¹⁸. Sur la base d'un travail précédent montrant que l'inhibition de CCR5 conduit à la repolarisation anti-tumorale des macrophages dans les tumeurs et à des réponses objectives dans le CRC avancé¹⁹, l'étude LUMINESCENCE a été initiée pour évaluer la combinaison du Nivolumab (anti-PD-1), de l'Ipilimumab (anti-CTLA-4) et du Maraviroc (anti-rétroviral antagoniste de CCR5), chez des patients atteints de CRC ou PDAC MSS métastatique (NCT04721301). Les premiers résultats de cette étude clinique montrent des réponses favorables chez certains patients. Ces travaux démontrent que de nouvelles immunothérapies ciblant l'immunité innée peuvent être envisagées en combinaison avec les immunothérapies actuelles pour les patients porteurs de tumeurs MSS dans le CRC et le PDAC, qui étaient jusqu'alors restreintes aux tumeurs MSI. D'autres effecteurs de l'immunité innée, les cellules Natural Killer (NK), sont des cibles prometteuses dans le traitement des cancers en raison de leurs propriétés cytotoxiques et immunomodulatrices. Comprendre les mécanismes régulant leurs fonctions anti-tumorales est au cœur du travail présenté par **Anais Eberhardt** (CRCL, France) qui a mis en lumière le potentiel de l'interleukine (IL)-33, une alarmine de la famille des IL-1s se liant au récepteur ST2, à activer les cellules NK dans des contextes sains et tumoraux. L'expression de ST2 est acquise sur environ 20-30% des cellules NK issues de sang de donneurs sains en réponse à l'IL-12. Des analyses biologiques et transcriptomiques ont révélé un état unique des cellules NK ST2+ partageant des caractéristiques à la fois cellules NK canoniques CD56^{fort} et CD56^{interm}, cumulant ainsi des propriétés effectrices propres à chacune de ces sous-populations (sécrétion de cytokines inflammatoires et cytotoxicité) en réponse à la co-stimulation par IL-12 et IL-33. Par ailleurs, une sous-population de cellules NK présentes dans les tumeurs du sein exprime ST2 et produit de l'IFN- γ en réponse à la co-stimulation d'IL-12 et IL-33. Par ailleurs, la combinaison d'IL-12 et IL-33 exerce un effet thérapeutique *in vivo* dans un modèle murin de tumeur mammaire, menant à une diminution de la croissance tumorale et associé à une production systémique d'IFN- γ . Enfin, un score combinant une forte expression d'IL-33 et une forte infiltration en NK est corrélé à une augmentation de la survie des patients dans plusieurs cancers de la base du TCGA. Ces résultats identifient les cellules NK ST2+ comme des acteurs importants de l'immunité anti-tumorale, suggérant que l'IL-33 pourrait représenter un nouvel agent thérapeutique anti-cancer (*Eberhardt et al, en révision*).

L'immunothérapie a connu une progression fulgurante en cancérologie au cours de ces 15 dernières années, notamment en raison de l'explosion des connaissances fondamentales sur l'immunologie du cancer. En effet, cette maladie n'est plus considérée du seul point de vue de la tumeur, mais comme une maladie du microenvironnement tumoral englobant à la fois les cellules tumorales, stromales et immunitaires. Le succès des immunothérapies repose sur la connaissance du

microenvironnement tumoral et des mécanismes d'échappement immunitaires dans lesquels les cellules tumorales et immunitaires interagissent dans un réseau complexe. Comprendre l'architecture et l'organisation cellulaire au sein des tumeurs permettra de considérer la complexité biologique des tumeurs dans leur entièreté et d'exploiter leurs faiblesses au travers d'approches thérapeutiques innovantes. **Garry Nolan** (Ecole de médecine de l'université de Stanford, USA) nous a présenté une technologie de pointe d'imagerie tissulaire multiplexée appelée CODEX (CO-Detection by indEXing), développée dans son laboratoire²⁰. La nouvelle génération CODEX2 est une plateforme de cytométrie par imagerie de fluorescence sur tissu basée sur la détection d'anticorps conjugués à de l'ADN et révélés par une sonde fluorescente permettant le phénotypage en profondeur de tissus solides congelés ou fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine, à l'échelle de la cellule unique. L'avantage principal de cette approche est la capacité à détecter 50 à 100 marqueurs d'intérêt sur un seul et même tissu tout en conservant le contexte spatial des cellules analysées. Les larges bases de données multidimensionnelles issues de CODEX ont conduit au développement et à l'utilisation d'algorithmes d'apprentissage automatique (ou machine learning, intelligence artificielle) permettant d'interpréter et de définir des interactions cellulaires de voisinage des cellules immunitaires entre elles ou avec les cellules tumorales. De manière importante, CODEX permet de suivre l'évolution de ces interactions de voisinage au cours de la progression tumorale ou au cours de la réponse à l'immunothérapie dans un contexte de cancer. De telles informations permettront de développer des immunothérapies de plus en plus ciblées notamment dans les cancers pour lesquels les immunothérapies montrent peu, voire pas, de bénéfices cliniques à l'heure actuelle.

Session 3 -Mort cellulaire et cancer

Trang Thi Minh Nguyen, Clara Gil, Nikolay Popgeorgiev, Gabriel Ichim

La thérapie anticancéreuse reposant uniquement sur le déclenchement de l'apoptose a montré ses limites ces dernières années, avec plusieurs études montrant des effets pro-oncogènes de l'apoptose. Cette session a mis en lumière le besoin urgent de comprendre les effets pro-oncogéniques de l'apoptose afin de les éviter ou de les atténuer et de proposer d'autres types de mort cellulaire pour le traitement du cancer, tout en les caractérisant d'un point de vue moléculaire. Enfin, plusieurs travaux ont été exposés sur la façon dont la mort cellulaire peut induire une réponse immunitaire anticancéreuse efficace et des stratégies pour l'exploiter afin d'améliorer les traitements anticancéreux.

Stephen Tait (Institut des sciences du cancer, Université de Glasgow, Royaume-Uni) nous a exposé plusieurs travaux soutenant des idées provocatrices sur de nouvelles approches pour déclencher la mort des cellules cancéreuses en thérapie. Tout d'abord, il est possible de provoquer l'apoptose, tout en bloquant l'activation des caspases, déclenchant ainsi la mort cellulaire indépendante des caspases ou CICD. Comme publié par l'équipe de **Stephen Tait**, la mort CICD a un énorme avantage sur l'apoptose car elle est très immunogène et a un effet de vaccination contre les cellules cancéreuses. De plus, **Stephen Tait** étudie l'inflammation associée à la perméabilité de la membrane externe mitochondriale (MOMP) et si l'inflammation induite par le MOMP a aussi une fonction non canonique. Dans le contexte de la sénescence, il est montré que les cellules sénescents ont des quantités élevées d'ADN mitochondrial (ADNmt) cytosolique, qui sous-tend le phénotype sécrétoire associé à la sénescence encore appelé SASP. Il est intéressant de noter que l'ADNmt est

libéré à la suite d'un phénomène minoritaire de MOMP, qui correspond à la perméabilisation d'un petit nombre de mitochondries, ce qui entraîne une inflammation. *In vivo*, la suppression des protéines pro-apoptotiques BAX et de BAK limite la génération de SASP mais pas l'induction de sénescence dans le foie des souris irradiées.

RIPK3 est une protéine essentielle de la voie de mort cellulaire nécroptotique. Cependant, dans certains contextes, l'activation de RIPK3 déclenche l'apoptose. Le rôle de l'activation de RIPK3 dans le déclenchement de l'apoptose chez le lymphome à cellules B a été présenté par **Ruby Alonso Ramirez** (Institut Pasteur, France). Pour étudier la mort cellulaire liée à RIPK3, un système inductible et détectable d'oligomérisation de RIPK3, représentant la forme active de cette protéine, a été créé en utilisant le système FKBP/FRB fusionné avec un rapporteur fluorescent mCherry. Ce système permet d'induire et de suivre l'activation de RIPK3 *in vitro* et *in vivo* par l'introduction d'agent de dimérisation B/B. En utilisant ce système, **Ruby Alonso Ramirez** et ses collaborateurs ont démontré que l'activation de RIPK3 conduisait à l'apoptose des cellules pro-B d'une manière dépendante de la Caspase-8. De façon intéressante, l'activation de RIPK3 *in vivo* déclenche une apoptose rapide inhabituelle dans la population des cellules pro-B. En parallèle, l'apoptose liée à RIPK3 augmente l'infiltration des macrophages dans la tumeur. Cela introduit un effet immunitaire à long-terme contre les cellules cancéreuses chez les souris immunocompétentes, ce qui n'est pas observé chez les souris immunodéficientes. L'ensemble de ces données suggèrent que le voie RIPK3 pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans le lymphome à cellule B.

Les mitochondries participent à la régulation de différentes voies de mort cellulaire, au-delà de l'apoptose. Le lien entre les mitochondries et la pyroptose a été présenté par **Heidi McBride** (Institut neurologique de Montréal, Canada). L'équipe d'**Heidi McBride** s'intéresse à la protéine MAPL : une SUMO E3 ligase mitochondriale qui régule la fission mitochondriale. De façon intéressante la surexpression de MAPL, induit une mort cellulaire indépendante de Bax/Bak. Le criblage CRISPR a indiqué l'implication de la voie de la pyroptose, ce qui a ensuite été confirmé par l'invalidation de l'expression de MAPL grâce à des siRNA spécifiques et des tests fonctionnels. De plus, MAPL induit une libération ADNmt dépendante des protéines Miro1/2 sous forme de vésicules dérivées de mitochondries (VDM). Cette voie agit en amont du clivage de Gasdermins et de cGAS. En parallèle, le ADNmt est transporté vers les endolysosomes *via* VPS35. Par ailleurs, les données ont démontré que l'expression de MAPL induit des dommages aux endolysosomes, visualisés par le recrutement de Galactin-3, indiquant que l'ADNmt s'échappe dans le cytosol à travers les pores lysosomaux. L'expérience sur les cellules Rho-0 déficientes en mitochondries suggère que l'ADNmt est essentiel pour la mort cellulaire pyroptotique induite par MAPL. Cependant, l'arrivée de l'ADNmt dans l'endolysosome n'est pas nécessaire pour la rupture lysosomale. A partir de ces observations, un modèle de travail intéressant a été proposé : MAPL coordonne la plateforme de signalisation mitochondriale, qui régule la mort cellulaire pyroptotique et la mort immunitaire médiée par le lysosome.

Lisa Frydman (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France) a présenté ses recherches sur les mécanismes pro-apoptotiques induits par le récepteur à dépendance UNC5B. Ce récepteur est capable d'une double signalisation, en fonction de la présence ou de l'absence de son ligand, la Nétrine-1 : lorsqu'il est lié à la Nétrine-1, UNC5B favorise la survie, la différenciation ou la migration cellulaire; en l'absence de son ligand, UNC5B induit l'apoptose. Il est important de noter que la production de Nétrine-1 est souvent augmentée dans les cellules cancéreuses. Ainsi, cibler la

Nétrine-1 pour bloquer sa liaison à UNC5B et favoriser la signalisation apoptotique, apparaît comme une approche thérapeutique prometteuse actuellement testée en essais cliniques de phase II. Après un criblage CRISPR-Cas9 dans les cellules cancéreuses, l'équipe a découvert que l'apoptose déclenchée par l'absence du ligand sur son récepteur est dépendante de la protéine COMMD2 et du complexe Cullin-RING-ligase (CRL) E3 ubiquitine ligase. En outre, ils ont montré que CRL dégrade la protéine anti-apoptotique MCL-1 dans les cellules cancéreuses sur-exprimant UNC5B, induisant la voie intrinsèque de l'apoptose. Ces résultats ont permis d'imaginer une nouvelle stratégie thérapeutique, combinant l'interférence à la Nétrine-1 avec d'autres agents ciblant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont fait partie Mcl-1, et qui a fourni des résultats encourageants dans des études pré-cliniques.

Kathrin Weber (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France) nous a présenté ses travaux sur un type particulier de cancers pédiatriques, le neuroblastome, décrit comme résistant aux traitements qui induisent l'apoptose en raison de l'inactivation fréquente de la caspase-8. **Kathrin Weber** a démontré que l'activation du récepteur Toll-like 3 (TLR3) induit la mort de type lysosomale dans les cellules de neuroblastome, en contournant leur résistance à l'apoptose. En outre, l'équipe a découvert que l'activation de la protéine TLR3 entraîne l'augmentation de l'expression et le recrutement lysosomal de la protéine nécroptotique MLKL formant des pores, ce qui entraîne une perméabilité lysosomale. Dans l'ensemble ces données suggèrent que la mort de type lysosomale est un mécanisme par défaut dans les cellules cancéreuses où l'altération de la caspase-8 est un obstacle pour les thérapies classiques qui induisent l'apoptose.

Des études récentes montrent que les mitochondries, *via* la libération d'ADNmt, peuvent déclencher une réaction inflammatoire par l'activation de la voie cGAS/STING qui conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires. Néanmoins, le lien entre la fonction des mitochondries et l'induction de l'inflammation reste mal compris. À cet égard, **Julien Prudent** (Unité Biologie Mitochondriale à Cambridge, Royaume Uni) a présenté les travaux de son équipe de recherche sur l'implication de l'accumulation de fumarate et de l'inflammation. Des mutations de la fumarate hydrogénase 1 (Fh1), une enzyme du cycle de Krebs, conduisent à une accumulation de fumarate et prédisposent au cancer du rein. La délétion chronique de Fh1 conduit à l'activation de la voie cGAS/STING et à la production de cytokines. Pour étudier le rôle de Fh1, un modèle de souris knock-out conditionnel de Fh1 a été développé en utilisant le système Tamoxifen Cre-LoxP. En utilisant les cellules dérivées de cette souris knockout, il a démontré que la perte de Fh1 induit une accumulation de fumarate, conduisant ensuite à la libération d'ADNmt avant la réaction inflammatoire *in vitro*. Des expériences de microscopie de fluorescence à haute résolution suggèrent que les ADNmt sont libérés sous forme de vésicules dérivées de mitochondries (VDM) comportant la protéine de la matrice mitochondriale PDH et non la protéine de la membrane externe mitochondriale TOM20. La perte de l'expression Snx9, une protéine essentielle à la formation des VDM, bloque l'activation de la voie cGAS/STING et des gènes stimulés par l'interféron. Ceci confirme que les VDM participent activement à la libération de l'ADNmt dans le contexte de l'accumulation de fumarate. Ces résultats ont établi le lien entre la voie métabolique mitochondriale et le déclenchement de l'inflammation.

Il est maintenant bien établi qu'un effet anticancéreux durable dépend de l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par les thérapies. Dans ce contexte, **Guido Kroemer** (Centre de Recherche des Cordeliers et Gustave Roussy, France) étudie actuellement la mort cellulaire immunogène (ICD). En effet, pendant l'ICD, les cellules passent d'abord par une réponse intégrée au stress avant de libérer de nombreux motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs), qui sont ensuite reconnus par des

récepteurs spécifiques de la reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs) exprimés sur les cellules immunitaires. L'un de ces PRR est le récepteur de peptide formyle 1 (FPR1) sur les cellules dendritiques qui est muté dans environ 30% des cas chez l'Homme et qui mène à une faible survie globale au cancer. Sachant que les cellules cancéreuses ont développé de nombreuses stratégies pour réduire l'immunogénicité de la mort cellulaire, le laboratoire de **Guido Kroemer** effectue maintenant des tests à l'échelle du génome pour identifier de nouveaux régulateurs de l'ICD dans les cellules cancéreuses et immunitaires.

Session 4 -Plasticité et microenvironnement dans le cancer

Chloé Morin, Eliezer Aimontché, Marie Alexandra Albaret

La plasticité ainsi que l'interaction des cellules avec le microenvironnement sont des aspects clefs de la compréhension actuelle du cancer. L'adaptation des cellules à leur microenvironnement, aux signaux qu'elles perçoivent et les conséquences sur leur devenir font l'objet d'intenses études. C'est ainsi que dans cette session, les paramètres physiques de la matrice extracellulaire, la présence de cellules immunitaires dans le stroma ont été présentés comme pouvant impacter aussi bien l'initiation, l'hétérogénéité et la dissémination précoce tumorale ainsi que la formation de métastases. Les conséquences de l'état épithélio-mésenchymateux et l'état dédifférencié des cellules dans le devenir de celles-ci ont également été décrits. Les mécanismes moléculaires sous-tendant ces processus cellulaires commencent à être décryptés. De nombreuses recherches ont ainsi mis en évidence le rôle essentiel de l'épigénétique et des régulations transcriptionnelles dans la plasticité cellulaire et lors de la réponse cellulaire aux facteurs environnementaux. Cependant, de nouvelles perspectives sont apportées par les études s'intéressant aux processus traductionnels et post-traductionnels. Cette session a notamment permis de mettre en évidence le rôle de l'homéostasie des protéines dans ces processus.

Jing Yang (Centre de cancérologie de Moores, San Diego, USA) nous a présenté ses recherches sur le rôle de la rigidité de la matrice extra-cellulaire dans la régulation de la plasticité épithélio-mésenchymateuse à l'origine des métastases d'origine mammaire. L'utilisation de la Microscopie de Seconde Harmonique (MSH) dans des modèles de tumeurs murines et humains ont mis en évidence une augmentation drastique de la rigidité tissulaire entre les tissus sains (150 Pa) et les tissus tumoraux (5 kPa) traduit par une augmentation de pression. Les études de corrélation ont également montré qu'une forte rigidité tumorale était associée à un mauvais pronostic. En effet, une forte pression est associée à une diminution de l'expression de la E-cadhérine, ainsi qu'à un changement de localisation sans variation d'expression du facteur de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) TWIST1, qui entre dans le noyau et promeut ainsi la TEM. Des expériences d'inhibition de TWIST1 ont montré une modulation de sa localisation subcellulaire par la protéine G3BP2, elle-même régulée par la voie de signalisation des intégrines. Ainsi dans un contexte de pression élevée, le complexe cytosolique G3BP2-TWIST1 n'est plus possible, et TWIST1 entre dans le noyau. La formation du complexe est régulée par phosphorylation grâce à la kinase Lyn. L'inhibition de cette dernière a bloqué la localisation nucléaire de TWIST1, la propagation des organoïdes dans les cultures 3D et a inhibé les métastases issues de tumeurs mammaires chez la souris. D'autres recherches ont permis d'identifier de nouvelles fonctions des tyrosines kinases en amont de LYN dans la régulation de la

localisation nucléaire de TWIST1, et ce à des rigidités de matrice faibles et élevées. L'inhibition de cette voie de mécanotransduction TWIST1 dans les xénogreffes de cancer du sein dérivées de patientes a également supprimé l'invasion locale et les métastases chez les souris. L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle critique des forces physiques exercées par la matrice extracellulaire dans l'invasion et les métastases du cancer du sein, via l'activation de TWIST1 et de l'EMT.

Un autre aspect de la formation métastatique est associé à la perte d'expression des protéines d'adhésion par les cellules cancéreuses. **Julien Ablain** (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France) a montré que les cellules de mélanomes intègrent différents signaux environnementaux aboutissant à la même réponse cellulaire finale, quel que soit le statut génétique du mélanome. En effet, ses travaux montrent que la délétion du gène codant pour la Nectine 1 favorise la dissémination du mélanome chez le poisson zèbre. Nectine 1 est un récepteur transmembranaire de la famille des Nectines impliquée dans les interactions cellules-cellules. On observe une délétion du gène *NECTINE 1* dans 53% des cas de mélanomes. Des expériences de transplantation chez le poisson zèbre ont démontré que la migration des cellules déficientes pour la protéine d'adhésion transmembranaire Nectine 1 était dépendante de la voie de signalisation FAK/SRC. De plus, l'inhibition de la Nectine 1 *in vitro* induit un changement d'expression des intégrines, et notamment les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha\beta2/5$ essentielles pour la mobilité cellulaire dans ce contexte. En parallèle, la présence d'IGF1 dans le milieu extra-cellulaire permet d'inhiber la dissémination des cellules de mélanome, quel que soit le statut génétique de la Nectine 1. Le modèle proposé ici est que (i) en cas de présence d'IGF1 dans le milieu extra-cellulaire, la dissémination cellulaire est inhibée et n'est pas dépendante de la Nectine 1 mais que (ii) en cas d'absence de IGF1 dans le milieu extra-cellulaire, la protéine Nectine 1 est indispensable au maintien des jonctions adhérentes inter-cellulaires.

L'utilisation des technologies de suivi de lignage cellulaire ont aussi permis à **Cédric Blanpain** (Université Libre de Bruxelles, Belgique) de démontrer l'importance du type cellulaire d'origine dans l'hétérogénéité tumorale des cancers squameux. Ainsi, les tumeurs dérivant des follicules pileux (FP) sont caractérisées par la perte d'expression de la protéine EpCam au cours de leur transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), tandis que les tumeurs originaires des cellules inter-folliculaires conservent l'expression de ce marqueur épithélial. Ces dernières sont ainsi caractérisées par une faible propension à la TEM, et donc à la formation de métastases, comparées aux cellules originaires des FP EpCam négatives présentant de nombreuses métastases ainsi qu'un état de TEM. Par des analyses FACS, il a été montré que les cellules tumorales Epcam négatives issues du FP sont caractérisées par une expression de Vimentine, de Kératine 14 mais pas Kératine 8. Ceci correspond à une TEM partielle et plus précisément dans le continuum des états cellulaires de TEM décrit par l'équipe de **Cédric Blanpain**, à un stade précoce de la TEM partielle. Ainsi contrairement à ce qui pourrait être attendue, ce sont des cellules dans un état de TEM partielle et non des cellules mésenchymateuses en TEM accomplie qui sont les populations cellulaires les plus métastatiques. Une seconde partie des travaux présentés permettent de mettre en évidence que l'inhibition de la Netrine 1, retrouvée surexprimée au niveau transcriptomique dans les cellules Epcam-, permet d'inhiber la TEM et d'accroître la sensibilité au 5-FU combiné à la cisplatine (chimiothérapies). Ainsi, l'inhibition de Netrine 1 par un anticorps thérapeutique anti-Netrine 1 permet de limiter la croissance tumorale, ainsi que de bloquer les cellules dans un stade de TEM partielle à un stade tardif (Vimentin +, Kératine 14-, Kératine 8-). Les cellules Epcam- présentent une forte expression de la protéine RhoJ, impliquée dans la réparation de l'ADN. L'expression de RhoJ n'est pas modulée au niveau transcriptionnel mais au niveau post-traductionnel.

L'augmentation de la protéine RhoJ, elle-même régulée par la voie de signalisation YAP/TAZ, est à l'origine de l'importation nucléaire de l'actine dont l'inhibition ouvre de nouvelles perspectives de stratégie thérapeutique.

Au-delà du rôle pro-tumoral ou anti-tumoral du système immunitaire, **Marion Guérin** (Institut Pasteur, Paris, France) s'intéresse à l'impact de la réponse immunitaire et des sites anatomiques de développement, sur l'hétérogénéité génétique intra-tumorale, en particulier en termes de diversité clonale. L'étude a été réalisée à partir d'un modèle tumoral de cellules progénitrices de lymphocytes B transformées *in vitro*. Ces cellules sont injectées à un stade très précoce de leur initiation tumorale à des souris immunocompétentes ou non. Après une croissance tumorale de 6 à 12 semaines dans les différents hôtes, un séquençage complet de l'exome a été réalisé pour évaluer l'impact du système immunitaire sur l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales. La fréquence allélique des mutations a été utilisée comme mesure de la restriction clonale. Une fréquence allélique forte (>40%) signifie que la mutation concernée est clonale. Les expériences ont montré que la présence d'un système immunitaire compétent était associée à un enrichissement de mutations ayant une forte fréquence allélique ce qui suggère une action restrictive de celui-ci sur la diversité clonale. De plus, pour étudier l'influence de la localisation de la tumeur sur son développement, un système de barcoding par fluorescence des cellules pro-B a été utilisé afin de pouvoir suivre les clones *in vivo*. Après injection, les cellules tumorales se développent dans différents organes lymphoïdes comme la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques ainsi que la rate. Grâce au barcoding, il a été montré que les ganglions sont les sites anatomiques qui modifient le plus la composition initiale de la tumeur. En conclusion, il a été montré le système immunitaire ainsi que les sites anatomiques impactent la diversité génétique des tumeurs par des mécanismes qui restent à décrypter.

Julie Pannequin (Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier, France) nous a présenté ses travaux sur un mécanisme de dissémination tumorale précoce dans les cancers colorectaux et rapporté plusieurs études récentes démontrant également un processus de métastases précoces. L'ensemble de ces données affinent le modèle classique du processus métastatique survenant aux stades avancés de la maladie. Le but de l'étude était donc de consolider ces résultats en fournissant des éléments supplémentaires supportant l'existence de dissémination précoce et également de comprendre le rôle de ces cellules dans le développement du cancer colorectal. Un modèle murin de tumorigénèse intestinale a été développé. Le système de recombinaison conditionnelle cre-lox a permis la génération de cellules tomato dans ces souris qui ont été suivies *in vivo* par imagerie intravital. Le suivi des cellules a montré la présence de cellules fluorescentes dans la vascularisation des polypes. Par transparasation et marquages immunohistochimiques, des cellules intestinales ont été détectées dans le foie, qui est l'organe de prédilection pour le développement métastatique dans le cancer colorectal. Ces cellules peu mutées sont considérées comme proche de leur état initial et d'un stade précoce de la maladie. De plus, les cellules d'adénome ne sont pas tumorigènes en comparaison avec les cellules de carcinome. La question suivante était de connaître les raisons pour lesquelles elles migrent si précocement sans développer de métastases. Un élément de réponse à cette question a été apporté par l'observation d'un enrichissement de cellules myéloïdes dans le foie des souris présentant des cellules d'adénome ayant disséminé, par des approches de séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique et par des marquages multiples grâce à la technologie Cytof/hyperion. Le foie était en effet enrichi en macrophages et en neutrophiles. Des niveaux élevés de cytokines associées aux macrophages et neutrophiles ont été par ailleurs observés dans la circulation sanguine de prélèvements des souris mais aussi de patients présentant des polypes intestinaux. Enfin, la cause

fonctionnelle a été démontrée en injectant des cellules de carcinomes dans des foies de souris normales ou présentant des polypes intestinaux et donc un foie remodelé. Le remodelage du foie, induit par la présence des cellules disséminées et les cytokines circulantes, facilite grandement la colonisation des cellules tardives métastatiques.

La plasticité cellulaire est commune à la dédifférenciation et à la transformation cellulaire. Ainsi, la reprogrammation cellulaire semble partager des mécanismes moléculaires communs avec la transformation tumorale, comme nous l'a montré **Fabrice Laval** (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France). En utilisant des modèles cellulaires *in vitro* de cellules reprogrammées grâce à l'expression de quatre facteurs de transcription OCT4, SOX2, KLF4 and MYC (OSKM) ou de cellules transformées grâce à l'expression de Ras et cMYC, une analyse cellule à cellule a permis de démontrer que la transformation et la reprogrammation cellulaire partageaient des précurseurs communs dans leur trajectoires cellulaires respectives. Ces intermédiaires cellulaires qui peuvent ensuite s'engager dans la reprogrammation ou la transformation tumorale sont caractérisés par l'expression de Bcl11b et Thy1. Ces cellules double-positives expriment ensuite l'un ou l'autre des marqueurs ou deviennent double-négatives, après l'induction de la reprogrammation ou de la transformation. L'étude a aussi montré que la plasticité cellulaire, était indépendante de l'identité cellulaire, le premier élément étant contrôlé par Atoh8. Ce facteur de transcription lie et régule des enhanceurs spécifiques, limitant ainsi la plasticité cellulaire, notamment par modulation de la voie wnt.

- (1) Hendrikse LD, Haldipur P, Saulnier O, Millman J, Sjoboen AH, Erickson AW, Ong W, Gordon V, Coudière-Morrison L, Mercier AL, Shokouhian M, Suárez RA, Ly M, Borlase S, Scott DS, Vladioiu MC, Farooq H, Sirbu O, Nakashima T, Nambu S, Funakoshi Y, Bahcheli A, Diaz-Mejia JJ, Golser J, Bach K, Phuong-Bao T, Skowron P, Wang EY, Kumar SA, Balin P, Visvanathan A, Lee JJY, Ayoub R, Chen X, Chen X, Mungall KL, Luu B, Bérubé P, Wang YC, Pfister SM, Kim SK, Delattre O, Bourdeaut F, Doz F, Masliah-Planchon J, Grajkowska WA, Loukides J, Dirks P, Fèvre-Montange M, Jouvét A, French PJ, Kros JM, Zitterbart K, Bailey SD, Eberhart CG, Rao AAN, Giannini C, Olson JM, Garami M, Hauser P, Phillips JJ, Ra YS, de Torres C, Mora J, Li KKW, Ng HK, Poon WS, Pollack IF, López-Aguilar E, Gillespie GY, Van Meter TE, Shofuda T, Vibhakar R, Thompson RC, Cooper MK, Rubin JB, Kumabe T, Jung S, Lach B, Iolascon A, Ferrucci V, de Antonellis P, Zollo M, Cinalli G, Robinson S, Stearns DS, Van Meir EG, Porrati P, Finocchiaro G, Massimino M, Carlotti CG, Faria CC, Roussel MF, Boop F, Chan JA, Aldinger KA, Razavi F, Silvestri E, McLendon RE, Thompson EM, Ansari M, Garre ML, Chico F, Eguía P, Pérezpeña M, Morrissy AS, Cavalli FMG, Wu X, Daniels C, Rich J, Jones S, Moore RA, Marra MA, Huang X, Reimand J, Sorensen PH, Wechsler-Reya RJ, Weiss WA, Pugh TJ, Garzia L, Kleinman CL, Stein LD, Jabado N, Malkin D, Ayrault O, Golden JA, Ellison DW, Doble B, Ramaswamy V, Werbowetski-Ogilvie TE, Suzuki H, Millen KJ, Taylor MD. Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation. *Nature*. 2022 Sep;609(7929):1021-1028. doi: 10.1038/s41586-022-05215-w. Epub 2022 Sep 21. PMID: 36131014
- (2) Airelle Lahalle, Matthieu Lacroix, Carlo De Blasio, Madi Y Cissé, Laetitia K Linares, Laurent Le Cam. The p53 Pathway and Metabolism: The Tree That Hides the Forest. *Cancers (Basel)* 2021 Jan 4;13(1):133. doi: 10.3390/cancers13010133.
- (3) Matthieu Lacroix, Laetitia K Linares, Natalia Rueda-Rincon, Katarzyna Bloch, Michela Di Michele, Carlo De Blasio, Caroline Fau, Laurie Gayte, Emilie Blanchet, Aline Mairal, Rita Derua, Fernando Cardona, Diane Beuzelin, Jean-Sebastien Annicotte, Nelly Piro, Adeline Torro, Francisco J Tinahones, Florence Bernex, Justine Bertrand-Michel, Dominique Langin, Lluís Fajás, Johannes V

- Swinnen, Laurent Le Cam. The multifunctional protein E4F1 links P53 to lipid metabolism in adipocytes. *Nat Commun* 2021 Dec 2;12(1):7037. doi: 10.1038/s41467-021-27307-3.
- (4) 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
 - (5) Eroles, 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* 114, 12934–12939. doi:10.1073/pnas.1707674114
 - (6) Marcel, V., Kielbassa, J., Marchand, V., Natchiar, K.S., Paraqindes, H., Nguyen Van Long, F., Ayadi, L., Bourguignon-Igel, V., Monaco, Lo, P., Monchiet, D., Scott, V., Tonon, L., Bray, S.E., Diot, A., Jordan, L.B., Thompson, A.M., Bourdon, J.-C., Dubois, T., André, F., Catez, F., Puisieux, A., Motorin, Y., Klaholz, B.P., Viari, A., Diaz, J.-J., 2020. Ribosomal RNA 2'-O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer* 2, zcaa036. doi:10.1093/narcan/zcaa036
 - (7) Nguyen van LONG, F.N., Lardy-Cleaud, A., Carène, D., Rossoni, C., Catez, F., Rollet, P., Pion, N., Monchiet, D., Dolbeau, A., Martin, M., Simioni, V., Bray, S., Le Beherec, D., Mosele, F., Bouakka, I., Colombe-Vermorel, A., Odeyer, L., Diot, A., Jordan, L.B., Thompson, A.M., Jamen, F., Dubois, T., Chabaud, S., Michiels, S., Treilleux, I., Bourdon, J.-C., Perol, D., Puisieux, A., André, F., Diaz, J.-J., Marcel, V., 2022. Low level of Fibrillarin, a ribosomebiogenesis factor, is a new independent marker of poor outcome in breast cancer. *BMC Cancer* 1–12. doi:10.1186/s12885-022-09552-x
 - (8) Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):978-87. <https://doi.org/10.1038/nrc1504>.
 - (9) Grandin, Mélodie, Markus Meier, Jean Guy Delcros, Denise Nikodemus, Raphael Reuten, Trushar R. Patel, David Goldschneider, et al. 2016. « Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and Its Therapeutical Implications in Cancers ». *Cancer Cell* 29 (2): 173-85. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.01.001>.
 - (10) Cassier, P., L. Eberst, G. Garin, Y. Courbebaisse, C. Terret, M. Robert, J.-S. Frenel, et al. 2019. « A First in Human, Phase I Trial of NP137, a First-in-Class Antibody Targeting Netrin-1, in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors ». *Annals of Oncology* 30 (octobre): v159. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz244.001>.
 - (11) Househam, J.; Heide, T.; Cresswell, G. D.; Spiteri, I.; Kimberley, C.; Zapata, L.; Lynn, C.; James, C.; Mossner, M.; Fernandez-Mateos, J.; Vinceti, A.; Baker, A.-M.; Gabbutt, C.; Berner, A.; Schmidt, M.; Chen, B.; Lakatos, E.; Gunasri, V.; Nichol, D.; Costa, H.; Mitchinson, M.; Ramazzotti, D.; Werner, B.; Iorio, F.; Jansen, M.; Caravagna, G.; Barnes, C. P.; Shibata, D.; Bridgewater, J.; Rodriguez-Justo, M.; Magnani, L.; Sottoriva, A.; Graham, T. A. Phenotypic Plasticity and Genetic Control in Colorectal Cancer Evolution. *Nature* 2022, 611 (7937), 744–753. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05311-x>.
 - (12) Heide, T.; Househam, J.; Cresswell, G. D.; Spiteri, I.; Lynn, C.; Mossner, M.; Kimberley, C.; Fernandez-Mateos, J.; Chen, B.; Zapata, L.; James, C.; Barozzi, I.; Chkhaidze, K.; Nichol, D.; Gunasri, V.; Berner, A.; Schmidt, M.; Lakatos, E.; Baker, A.-M.; Costa, H.; Mitchinson, M.; Piazza, R.; Jansen, M.; Caravagna, G.; Ramazzotti, D.; Shibata, D.; Bridgewater, J.; Rodriguez-Justo, M.; Magnani, L.; Graham, T. A.; Sottoriva, A. The Co-Evolution of the Genome and Epigenome in Colorectal Cancer. *Nature* 2022, 611 (7937), 733–743. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05202-1>.
 - (13) Cañellas-Socias, A.; Cortina, C.; Hernando-Momblona, X.; Palomo-Ponce, S.; Mulholland, E. J.; Turon, G.; Mateo, L.; Conti, S.; Roman, O.; Sevillano, M.; Slebe, F.; Stork, D.; Caballé-Mestres, A.; Berenguer-Llargo, A.; Álvarez-Varela, A.; Fenderico, N.; Novellademunt, L.; Jiménez-Gracia, L.; Sipka, T.; Bardia, L.; Lorden, P.; Colombelli, J.; Heyn, H.; Trepatt, X.; Tejpar, S.; Sancho, E.;

- Tauriello, D. V. F.; Leedham, S.; Attolini, C. S.-O.; Batlle, E. Metastatic Recurrence in Colorectal Cancer Arises from Residual EMP1+ Cells. *Nature* 2022, 611 (7936), 603–613. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05402-9>.
- (14) Barriga, F. M.; Tsanov, K. M.; Ho, Y.-J.; Sohail, N.; Zhang, A.; Baslan, T.; Wuest, A. N.; Del Priore, I.; Meškauskaitė, B.; Livshits, G.; Alonso-Curbelo, D.; Simon, J.; Chaves-Perez, A.; Bar-Sagi, D.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Notta, F.; Chaligne, R.; Sharma, R.; Pe'er, D.; Lowe, S. W. MACHETE Identifies Interferon-Encompassing Chromosome 9p21.3 Deletions as Mediators of Immune Evasion and Metastasis. *Nat. Cancer* 2022, 3 (11), 1367–1385. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00443-5>.
- (15) William, W. N.; Zhao, X.; Bianchi, J. J.; Lin, H. Y.; Cheng, P.; Lee, J. J.; Carter, H.; Alexandrov, L. B.; Abraham, J. P.; Spetzler, D. B.; Dubinett, S. M.; Cleveland, D. W.; Cavenee, W.; Davoli, T.; Lippman, S. M. Immune Evasion in HPV– Head and Neck Precancer–Cancer Transition Is Driven by an Aneuploid Switch Involving Chromosome 9p Loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2021, 118 (19), e2022655118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022655118>.
- (16) Pozniak, J.; Pedri, D.; Landeloos, E.; Herck, Y. V.; Antoranz, A.; Karras, P.; Nowosad, A.; Makhzami, S.; Bervoets, G.; Dewaele, M.; Vanwynsberghe, L.; Cinque, S.; Kint, S.; Vandereyken, K.; Voet, T.; Vernailen, F.; Annaert, W.; Lambrechts, D.; Boecxstaens, V.; Oord, J. van den; Bosisio, F.; Leucci, E.; Rambow, F.; Bechter, O.; Marine, J.-C. A TCF4/BRD4-Dependent Regulatory Network Confers Cross-Resistance to Targeted and Immune Checkpoint Therapy in Melanoma. *bioRxiv* August 13, 2022, p 2022.08.11.502598. <https://doi.org/10.1101/2022.08.11.502598>.
- (17) Plaschka, M.; Benboubker, V.; Grimont, M.; Berthet, J.; Tonon, L.; Lopez, J.; Le-Bouar, M.; Balme, B.; Tondeur, G.; de la Fouchardière, A.; Larue, L.; Puisieux, A.; Grinberg-Bleyer, Y.; Bendriss-Vermare, N.; Dubois, B.; Caux, C.; Dalle, S.; Caramel, J. ZEB1 Transcription Factor Promotes Immune Escape in Melanoma. *J. Immunother. Cancer* 2022, 10 (3), e003484. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003484>.
- (18) Suarez-Carmona, M.; Williams, A.; Schreiber, J.; Hohmann, N.; Pruefer, U.; Krauss, J.; Jäger, D.; Frömming, A.; Beyer, D.; Eulberg, D.; Jungelius, J. U.; Baumann, M.; Mangasarian, A.; Halama, N. Combined Inhibition of CXCL12 and PD-1 in MSS Colorectal and Pancreatic Cancer: Modulation of the Microenvironment and Clinical Effects. *J. Immunother. Cancer* 2021, 9 (10), e002505. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002505>.
- (19) Halama, N.; Zoernig, I.; Berthel, A.; Kahlert, C.; Klupp, F.; Suarez-Carmona, M.; Suetterlin, T.; Brand, K.; Krauss, J.; Lasitschka, F.; Lerchl, T.; Luckner-Minden, C.; Ulrich, A.; Koch, M.; Weitz, J.; Schneider, M.; Buechler, M. W.; Zitvogel, L.; Herrmann, T.; Benner, A.; Kunz, C.; Luecke, S.; Springfield, C.; Grabe, N.; Falk, C. S.; Jaeger, D. Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell* 2016, 29 (4), 587–601. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.005>.
- (20) Black, S.; Phillips, D.; Hickey, J. W.; Kennedy-Darling, J.; Venkataraman, V. G.; Samusik, N.; Goltsev, Y.; Schürch, C. M.; Nolan, G. P. CODEX Multiplexed Tissue Imaging with DNA-Conjugated Antibodies. *Nat. Protoc.* 2021, 16 (8), 3802–3835. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00556-8>.

II. Liste des communications orales et posters

1. Poster : “A single ribosomal protein is sufficient to trigger EMT”

Ce poster scientifique dont je suis première autrice a été présenté lors de deux congrès : 5ème Symposium International du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) (Rapport d'activité) et 20ème anniversaire du Cancéropôle Auvergne-Rhône-Alpes (CLARA). Le poster est inclus à la suite de cette introduction et correspond à l'Contexte présenté dans la partie « Résultats ».

a. Contexte

L'EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, ou transition épithélio-mésenchymateuse) est un processus physio-pathologique impliquant la transdifférenciation d'une cellule épithéliale, très adhésive, en une cellule mésenchymateuse, douée de mobilité. Ce mécanisme est indispensable à la vie d'un organisme puisqu'il intervient de façon physiologique lors de l'embryogenèse (EMT type I ; *e.g.*, formation de la crête neurale, formation des organes, etc.) et de la cicatrisation (EMT type II ; *e.g.*, cicatrisation, menstruations féminines, etc.). Or, son activation chronique et/ou sa réactivation aboutissent à des phénotypes pathologiques tels que la fibrose (EMT type II) et la formation/dissémination des métastases cancéreuses (EMT type III). A ce jour, les mécanismes moléculaires de l'EMT les plus étudiés, et ce depuis des décennies, restent la transcription et l'épigénétique.

Or, plusieurs publications démontrent individuellement que la dérégulation traductionnelle de marqueurs mésenchymateux (*e.g.*, lamine) ou de facteurs canoniques de la traduction (*e.g.*, eIF3E, eIF4E) permettent l'initiation de l'EMT dans des cellules épithéliales. De plus, l'acteur majeur de la traduction, qu'est le ribosome, n'a jamais été étudié dans le contexte de l'EMT, que ce soit sa composition ou son activité. Nous proposons donc dans ce poster d'évaluer l'hétérogénéité de composition du ribosome au niveau protéique et son implication dans la promotion et l'établissement de l'EMT.

b. Résultats principaux

Ce poster présente en premier lieu la mise en évidence de l'hétérogénéité de composition du ribosome entre les cellules épithéliales hMEC et les cellules mésenchymateuses hMEC-

ZEB1. On observe par différentes approches que les cellules mésenchymateuses possèdent plus de ribosomes contenant la protéine RPL36A que les cellules épithéliales, sans différence de la quantité totale de ribosomes (panel 1). Ensuite, il s'avère que la surexpression de RPL36A induite par infection lentivirale dans les cellules épithéliales MCF10A promeut la mise en place de l'EMT. En effet, les principaux marqueurs épithéliaux sont diminués, alors que les marqueurs mésenchymateux sont augmentés, à la fois au niveau ARN et protéique (panel 2). La mise en place de cette EMT dépendante de RPL36A dans les cellules MCF10A s'effectue en moins de 11 jours après l'infection, avec un phénotype stabilisé au bout de 18 jours (panel 3). Enfin, nous observons que les cellules MCF10A surexprimant RPL36A montrent également une discordance entre l'expression de *SNAIL/SNAI2* au niveau ARN (diminution) et au niveau protéique (*SNAIL/SLUG* ; augmentation ou stabilisation), pouvant évoquer une dérégulation traductionnelle des ARNm *SNAIL/SNAI2* en réponse à la surexpression de RPL36A (panel 4). Plusieurs mécanismes distincts ont été documentés concernant la régulation traductionnelle de *SNAIL/SLUG*, mais le mécanisme impliqué dans notre contexte n'est pas connu à l'heure actuelle.

Ce poster met en lumière pour la première fois le rôle majeur d'une protéine ribosomique dans l'établissement de l'EMT physiologique : la modification d'expression d'une seule protéine ribosomique permet l'induction de l'EMT dans des cellules MCF10A. Il en ressort également que RPL36A pourrait induire l'EMT *via* une dérégulation traductionnelle de *SNAIL/SLUG*, bien que cette hypothèse reste à tester expérimentalement.

c. Ma contribution

J'ai réalisé toutes les expérimentations *in vitro* présentées dans ce poster : depuis la validation des données de spectrométrie de masse (panel 1), jusqu'aux infections et analyses cellulaires et moléculaires (panels 2-4). J'ai également été aidée pour les réplicats biologiques et techniques des panels 2 et 4 par Caroline ISAAC, ingénieure d'étude et deuxième autrice de ce poster.

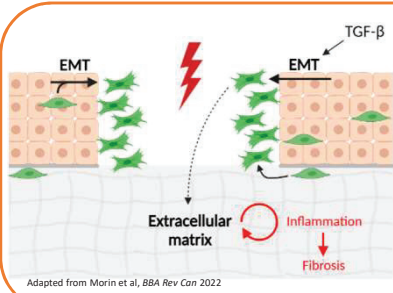
En plus de concevoir le poster, j'ai présenté celui-ci et répondu aux questions des différentes personnes venues à mon poster lors des deux congrès.

d. Poster

A SINGLE RIBOSOMAL PROTEIN IS SUFFICIENT TO TRIGGER EMT

Chloé Morin¹, Caroline Isaac¹, Flora Nguyen Van Long¹, Yohann Couté², Anne-Pierre Morel^{1,3}, Alain Puisieux^{1,3,4},
Caroline Moyret-Lalle¹, Jean-Jacques Diaz¹, Virginie Marcel¹

¹ Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, F-69373 Lyon Cedex 08, France
² Université Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRTSV-BGE, Grenoble 38000, France
³ Institut Curie "EMT and Cancer Cell Plasticity", Consortium Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France
⁴ CNRS UMR3666, Inserm U1143, Cellular and Chemical Biology, Institut Curie, PSL Research University, 75005 Paris, France

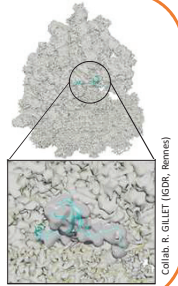


Introduction

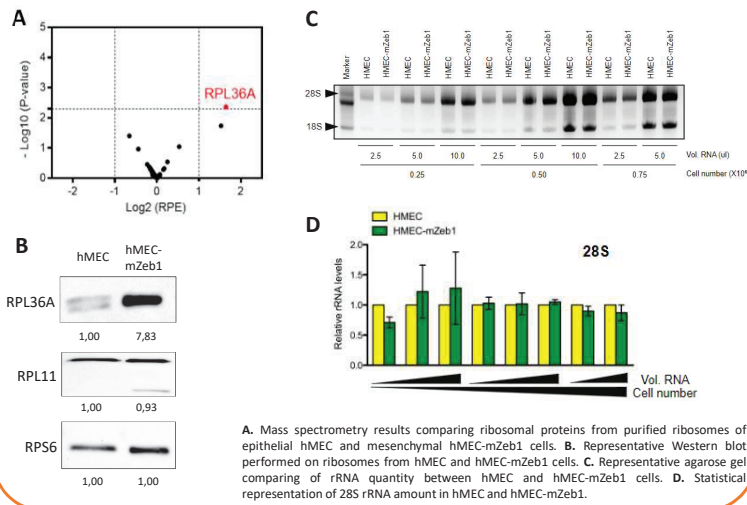
For several years, the ribosome and its implication as a translational actor has gained interest. The ribosome composition appears heterogeneous at the level of both ribosomal RNAs (*e.g.*, chemical modifications) and ribosomal proteins (*e.g.*, isoforms, post-translational modifications). These different ribosome variants have been shown to specifically translate some mRNAs compared to others.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a physio-pathological cellular plasticity process corresponding to the transdifferentiation of epithelial cells into mesenchymal ones. While EMT transcriptional program has been well studied for years, only recent data support the role of translation during EMT, either through translational control of EMT-TFs and mesenchymal markers or change in expression of translational canonical factors (*e.g.*, eIFs). However, the role of the ribosomal proteins in EMT has never been studied. Thus, our hypothesis is:

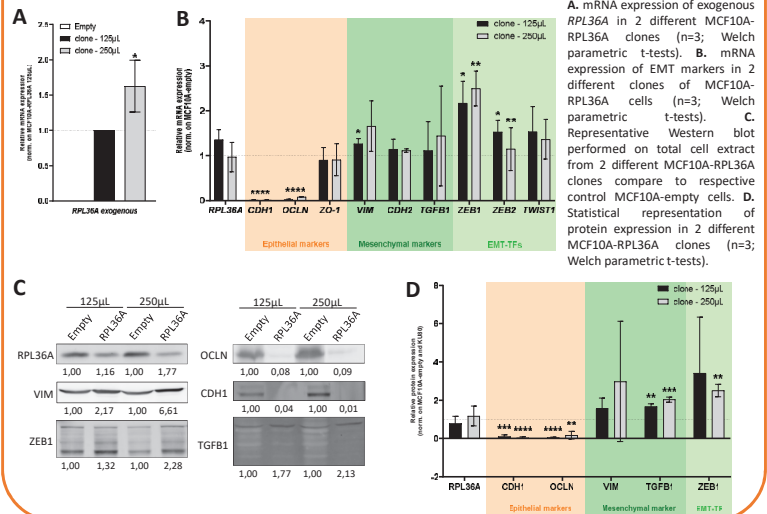
Change in ribosomal protein composition may impact translational regulation and promote EMT.



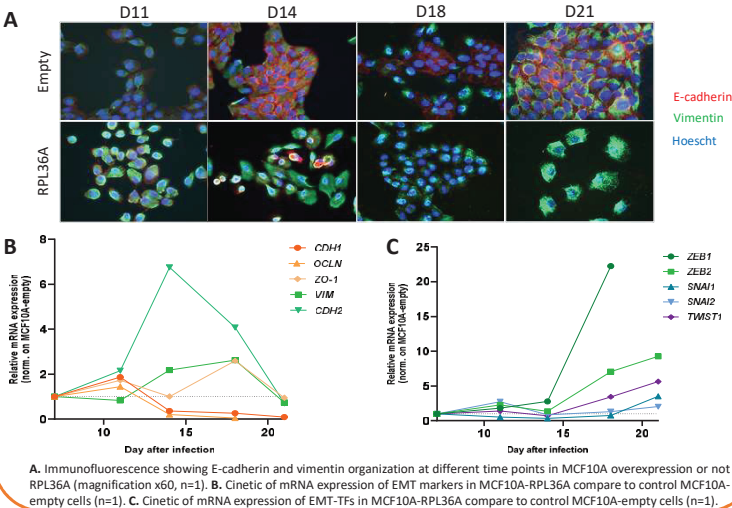
1 Mesenchymal cells contain more ribosomes containing RPL36A compare to epithelial ones



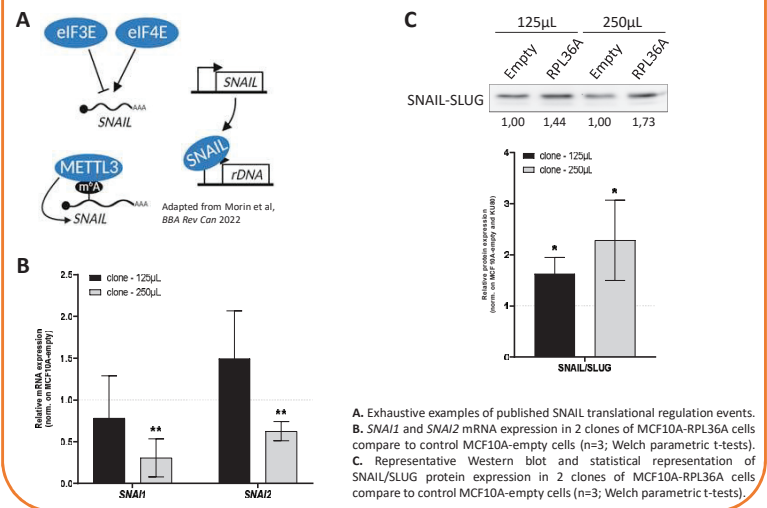
2 RPL36A overexpression induces EMT in MCF10A cells



3 Early kinetic of EMT in response to RPL36A overexpression in MCF10A cells



4 RPL36A overexpression impacts SNAIL translational regulation in MCF10A cells



Conclusion

Here we investigated whether change in ribosome composition occurs during EMT and contributes in EMT induction and/or maintenance. We identified a significant difference in ribosomal protein composition between epithelial hMEC and mesenchymal hMEC-mZeb1 cells, using different experimental approaches. Moreover, we reported that overexpression of this ribosomal protein is sufficient to trigger EMT in MCF10A epithelial cells. Also, the dynamic showed a rapid establishment of EMT process (<7 days). Long-term analyses demonstrated a dichotomy between Snail mRNA and protein expression, allowing us to ask for a RPL36A-dependent SNAIL translational regulation during the establishment of RPL36A-dependent EMT process. In this study, we demonstrated that modulation of ribosome composition is a key driver of EMT establishment. These data suggest that change in translation induced by ribosome might contribute in EMT induction. **Our study reveals a potential novel layer of gene expression involved in cellular plasticity.**



2. Présentation : 3^{ème} Symposium snoRibo

Cette présentation a été réalisée en Mars 2023 à l'occasion du 3^{ème} symposium SnoRibo Lyon-Sherbrooke, organisé à Lyon. Cette présentation correspond à l'Article 1 présenté dans la partie « Résultats ».

a. Contexte

Du fait de sa spécialité, l'équipe « Ribosome, traduction et cancer » dirigée par Jean-Jacques Diaz entretient une relation privilégiée avec l'équipe de Michelle Scott (Sherbrooke, Canada) spécialiste des approches bio-informatiques dédiées à l'étude de la régulation et des activités des snoARNs. Dans le cadre de cette collaboration internationale, l'organisation de symposiums a été initiée en 2021 par Virginie Marcel et Michelle Scott. Ces symposiums sont l'occasion pour les étudiants, doctorants et chercheurs d'échanger sur leurs sujets de recherche et de créer des projets collaboratifs tirant profit de chaque spécialité.

C'est donc dans cet objectif que j'ai présenté mon travail concernant la 2'Ome au cours de l'EMT, et ainsi initié un échange autour des analyses bio-informatiques et modélisations possibles sur la base des résultats biologiques obtenus.

b. Résultats principaux

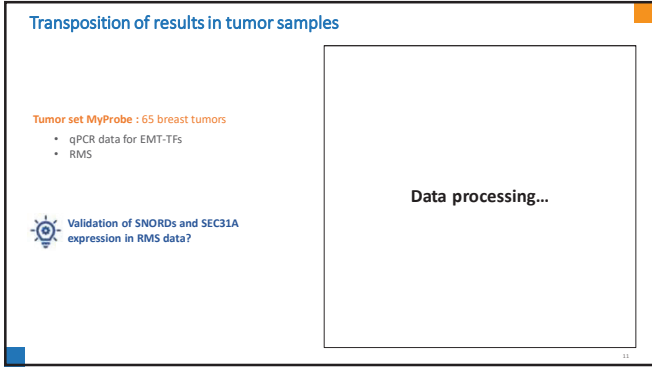
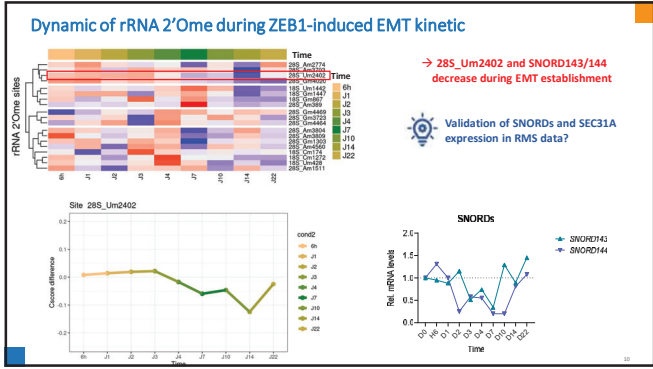
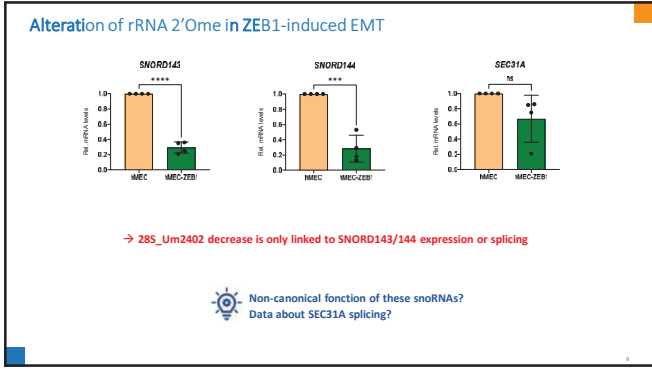
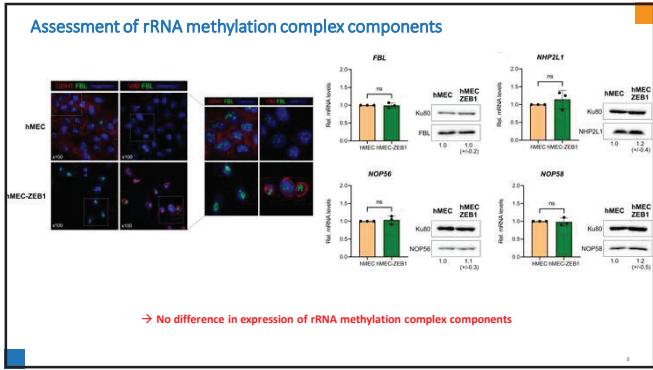
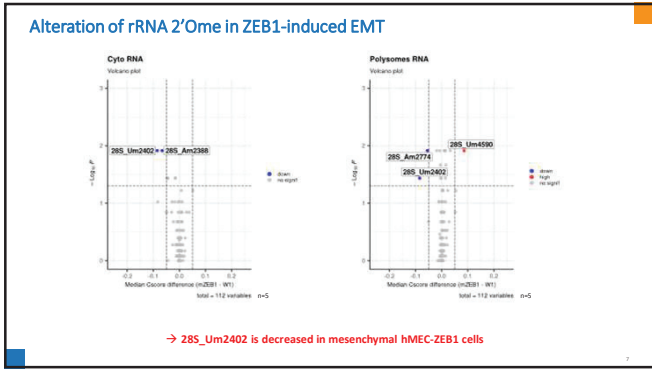
Après une introduction rappelant les bases moléculaires et cellulaires de l'EMT, j'ai démontré l'hétérogénéité de 2'Ome des ARNr existante entre les cellules épithéliales hMEC et mésenchymateuses hMEC-ZEB1, en particulier au site 28S_Um2402. De plus, cette altération de la 2'Ome a été associée à la seule altération de l'expression des snoARNs guidant la méthylation à ce site (*SNORD143* et *SNORD144*) et non aux protéines composant le complexe de 2'Ome ou d'autres snoARNs.

Suite à cette présentation, il a été proposé à l'équipe de Michelle Scott de collaborer sur l'étude de potentielles fonctions non-canoniques de ces deux snoARNs et de s'intéresser aux données existantes concernant l'épissage du gène hôte de ces deux snoARNs, *SEC31A*, afin de caractériser l'origine de cette altération d'expression des snoARNs.

c. Ma contribution

J'ai réalisé cette présentation sur la base des données que j'ai pu obtenir au cours de ma thèse, ainsi que des données préexistantes dans l'équipe (*e.g.*, données de (Marcel *et al.*, 2020)). La collaboration suit son cours.

d. Présentation



Acknowledgements

Team "Ribosome, Translation and Cancer"

Jean-Jacques Diaz

Jérôme Guillon
Jérôme Kucharczak
Marie-Alexandra Albaret
Anne Vincent
Hélène Delage
Mounira Chalabi
Caroline Isaac
Laury Bailion
Fleur Bourdelais
Lucie Arnould

Théo Combe
Ornela Chardonnet
Hermès Parasgides
Mariam Jaafar
Tanguy Fenouil
Eliezer Almontché
Nour-El-Houda Mourkai
Camille Jouines
Ting Wu
Jordan Hedjam

Collaborators

EMT
Alain Puisieux
Anne-Pierre Morel
CRCL

RNA-seq et bioinformatic
Dynamilis
CalKor
NGS (Q. Wang) and bioinformatic (A. Vian) platform

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abercrombie, M., Heaysman, J. E. M., & Pegrum, S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture: IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental Cell Research*, 67(2), 359–367. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90420-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90420-4)
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1438. <https://doi.org/10.1172/JCI38019>
- Aghdassi, A., Sandler, M., Guenther, A., Mayerle, J., Behn, C. O., Heidecke, C. D., Friess, H., Büchler, M., Evert, M., Lerch, M. M., & Weiss, F. U. (2012). Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut*, 61(3), 439–448. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2011-300060>
- Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M. A., Unger, W. G., Dedhar, S., & Auersperg, N. (2006). Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(6), 1532–1542. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00478.2005/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00050648280009.JPEG>
- Ahn, S. H., Kim, M., & Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of Serine 2 within the RNA Polymerase II C-Terminal Domain Couples Transcription and 3' End Processing. *Molecular Cell*, 13(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00492-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00492-1)
- Al-Namnam, N. M., Hariri, F., Thong, M. K., & Rahman, Z. A. (2019). Crouzon syndrome: Genetic and intervention review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 9(1), 37–39. <https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2018.08.007>
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). Molecular Biology of the Cell. *Biochemical Education*, 22(3), 164–164. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20684/>
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., & Block, M. R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions.

Journal of Cell Science, 122(Pt 17), 3037. <https://doi.org/10.1242/JCS.052704>

- Alliouachene, S., Tuttle, R. L., Boumard, S., Lapointe, T., Berissi, S., Germain, S., Jaubert, F., Tosh, D., Birnbaum, M. J., & Pende, M. (2008). Constitutively active Akt1 expression in mouse pancreas requires S6 kinase 1 for insulinoma formation. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3629. <https://doi.org/10.1172/JCI35237>
- Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N., & Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature*, 497(7447), 80–85. <https://doi.org/10.1038/nature12104>
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstråle, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlén, S., Hydbring, P., Söderberg, O., Grummt, I., Larsson, L. G., & Wright, A. P. H. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nature Cell Biology*, 7(3), 303–310. <https://doi.org/10.1038/ncb1225>
- 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., & Garcia-Blanco, M. A. (2011). Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Molecular Cancer Research*, 9(8), 997–1007. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0490>
- Asch, H. L., Mayhew, E., Lazo, R. O., & Asch, B. B. (1990). Lipids noncovalently associated with keratins and other cytoskeletal proteins of mouse mammary epithelial cells in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1034(3), 303–308. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(90\)90056-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(90)90056-3)
- Babaian, A., Rothe, K., Girodat, D., Minia, I., Djondovic, S., Milek, M., Spencer Miko, S. E., Wieden, H. J., Landthaler, M., Morin, G. B., & Mager, D. L. (2020). Loss of m1acp3Ψ Ribosomal RNA Modification Is a Major Feature of Cancer. *Cell Reports*, 31(5), 107611. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107611>
- Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R. S., Gan, R. R., Hung, P., Date, S. V., Marcotte, E., Hood, L., & Ng, W. V. (2004). Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: A halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Research*, 14(11), 2221. <https://doi.org/10.1101/GR.2700304>
- Baouz, S., Woisard, A., Sinapah, S., Le Caer, J.-P., Argentini, M., Bulygin, K., Aguié, G., & Hountondji, C. (2009). The human large subunit ribosomal protein L36A-like contacts the

- CCA end of P-site bound tRNA. *Biochimie*, *91*(11), 1420–1425.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.07.013>
- Barozzi, C., Zacchini, F., Corradini, A. G., Morara, M., Serra, M., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Dassi, E., & Montanaro, L. (2023). Alterations of ribosomal RNA pseudouridylation in human breast cancer. *NAR Cancer*, *5*(2). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAD026>
- Barta, A., Steiner, G., Brosius, J., Noller, H. F., & Kuechler, E. (1984). Identification of a site on 23S ribosomal RNA located at the peptidyl transferase center. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(12), 3607.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.81.12.3607>
- Bartle, E. I., Rao, T. C., Urner, T. M., & Mattheyses, A. L. (2018). Bridging the gap: Super-resolution microscopy of epithelial cell junctions. *Tissue Barriers*, *6*(1).
<https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1404189>
- Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & De Herreros, A. G. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, *2*(2), 84–89.
<https://doi.org/10.1038/35000034>
- 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*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007147>
- Bellodi, C., Krasnykh, O., Haynes, N., Theodoropoulou, M., Peng, G., Montanaro, L., & Ruggero, D. (2010). Loss of function of the tumor suppressor DKC1 perturbs p27 translation control and contributes to pituitary tumorigenesis. *Cancer Research*, *70*(14), 6026. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4730>
- Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, *334*(6062), 1524–1529. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1212642/SUPPL_FILE/BEN-SHEM.SOM.PDF
- Bergeron, D., Paraquindes, H., Fafard-Couture, É., Deschamps-Francoeur, G., Faucher-Giguère, L., Bouchard-Bourelle, P., Elela, S. A., Catez, F., Marcel, V., & Scott, M. S. (2023). snoDB 2.0: an enhanced interactive database, specializing in human snoRNAs. *Nucleic*

Acids Research, 51(D1), D291–D296. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC835>

Bierie, B., Pierce, S. E., Kroeger, C., Stover, D. G., Pattabiraman, D. R., Thiru, P., Donaher, J. L., Reinhardt, F., Chaffer, C. L., Keckesova, Z., & Weinberg, R. A. (2017). Integrin-β4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), E2337–E2346.

https://doi.org/10.1073/PNAS.1618298114/SUPPL_FILE/PNAS.1618298114.SD11.XLSX

Biophysical Society, S. (1958). Microsomal particles and protein synthesis. In B. Society. & R. B. Roberts (Eds.), *Washington Academy of Sciences*. Washington Academy of Sciences, Washington, D.C., by Pergamon Press. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6261>

Birkhoff, J. C., Huylebroeck, D., & Conidi, A. (2021). ZEB2, the Mowat-Wilson Syndrome Transcription Factor: Confirmations, Novel Functions, and Continuing Surprises. *Genes*, 12(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/GENES12071037>

Blech-Hermoni, Y., & Ladd, A. N. (2013). RNA binding proteins in the regulation of heart development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(11), 2467–2478. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.008>

Bohlen, J., Roiuk, M., & Teleman, A. A. (2021). Phosphorylation of ribosomal protein S6 differentially affects mRNA translation based on ORF length. *Nucleic Acids Research*, 49(22), 13062–13074. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1157>

Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 786. <https://doi.org/10.1038/NRM3904>

Bortoluzzi, S., D'Alessi, F., Romualdi, C., & Danieli, G. A. (2001). Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics*, 17(12), 1152–1157. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/17.12.1152>

Boutet, A., De Frutos, C. A., Maxwell, P. H., Mayol, M. J., Romero, J., & Nieto, M. A. (2006). Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *The EMBO Journal*, 25(23), 5603–5613. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601421>

Bowman, L. H., Rabin, B., & Schlessinger, D. (1981). Multiple ribosomal RNA cleavage

- pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 9(19), 4951. <https://doi.org/10.1093/NAR/9.19.4951>
- Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., Wellner, U., Dimmler, A., Faller, G., Schubert, J., & Brabletz, T. (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *The EMBO Journal*, 30(4), 770–782. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2010.349>
- Brabletz, S., & Brabletz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Reports*, 11(9), 670–677. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2010.117>
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
- Brachet, J. (1941). La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'amphibiens en voie de développement. *Archives de Biologie*, 53(2), 207–257. <http://hdl.handle.net/2013/>
- Bracken, C. P., Gregory, P. A., Kolesnikoff, N., Bert, A. G., Wang, J., Shannon, M. F., & Goodall, G. J. (2008). A Double-Negative Feedback Loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 Family Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Research*, 68(19), 7846–7854. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1942>
- Bradatsch, B., Leidig, C., Granneman, S., Gnädig, M., Tollervey, D., Böttcher, B., Beckmann, R., & Hurt, E. (2012). Structure of the pre-60S ribosomal subunit with nuclear export factor Arx1 bound at the exit tunnel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(12), 1234. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2438>
- Braeutigam, C., Rago, L., Rolke, A., Waldmeier, L., Christofori, G., & Winter, J. (2013). The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene*, 33(9), 1082–1092. <https://doi.org/10.1038/ONC.2013.50>
- Brumwell, A., Fell, L., Obress, L., & Uniacke, J. (2020). Hypoxia influences polysome distribution of human ribosomal protein S12 and alternative splicing of ribosomal protein mRNAs. *RNA*, 26(3), 361–371. <https://doi.org/10.1261/RNA.070318.119/-/DC1>
- Cairns, C. A., & White, R. J. (1998). p53 is a general repressor of RNA polymerase III

- transcription. *The EMBO Journal*, 17(11), 3112.
<https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.11.3112>
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F., & Nieto, M. A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76–83. <https://doi.org/10.1038/35000025>
- Carpinelli, M. R., De Vries, M. E., Auden, A., Butt, T., Deng, Z., Partridge, D. D., Miles, L. B., Georgy, S. R., Haigh, J. J., Darido, C., Brabletz, S., Brabletz, T., Stemmler, M. P., Dworkin, S., & Jane, S. M. (2020). Inactivation of Zeb1 in GRHL2-deficient mouse embryos rescues mid-gestation viability and secondary palate closure. *Disease Models and Mechanisms*, 13(3). <https://doi.org/10.1242/dmm.042218>
- Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F., & Gridley, T. (2001). The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular and Cellular Biology*, 21(23), 8184–8188. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8184-8188.2001>
- Caspersson, T. (1941). Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. *Naturwissenschaften*, 29(3), 33–43. <https://doi.org/10.1007/BF01476372>
- Caspersson, T., & Schultz, J. (1939). Pentose Nucleotides in the Cytoplasm of Growing Tissues. *Nature*, 143(3623), 602–603. <https://doi.org/10.1038/143602c0>
- Chaffer, C. L., Brennan, J. P., Slavin, J. L., Blick, T., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2006). Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2. *Cancer Research*, 66(23), 11271–11278. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2044>
- Chaffer, C. L., San Juan, B. P., Lim, E., & Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(4), 645–654. <https://doi.org/10.1007/S10555-016-9648-7/TABLES/1>
- Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C., & La Thangue, N. B. (2001). Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nature Cell Biology*, 3(7), 667–674. <https://doi.org/10.1038/35083062>
- Chan, K. M., Wong, H. L. X., Jin, G., Liu, B., Cao, R., Cao, Y., Lehti, K., Tryggvason, K., &

- Zhou, Z. (2012). MT1-MMP Inactivates ADAM9 to Regulate FGFR2 Signaling and Calvarial Osteogenesis. *Developmental Cell*, 22(6), 1176–1190. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2012.04.014>
- Chang, A. T., Liu, Y., Ayyanathan, K., Benner, C., Jiang, Y., Prokop, J. W., Paz, H., Wang, D., Li, H. R., Fu, X. D., Rauscher, F. J., & Yang, J. (2015). An evolutionarily conserved DNA architecture determines target specificity of the TWIST family bHLH transcription factors. *Genes & Development*, 29(6), 603. <https://doi.org/10.1101/GAD.242842.114>
- Chen, T. W., Chang, K. P., Cheng, C. C., Chen, C. Y., Hong, S. W., Sie, Z. L., Cheng, H. W., Yen, W. C., Huang, Y., Liu, S. C., & Wang, C. I. (2021). Characterization of recurrent relevant genes reveals a novel role of rpl36a in radioresistant oral squamous cell carcinoma. *Cancers*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13225623/S1>
- Chen, Z. F., & Behringer, R. R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Development*, 9(6), 686–699. <https://doi.org/10.1101/GAD.9.6.686>
- Cheng, S., & Lovett, D. H. (2003). Gelatinase A (MMP-2) Is Necessary and Sufficient for Renal Tubular Cell Epithelial-Mesenchymal Transformation. *The American Journal of Pathology*, 162(6), 1937–1949. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64327-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64327-1)
- Chua, H. L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S. E., Morimiya, A., Badve, S., & Nakshatri, H. (2007). NF-κB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*, 26(5), 711–724. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1209808>
- Ciruna, B., & Rossant, J. (2001). FGF Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. *Developmental Cell*, 1(1), 37–49. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00017-X)
- Claen, J., Nitzsche, S., Wallwiener, D., Kristen, P., Souchon, R., Bamberg, M., & Brucker, S. (2010). Fibrotic changes after postmastectomy radiotherapy and reconstructive surgery in breast cancer: A retrospective analysis in 109 patients. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 186(11), 630–636. <https://doi.org/10.1007/S00066-010-2158-6>
- Clarke, L. A., Botelho, H. M., Sousa, L., Falcao, A. O., & Amaral, M. D. (2015). Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies CFTR regulators. *Genomics*, 106(5),

268–277. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2015.07.005>

Claude, A. (1941). Particulate components of cytoplasm. *Symposia on Quantitative Biology*, 9(0), 263–271. <https://doi.org/10.1101/SQB.1941.009.01.030>

Claude, A. (1943). The constitution of protoplasm. *Science*, 97(2525), 451–456. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.97.2525.451/ASSET/66917146-3E37-4199-939A-E75F86C9D4E6/ASSETS/SCIENCE.97.2525.451.FP.PNG>

Coley, A. B., DeMeis, J. D., Chaudhary, N. Y., & Borchert, G. M. (2022). Small Nucleolar Derived RNAs as Regulators of Human Cancer. *Biomedicines*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10081819/S1>

Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., & Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology*, 326(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2008.10.040>

Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., & Bouvet, P. (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Research*, 40(19), 9441. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS720>

Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Mercado, M. A., Dowell, K., Yang, X., Lindner, V., Friesel, R. E., & Spicer, D. B. (2008). Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Developmental Biology*, 318(2), 323. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2008.03.037>

Créancier, L., Morello, D., Mercier, P., & Prats, A. C. (2000). Fibroblast Growth Factor 2 Internal Ribosome Entry Site (Ires) Activity Ex Vivo and in Transgenic Mice Reveals a Stringent Tissue-Specific Regulation. *The Journal of Cell Biology*, 150(1), 275. <https://doi.org/10.1083/JCB.150.1.275>

D'Souza, M. N., Gowda, N. K. C., Tiwari, V., Babu, R. O., Anand, P., Dastidar, S. G., Singh, R., James, O. G., Selvaraj, 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. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2018.11.007>

Dale, J. K., Malapert, P., Chal, J., Vilhais-Neto, G., Maroto, M., Johnson, T., Jayasinghe, S.,

- Trainor, P., Herrmann, B., & Pourquié, O. (2006). Oscillations of the Snail Genes in the Presomitic Mesoderm Coordinate Segmental Patterning and Morphogenesis in Vertebrate Somitogenesis. *Developmental Cell*, 10(3), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.011>
- Damgaard, C. K., & Lykke-Andersen, J. (2011). Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes & Development*, 25(19), 2057. <https://doi.org/10.1101/GAD.17355911>
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- Decourt, C., Schaeffer, J., Blot, B., Paccard, A., Excoffier, B., Pende, M., Nawabi, H., & Belin, S. (2023). The RSK2-RPS6 axis promotes axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems. *PLoS Biology*, 21(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002044>
- Desmoulière, A., Darby, I. A., & Gabbiani, G. (2003). Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis. *Laboratory Investigation*, 83(12), 1689–1707. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000101911.53973.90>
- Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C., & Block, M. R. (2010). β 1A Integrin Is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function. *Molecular Biology of the Cell*, 21(23), 4108. <https://doi.org/10.1091/MBC.E10-07-0580>
- Deusser, E., & Wittmann, H. G. (1972). Biological Sciences: Ribosomal Proteins: Variation of the Protein Composition in Escherichia coli Ribosomes as Function of Growth Rate. *Nature*, 238(5362), 269–270. <https://doi.org/10.1038/238269A0>
- Dever, T. E., Dinman, J. D., & Green, R. (2018). Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Perspectives in Biology*, 10(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A032649>
- Diamond, L. (1938). Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child*, 56, 464–467. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135650102132736.bib?lang=ja>

- Dinman, J. D. (2016). Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2186–2194. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.12.021>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Dragomir, M. P., Knutsen, E., & Calin, G. A. (2022). Classical and noncanonical functions of miRNAs in cancers. *Trends in Genetics*, 38(4), 379–394. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2021.10.002>
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., & Dahl, N. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genetics*, 21(2), 169–175. <https://doi.org/10.1038/5951>
- Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C. B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J. P., Lim, J. K. C., Von Hoff, D., Anderes, K., & Rice, W. G. (2009). Anticancer activity of CX-3543: A direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Research*, 69(19), 7653–7661. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1304/655359/P/ANTICANCER-ACTIVITY-OF-CX-3543-A-DIRECT-INHIBITOR>
- Duchaine, T. F., & Fabian, M. R. (2019). Mechanistic Insights into MicroRNA-Mediated Gene Silencing. *Perspectives in Biology*, 11(3), 32771–32772. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A032771>
- Ebastien Storck, S. ´, Thiry, M., & Bouvet, P. (2009). Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biology of the Cell*, 101(3), 153–171. <https://doi.org/10.1042/BC20080054>
- Emmott, E., Jovanovic, M., & Slavov, N. (2019). Ribosome Stoichiometry: From Form to Function. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(2), 95–109. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2018.10.009>
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M. R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., & Meister, G. (2008). A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Molecular Cell*, 32(4), 519–528. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.10.017>
- Erales, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S. E., Garcia, M., Laforêts,

- F., Marcel, V., Baudin-Baillieu, A., Bertin, P., Couté, Y., Adrait, A., Meyer, M., Therizols, G., Yusupov, M., Namy, O., Ohlmann, T., Motorin, Y., ... Diaz, J.-J. (2017). Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(49), 12934. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1707674114>
- Erard, M. S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A., & Amalric, F. (1988). A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *European Journal of Biochemistry*, *175*(3), 525–530. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1988.TB14224.X>
- Eustache, S., Créchet, J.-B., Bouceba, T., Nakayama, J., Tanaka, M., Suzuki, M., Woisard, A., Tuffery, P., Baouz, S., & Hountondji, C. (2017). A Functional Role for the Monomethylated Gln-51 and Lys-53 Residues of the 49GGQTK53 Motif of eL42 from Human 80S Ribosomes. *The Open Biochemistry Journal*, *11*(1), 8. <https://doi.org/10.2174/1874091X01711010008>
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L. P., Davicioni, E., Triche, T. J., & Sorensen, P. H. B. (2009). Translational Activation of Snail1 and Other Developmentally Regulated Transcription Factors by YB-1 Promotes an Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell*, *15*(5), 402–415. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.017>
- Farrar, J. E., Nater, M., Caywood, E., Mcdevitt, M. A., Kowalski, J., Takemoto, C. M., Talbot, C. C., Meltzer, P., Esposito, D., Beggs, A. H., Schneider, H. E., Grabowska, A., Ball, S. E., Niewiadomska, E., Sieff, C. A., Vlachos, A., Atsidaftos, E., Ellis, S. R., Lipton, J. M., ... Arceci, R. J. (2008). Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, *112*(5), 1582–1592. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-02-140012>
- Fata, J. E., Leco, K. J., Voura, E. B., Yu, H.-Y. E., Waterhouse, P., Murphy, G., Moorehead, R. A., & Khokha, R. (2001). Accelerated apoptosis in the Timp-3–deficient mammary gland. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(6), 831. <https://doi.org/10.1172/JCI13171>
- Fath, K. R., Mamajiwalla, S. N., & Burgess, D. R. (1993). The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity. *Journal of Cell Science*, *1993*, 65–73. https://doi.org/10.1242/JCS.1993.SUPPLEMENT_17.10

- Faucher-Giguère, L., Roy, A., Deschamps-Francoeur, G., Couture, S., Nottingham, R. M., Lambowitz, A. M., Scott, M. S., & Abou Elela, S. (2022). High-grade ovarian cancer associated H/ACA snoRNAs promote cancer cell proliferation and survival. *NAR Cancer*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAB050>
- Fearon, J. A., & Rhodes, J. (2009). Pfeiffer syndrome: A treatment evaluation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 123(5), 1560–1569. <https://doi.org/10.1097/PRS.0B013E3181A2057E>
- Friedrich, J. K., Panov, K. I., Cabart, P., Russell, J., & 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29551–29558. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501595200>
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., & Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313(1–2), 17–42. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00629-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00629-2)
- Frye, M., Jaffrey, S. R., Pan, T., Rechavi, G., & Suzuki, T. (2016). RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 365–372. <https://doi.org/10.1038/NRG.2016.47>
- Fuchs, E., & Weber, K. (2003). INTERMEDIATE FILAMENTS: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 345–382. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.63.070194.002021>
- Fusco, C. M., Desch, K., Dörrbaum, A. R., Wang, M., Staab, A., Chan, I. C. W., Vail, E., Villeri, V., Langer, J. D., & Schuman, E. M. (2021). Neuronal ribosomes exhibit dynamic and context-dependent exchange of ribosomal proteins. *Nature Communications*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26365-x>
- Gao, D., Joshi, N., Choi, H., Ryu, S., Hahn, M., Catena, R., Sadik, H., Argani, P., Wagner, P., Vahdat, L. T., Port, J. L., Stiles, B., Sukumar, S., Altorki, N. K., Raffi, S., & Mittal, V. (2012). Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Research*, 72(6), 1384–1394. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2905/650258/AM/MYELOID-PROGENITOR-CELLS-IN-THE-PREMETASTATIC-LUNG>
- Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choismel, V., O'Donohue, M. F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., Niewiadomska, E.,

- Matysiak, M., Zaucha, J. M., Glader, B., Niemeyer, C., Meerpohl, J. J., Atsidaftos, E., Lipton, J. M., ... Beggs, A. H. (2008). Ribosomal Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *American Journal of Human Genetics*, 83(6), 769–780. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.004>
- Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: From genes to organisms. *Nature Reviews Genetics*, 19(7), 431–452. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0008-z>
- Genuth, N. R., Shi, Z., Kunimoto, K., Hung, V., Xu, A. F., Kerr, C. H., Tiu, G. C., Oses-Prieto, J. A., Salomon-Shulman, R. E. A., Axelrod, J. D., Burlingame, A. L., Loh, K. M., & Barna, M. (2022). A stem cell roadmap of ribosome heterogeneity reveals a function for RPL10A in mesoderm production. *Nature Communications*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33263-3>
- Georgatos, S. D., & Blobel, G. (1987). Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *The Journal of Cell Biology*, 105(1), 117. <https://doi.org/10.1083/JCB.105.1.117>
- Ghigna, C., Valacca, C., & Biamonti, G. (2008). Alternative Splicing and Tumor Progression. *Current Genomics*, 9(8), 556. <https://doi.org/10.2174/138920208786847971>
- Gilbert, T., Le Bivic, A., Quaroni, A., & Rodriguez-Boulan, E. (1991). Microtubular organization and its involvement in the biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 113(2), 275. <https://doi.org/10.1083/JCB.113.2.275>
- Giraud, S., Greco, A., Brink, M., Diaz, J. J., & Delafontaine, P. (2001). Translation Initiation of the Insulin-like Growth Factor I Receptor mRNA Is Mediated by an Internal Ribosome Entry Site. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5668–5675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005928200>
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., & White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature*, 421(6920), 290–294. <https://doi.org/10.1038/nature01327>
- Gong, J., Li, Y., Liu, C. jie, Xiang, Y., Li, C., Ye, Y., Zhang, Z., Hawke, D. H., Park, P. K., Diao, L., Putkey, J. A., Yang, L., Guo, A. Y., Lin, C., & Han, L. (2017). A Pan-cancer

- Analysis of the Expression and Clinical Relevance of Small Nucleolar RNAs in Human Cancer. *Cell Reports*, 21(7), 1968–1981. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.10.070>
- Grande, M. T., Sánchez-Laorden, B., López-Blau, C., De Frutos, C. A., Boutet, A., Arévalo, M., Rowe, R. G., Weiss, S. J., López-Novoa, J. M., & Nieto, M. A. (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine*, 21(9), 989–997. <https://doi.org/10.1038/NM.3901>
- Granot, Z., Swisa, A., Magenheim, J., Stolovich-Rain, M., Fujimoto, W., Manduchi, E., Miki, T., Lennerz, J. K., Stoeckert, C. J., Meyuhas, O., Seino, S., Permutt, M. A., Piwnicka-Worms, H., Bardeesy, N., & Dor, Y. (2009). LKB1 Regulates Pancreatic β Cell Size, Polarity, and Function. *Cell Metabolism*, 10(4), 296. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.08.010>
- Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., & Dooley, S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in Bioscience*, 7. <https://doi.org/10.2741/A812>
- Gressner, A. M., & Wool, I. G. (1974). The Phosphorylation of Liver Ribosomal Proteins in Vivo: EVIDENCE THAT ONLY A SINGLE SMALL SUBUNIT PROTEIN (S6) IS PHOSPHORYLATED. *Journal of Biological Chemistry*, 249(21), 6917–6925. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42145-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42145-5)
- Grgic, I., Krautzberger, A. M., Hofmeister, A., Lalli, M., DiRocco, D. P., Fleig, S. V., Liu, J., Duffield, J. S., McMahon, A. P., Aronow, B., & Humphreys, B. D. (2014). Translational profiles of medullary myofibroblasts during kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(9), 1979–1990. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101143>
- Gripp, K. W., Zackai, E. H., & Stolle, C. A. (2000). Mutations in the Human TWIST Gene. *Human Mutation*, 15, 150–155. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200002\)15:2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200002)15:2)
- Grotegut, S., Von Schweinitz, D., Christofori, G., & Lehenbre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO Journal*, 25(15), 3534. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601213>
- Grozdanov, P., Georgiev, O., & Karagyozov, L. (2003). Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics*, 82(6), 637–643. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00199-X)

- Grummt, I., & Längst, G. (2013). Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3–4), 393–404. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2012.10.004>
- Gu, W., & Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, 90(4), 595–606. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80521-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80521-8)
- Guarino, M., Tosoni, A., & Nebuloni, M. (2009). Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology*, 40(10), 1365–1376. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.02.020>
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., & Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35(3), 849–857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4)
- Hadjiolova, K. V., Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolova, A. A., & Bachellerie, J. P. (1993). Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *European Journal of Biochemistry*, 212(1), 211–215. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1993.TB17652.X>
- Harris, W. T., Muhlebach, M. S., Oster, R. A., Knowles, M. R., Clancy, J. P., & Noah, T. L. (2011). Plasma TGF- β 1 in pediatric cystic fibrosis: Potential biomarker of lung disease and response to therapy. *Pediatric Pulmonology*, 46(7), 688–695. <https://doi.org/10.1002/PPUL.21430>
- Heiss, N. S., Knight, S. W., Vulliamy, T. J., Klauck, S. M., Wiemann, S., Mason, P. J., Poustka, A., & Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nature Genetics*, 19(1), 32–38. <https://doi.org/10.1038/NG0598-32>
- Heissenberger, C., Liendl, L., Nagelreiter, F., Gonskikh, Y., Yang, G., Stelzer, E. M., Krammer, T. L., Micutkova, L., Vogt, S., Kreil, D. P., Sekot, G., Siena, E., Poser, I., Harreither, E., Linder, A., Ehret, V., Helbich, T. H., Grillari-Voglauer, R., Jansen-Dürr, P., ... Schosserer, M. (2019). Loss of the ribosomal RNA methyltransferase NSUN5 impairs global protein synthesis and normal growth. *Nucleic Acids Research*, 47(22), 11807. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ1043>
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T. M., & Grummt, I. (1998). Mitotic

silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *The EMBO Journal*, 17(24), 7373. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.24.7373>

Helm, M., & Motorin, Y. (2017). Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nature Reviews Genetics*, 18(5), 275–291. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.169>

Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(2), 225–242. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1269>

Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V. M., Francí, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Croce, L. Di, Helin, K., Herreros, A. G. de, & Peiró, S. (2008). Polycomb Complex 2 Is Required for E-cadherin Repression by the Snail1 Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology*, 28(15), 4772–4781. <https://doi.org/10.1128/MCB.00323-08>

Hervé, M. A., Buteau-Lozano, H., Mourah, S., Calvo, F., & Perrot-Applanat, M. (2005). VEGF189 stimulates endothelial cells proliferation and migration in vitro and up-regulates the expression of Flk-1/KDR mRNA. *Experimental Cell Research*, 309(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2005.05.022>

Hinnebusch, A. G., & Lorsch, J. R. (2012). The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges. *Perspectives in Biology*, 4(10). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A011544>

Horkovics-Kovats, S., & Traub, P. (1990). Specific Interaction of the Intermediate Filament Protein Vimentin and Its Isolated N-Terminus with Negatively Charged Phospholipids As Determined by Vesicle Aggregation, Fusion, and Leakage Measurements. *Biochemistry*, 29(37), 8652–8657. https://doi.org/10.1021/BI00489A022/ASSET/BI00489A022.FP.PNG_V03

Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., & Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D512. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU1267>

Hountondji, C., Bulygin, K., Woisard, A., Tuffery, P., Créchet, J. B., Pech, M., Nierhaus, K. H., Karpova, G., & Baouz, S. (2012). Lys53 of Ribosomal Protein L36AL and the CCA

- End of a tRNA at the P/E Hybrid Site Are in Close Proximity on the Human Ribosome. *ChemBioChem*, 13(12), 1791–1797. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201200208>
- Huang, R. Y. J., Guilford, P., & Thiery, J. P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 125(19), 4417–4422. <https://doi.org/10.1242/JCS.099697>
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). INTEGRIN LIGANDS. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19), 3901. <https://doi.org/10.1242/JCS.03098>
- Hunziker, W., Male, P., & Mellman, I. (1990). Differential microtubule requirements for transcytosis in MDCK cells. *The EMBO Journal*, 9(11), 3515. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1990.TB07560.X>
- Hynes, R. O. (2009). Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), 1216. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1176009>
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Perspectives in Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004903>
- Ibrahimi, O. A., Eliseenkova, A. V., Plotnikov, A. N., Yu, K., Ornitz, D. M., & Mohammadi, M. (2001). Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7182–7187. <https://doi.org/10.1073/PNAS.121183798/ASSET/E56D0CB7-98DF-42D1-BCB3-AF160AF8F4F2/ASSETS/GRAPHIC/PQ1211837003.JPEG>
- Jaafar, M., Paraqindes, H., Gabut, M., Diaz, J.-J., Marcel, V., & Durand, S. (2021). 2'O-Ribose Methylation of Ribosomal RNAs: Natural Diversity in Living Organisms, Biological Processes, and Diseases. *Cells*, 10(8), 1948. <https://doi.org/10.3390/CELLS10081948>
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Janin, M., Ortiz-Barahona, V., de Moura, M. C., Martínez-Cardús, A., Llinàs-Arias, P., Soler, M., Nachmani, D., Pelletier, J., Schumann, U., Calleja-Cervantes, M. E., Moran, S., Guil, S., Bueno-Costa, A., Piñeyro, D., Perez-Salvia, M., Rosselló-Tortella, M., Piqué, L., Bech-

- Serra, J. J., De La Torre, C., ... Esteller, M. (2019). Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. *Acta Neuropathologica*, *138*(6), 1053. <https://doi.org/10.1007/S00401-019-02062-4>
- Jansson, M. D., Häfner, S. J., Altinel, K., Tehler, D., Krogh, N., Jakobsen, E., Andersen, J. V., Andersen, K. L., Schoof, E. M., Ménard, P., Nielsen, H., & Lund, A. H. (2021). Regulation of translation by site-specific ribosomal RNA methylation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *28*(11), 889–899. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00669-4>
- Johnson, D., Horsley, S. W., Moloney, D. M., Oldridge, M., Twigg, S. R. F., Walsh, S., Barrow, M., Njølstad, P. R., Kunz, J., Ashworth, G. J., Wall, S. A., Kearney, L., & Wilkie, A. O. M. (1998). A Comprehensive Screen for TWIST Mutations in Patients with Craniosynostosis Identifies a New Microdeletion Syndrome of Chromosome Band 7p21.1. *The American Journal of Human Genetics*, *63*(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1086/302122>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-13036-1>
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, *16*(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Josephs, H. W. (1936). Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine*, *15*(3). https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/1936/15030/ANAEMIA_OF_INFANCY_AND_EARLY_CHILDHOOD.1.aspx
- Jurica, M. S., & Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Molecular Cell*, *12*(1), 5–14. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00270-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00270-3)
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., & Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Development*, *19*(1), 104.

<https://doi.org/10.1101/GAD.1262905>

- 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., Moorman, A. V., Harrison, C. J., Spincemaille, P., Cools, J., Cassiman, D., Fendt, S. M., Vermeersch, P., & De Keersmaecker, K. (2019). The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia*, *33*(2), 319. <https://doi.org/10.1038/S41375-018-0176-Z>
- Karafiat, V., Dvorakova, M., Krejci, E., Kralova, J., Pajer, P., Snajdr, P., Mandikova, S., Bartunek, P., Grim, M., & Dvorak, M. (2005). Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(21), 2516–2525. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5297-7>
- Karafiat, V., Dvorakova, M., Pajer, P., Cermak, V., & Dvorak, M. (2007). Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(22), 2975–2984. <https://doi.org/10.1007/S00018-007-7330-5>
- Karbstein, K., Barna, M., Tollervey, D., Ruggero, D., Brar, G., Greer, E. L., & Dinman, J. D. (2022). The Promises and pitfalls of specialized ribosomes. *Molecular Cell*, *82*(12), 2179. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.05.035>
- Karseladze, A. I. (2015). Impairment of vascularization of the surface covering epithelium induces ischemia and promotes malignization: a new hypothesis of a possible mechanism of cancer pathogenesis. *Clinical & Translational Oncology*, *17*(6), 446. <https://doi.org/10.1007/S12094-014-1255-X>
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*, *25*(1), 76–84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0B013E32835B6371>
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., & Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. *Gene*, *514*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2012.07.083>
- Khalaileh, A., Dreazen, A., Khatib, A., Apel, R., Swisa, A., Kidess-Bassir, N., Maitra, A., Meyuhas, O., Dor, Y., & Zamir, G. (2013). Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer.

Cancer Research, 73(6), 1811–1820. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2014/650544/AM/PHOSPHORYLATION-OF-RIBOSOMAL-PROTEIN-S6-ATTENUATES>

Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K., & Klaholz, B. P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature*, 520(7549), 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature14427>

Kim, D., Xing, T., Yang, Z., Dudek, R., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2017). Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *Journal of Clinical Medicine*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.3390/jcm7010001>

Kim, J. H., You, K. R., Kim, I. H., Cho, B. H., Kim, C. Y., & Kim, D. G. (2004). Over-Expression of the Ribosomal Protein L36a Gene Is Associated with Cellular Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 39(1), 129–138. <https://doi.org/10.1002/hep.20017>

Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., & Herzog, V. (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *European Journal of Cell Biology*, 83(11–12), 717–724. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00421>

Klinge, S., & Woolford, J. L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 116. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0078-Y>

Koh, C. M., Gurel, B., Sutcliffe, S., Aryee, M. J., Schultz, D., Iwata, T., Uemura, M., Zeller, K. I., Anele, U., Zheng, Q., Hicks, J. L., Nelson, W. G., Dang, C. V., Yegnasubramanian, S., & De Marzo, A. M. (2011). Alterations in Nucleolar Structure and Gene Expression Programs in Prostatic Neoplasia Are Driven by the MYC Oncogene. *The American Journal of Pathology*, 178(4), 1824. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2010.12.040>

Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., & Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*, 145(3), 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.028>

Kong, S., Zhang, Y. H., & Zhang, W. (2018). Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>

Königshoffa, M., Kneidingerb, N., & Eickelberga, O. (2009). TGF- β signaling in COPD:

- deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimen. *Swiss Medical Weekly*, 139(3940), 554–563. <https://doi.org/10.4414/SMW.2009.12528>
- Korpál, M., Ell, B. J., Buffa, F. M., Ibrahim, T., Blanco, M. A., Celià-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., Wei, Y., Hu, G., Garcia, B. A., Ragoussis, J., Amadori, D., Harris, A. L., & Kang, Y. (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature Medicine*, 17(9), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/NM.2401>
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Losada, M. L., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, Di., Reichardt, W., Bronsert, P., Brunton, V. G., Pilarsky, C., Winkler, T. H., Brabletz, S., Stemmler, M. P., & Brabletz, T. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology*, 19(5), 518–529. <https://doi.org/10.1038/NCB3513>
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(6), 673–683. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2009.10.009>
- 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(16), 7884. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW482>
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., & Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, 31(1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90414-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90414-7)
- Kruszka, P., Rolle, M., Kahle, K. T., & Muenke, M. (2006). Muenke Syndrome. *Monographs in Human Genetics*, 19, 89–97. <https://doi.org/10.1159/000318407>
- Kryczka, J., & Boncela, J. (2017). Proteases Revisited: Roles and Therapeutic Implications in Fibrosis. *Mediators of Inflammation*, 2017, 12–18. <https://doi.org/10.1155/2017/2570154>
- Kunchala, P., Kuravi, S., Jensen, R., McGuirk, J., & Balusu, R. (2018). When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, 32(3), 167–183. <https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2017.11.001>

- Kurley, S. J., Bierie, B., Carnahan, R. H., Lobdel, N. A., Davis, M. A., Hofmann, I., Moses, H. L., Muller, W. J., & Reynolds, A. B. (2012). p120-catenin is essential for terminal end bud function and mammary morphogenesis. *Development*, *139*(10), 1754–1764. <https://doi.org/10.1242/DEV.072769>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, *168*(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lange, K. (2011). Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *Journal of Cellular Physiology*, *226*(4), 896–927. <https://doi.org/10.1002/JCP.22302>
- Leco, K. J., Waterhouse, P., Sanchez, O. H., Gowing, K. L. M., Poole, A. R., Wakeham, A., Mak, T. W., & Khokha, R. (2001). Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *Journal of Clinical Investigation*, *108*(6), 817. <https://doi.org/10.1172/JCI12067>
- Lee, A. S. Y., Burdeinick-Kerr, R., & Whelan, S. P. J. (2013). A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(1), 324–329. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1216454109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Leggett, S. E., Hruska, A. M., Guo, M., & Wong, I. Y. (2021). The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/S12964-021-00713-2>
- Leidig, C., Bange, G., Kopp, J., Amlacher, S., Aravind, A., Wickles, S., Witte, G., Hurt, E., Beckmann, R., & Sinning, I. (2012). Structural characterization of a eukaryotic chaperone—the ribosome-associated complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2447>
- Levy, S., Avni, D., Hariharan, N., Perry, R. P., & Meyuhas, O. (1991). Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

88(8), 3319. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.8.3319>

- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B. K., & Lu, J. (2010). Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snail-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, *29*(35), 4896–4904. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.234>
- Linder, S., Wiesner, C., & Himmel, M. (2011). Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*, 185–211. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154216>
- Liu, Y., Peng, X., Tan, J., Darling, D. S., Kaplan, H. J., & Dean, D. C. (2008). Zeb1 Mutant Mice as a Model of Posterior Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*(5), 1843–1849. <https://doi.org/10.1167/IOVS.07-0789>
- Liu, Z., Pang, Y., Jia, Y., Qin, Q., Wang, R., Li, W., Jing, J., Liu, H., & Liu, S. (2022). SNORA23 inhibits HCC tumorigenesis by impairing the 2'-O-ribose methylation level of 28S rRNA. *Cancer Biology & Medicine*, *19*(1), 104. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2020.0343>
- Lo Monaco, P., Marcel, V., Diaz, J. J., & Catez, F. (2018). 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? *Biomolecules*, *8*(4). <https://doi.org/10.3390/BIOM8040106>
- Lopes, A. M., Miguel, R. N., Sargent, C. A., Ellis, P. J., Amorim, A., & Affara, N. A. (2010). The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC Molecular Biology*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-33/FIGURES/4>
- Lovisa, S., LeBleu, V. S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vadhagara, K., Carstens, J. L., Wu, C. C., Hagos, Y., Burckhardt, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Nischal, H., Allison, J. P., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine*, *21*(9), 998–1009. <https://doi.org/10.1038/NM.3902>
- Luna, E. J., & Hitt, A. L. (1992). Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science*, *258*(5084), 955–964. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1439807>
- Mahesh, A., Khan, M. I. K., Govindaraju, G., Verma, M., Awasthi, S., Chavali, P. L., Chavali, S., Rajavelu, A., & Dhayalan, A. (2020). SET7/9 interacts and methylates the ribosomal

- protein, eL42 and regulates protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(2), 118611. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118611>
- Makrodouli, E., Oikonomou, E., Koc, M., Andera, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., & Pintzas, A. (2011). BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Molecular Cancer*, 10, 118. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-118>
- Mamuya, F. A., & Duncan, M. K. (2012). α V integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), 445. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2011.01419.X>
- 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., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Mansour, S. G., Puthumana, J., Coca, S. G., Gentry, M., & Parikh, C. R. (2017). Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. *BMC Nephrology*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12882-017-0490-0/TABLES/5>
- 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., Bourdon, J.-C., Jordan, L., Thompson, A., Tafer, Y., Cong, R., Bouvet, P., Saurin, J.-C., Catez, F., Prats, A.-C., ... Diaz, J.-J. (2013). p53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell*, 24(3), 318. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.08.013>
- Marcel, V., Kielbassa, J., Marchand, V., Natchiar, K. S., Paraqindes, H., Nguyen Van Long, F., Ayadi, L., Bourguignon-Igel, V., Lo Monaco, P., Monchiet, D., Scott, V., Tonon, L., Bray, S. E., Diot, A., Jordan, L. B., Thompson, A. M., Bourdon, J.-C., Dubois, T., André, F., ... Diaz, J.-J. (2020). Ribosomal RNA 2'O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer*, 2(4). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAA036>
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Burley, S. K. (1999). Cap-Dependent

- Translation Initiation in Eukaryotes Is Regulated by a Molecular Mimic of eIF4G. *Molecular Cell*, 3(6), 707–716. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)80003-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)80003-4)
- Martineau, Y., Bec, C. Le, Monbrun, L., Allo, V., Chiu, I.-M., Danos, O., Moine, H., Prats, H., & Prats, A.-C. (2004). Internal Ribosome Entry Site Structural Motifs Conserved among Mammalian Fibroblast Growth Factor 1 Alternatively Spliced mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7622. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7622-7635.2004>
- Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 429. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.2.429-440.2000>
- McDonald, O. G., Wu, H., Timp, W., Doi, A., & Feinberg, A. P. (2011). Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial to mesenchymal transition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(8), 867. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2084>
- McMahon, M., Contreras, A., Holm, M., Uechi, T., Forester, C. M., Pang, X., Jackson, C., Calvert, M. E., Chen, B., Quigley, D. A., Luk, J. M., Kelley, R. K., Gordan, J. D., Gill, R. M., Blanchard, S. C., & Ruggero, D. (2019). A single H/ACA small nucleolar RNA mediates tumor suppression downstream of oncogenic RAS. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.48847>
- Mercado-Pimentel, M. E., & Runyan, R. B. (2007). Multiple Transforming Growth Factor- β Isoforms and Receptors Function during Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart. *Cells Tissues Organs*, 185(1–3), 146–156. <https://doi.org/10.1159/000101315>
- Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., Pestova, T. V., Qian, S. B., & Jaffrey, S. R. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163(4), 999. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.10.012>
- Miller, G., Panov, K. I., Friedrich, J. K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I., & Zomerdijk, J. C. B. M. (2001). hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *The EMBO Journal*, 20(6), 1373. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.6.1373>
- Mills, J. W. (1996). The cytoskeleton and epithelial function. *Epithelial Transport*, 275–305. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1495-7_13

- Mills, J. W., Scwiebert, E. M., & Stanton, B. A. (1994). Evidence for the role of actin filaments in regulating cell swelling. *Journal of Experimental Zoology*, 268(2), 111–120. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402680207>
- Mirhadi, S., Spritz, R. A., & Moss, C. (2020). Does SNAI2 mutation cause human piebaldism and Waardenburg syndrome? *American Journal of Medical Genetics*, 182(12), 3074–3075. <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.61887>
- Miyamoto, S., Akiyama, S. K., & Yamada, K. M. (1995). Synergistic Roles for Receptor Occupancy and Aggregation in Integrin Transmembrane Function. *Science*, 267(5199), 883–885. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7846531>
- Mohammed, F. F., Smookler, D. S., Taylor, S. E. M., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O. H., English, J. L., Matrisian, L. M., Au, B., Yeh, W. C., & Khokha, R. (2004). Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nature Genetics*, 36(9), 969–977. <https://doi.org/10.1038/NG1413>
- Montanaro, L., Brigotti, M., Clohessy, J., Barbieri, S., Ceccarelli, C., Santini, D., Taffurelli, M., Calienni, M., Teruya-Feldstien, J., Trerè, D., Pandolfi, P. P., & Derenzini, M. (2006). Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. *The Journal of Pathology*, 210(1), 10–18. <https://doi.org/10.1002/PATH.2023>
- Montanaro, L., Calienni, M., Bertoni, S., Rocchi, L., Sansone, P., Storci, G., Santini, D., Ceccarelli, C., Taffurelli, M., Carnicelli, D., Brigotti, M., Bonafè, M., Trerè, D., & Derenzini, M. (2010). Novel dyskerin-mediated mechanism of p53 inactivation through defective mRNA translation. *Cancer Research*, 70(11), 4767–4777. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4024/655987/P/NOVEL-DYSKERIN-MEDIATED-MECHANISM-OF-P53>
- Morales, A. V., Acloque, H., Ocaña, O. H., de Frutos, C. A., Gold, V., & Nieto, M. A. (2007). Snail genes at the crossroads of symmetric and asymmetric processes in the developing mesoderm. *EMBO Reports*, 8(1), 104–109. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400867>
- Morel, A. P., Hinkal, G. W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., Devouassoux-Shisheboran, M., Treilleux, I., Tissier, A., Gras, B., Pourchet, J., Puisieux, I., Browne, G. J., Spicer, D. B., Lachuer, J., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2012). EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and Drive

- Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice. *PLoS Genetics*, 8(5), 1002723. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002723>
- Morel, A. P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 3(8), e2888. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002888>
- Morin, C., Moyret-Lalle, C., Mertani, H. C., Diaz, J.-J., & Marcel, V. (2022). Heterogeneity and dynamic of EMT through the plasticity of ribosome and mRNA translation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1877(3), 188718. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2022.188718>
- Motorin, Y., Quinternet, M., Rhalloussi, W., & Marchand, V. (2021). Constitutive and variable 2'-O-methylation (Nm) in human ribosomal RNA. *RNA Biology*, 18(S1), 88–97. https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1974750/SUPPL_FILE/KRNB_A_1974750_SM5551.DOCX
- Mourksi, N.-E.-H., Morin, C., Fenouil, T., Diaz, J.-J., & Marcel, V. (2020). snoRNAs Offer Novel Insight and Promising Perspectives for Lung Cancer Understanding and Management. *Cells*, 9(3), 541. <https://doi.org/10.3390/cells9030541>
- Mukhopadhyay, R., Jia, J., Arif, A., Ray, P. S., & Fox, P. L. (2009). The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(7), 324. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2009.03.004>
- Mullineux, S. T., & Lafontaine, D. L. J. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie*, 94(7), 1521–1532. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.02.001>
- Murray, S. A., & Gridley, T. (2006). Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10300–10304. https://doi.org/10.1073/PNAS.0602234103/SUPPL_FILE/02234FIG8.PDF
- Nachmani, D., Bothmer, A. H., Grisendi, S., Mele, A., Bothmer, D., Lee, J. D., Monteleone, E., Cheng, K., Zhang, Y., Bester, A. C., Guzzetti, A., Mitchell, C. A., Mendez, L. M., Pozdnyakova, O., Sportoletti, P., Martelli, M. P., Vulliamy, T. J., Safra, M., Schwartz, S., ... Pandolfi, P. P. (2019). Germline NPM1 mutations lead to altered rRNA 2'-O-methylation and cause dyskeratosis congenita. *Nature Genetics*, 51(10), 1518.

<https://doi.org/10.1038/S41588-019-0502-Z>

- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562–573. <https://doi.org/10.1016/J.CARDIORES.2005.12.002/2/69-3-562-FIG3.GIF>
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., & Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of transforming growth factor (TGF)- β and bone morphogenetic protein (BMP). *Anatomical Record*, 258(2), 119–127. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000201\)258:2<119::AID-AR1>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<119::AID-AR1>3.0.CO;2-U)
- Nandagopal, N., & Roux, P. P. (2015). Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation*, 3(1), e983402. <https://doi.org/10.4161/21690731.2014.983402>
- Nawshad, A., Lagamba, D., & Hay, E. D. (2004). Transforming growth factor β (TGF β) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Archives of Oral Biology*, 49(9), 675–689. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2004.05.007>
- Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D., & Cáceres, J. F. (2003). Fibrillarin Is Essential for Early Development and Required for Accumulation of an Intron-Encoded Small Nucleolar RNA in the Mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8519. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8519-8527.2003>
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), 767–779. <https://doi.org/10.1038/NRM3470>
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 155–166. <https://doi.org/10.1038/NRM757>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., & Cooke, J. (1994). Control of Cell Behavior During Vertebrate Development by Slug, a Zinc Finger Gene. *Science*, 264(5160), 835–839. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7513443>
- O’Leary, M. N., Schreiber, K. H., Zhang, Y., Duc, A. C. E., Rao, S., Hale, J. S., Academia, E.

- C., Shah, S. R., Morton, J. F., Holstein, C. A., Martin, D. B., Kaeberlein, M., Ladiges, W. C., Fink, P. J., MacKay, V. L., Wiest, D. L., & Kennedy, B. K. (2013). The Ribosomal Protein Rpl22 Controls Ribosome Composition by Directly Repressing Expression of Its Own Paralog, Rpl2211. *PLoS Genetics*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003708>
- Odintsova, T. I., Müller, E. C., Ivanov, A. V., Egorov, T. A., Bienert, R., Vladimirov, S. N., Kostka, S., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., & Karpova, G. G. (2003). Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *Journal of Protein Chemistry*, 22(3), 249–258. <https://doi.org/10.1023/A:1025068419698>
- Oettel, S., Härtel, F., Kober, I., Iben, S., & Seifart, K. H. (1997). Human transcription factors IIC2 , IIC1 and a novel component IIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2440. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.12.2440>
- Ono, M., Yamada, K., Avolio, F., Scott, M. S., Van Koningsbruggen, S., Barton, G. J., & Lamond, A. I. (2010). Analysis of human small nucleolar RNAs (snoRNA) and the development of snoRNA modulator of gene expression vectors. *Molecular Biology of the Cell*, 21(9), 1569–1584. <https://doi.org/10.1091/MBC.E10-01-0078/ASSET/IMAGES/LARGE/ZMK0091094330014.JPEG>
- Orphanides, G., & Reinberg, D. (2002). A Unified Theory of Gene Expression. *Cell*, 108(4), 439–451. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00655-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00655-4)
- Padrón, A., Iwasaki, S., & Ingolia, N. T. (2019). Proximity RNA labeling by APEX-Seq Reveals the Organization of Translation Initiation Complexes and Repressive RNA Granules. *Molecular Cell*, 75(4), 875. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.07.030>
- Palade, G. E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1(1), 59. <https://doi.org/10.1083/JCB.1.1.59>
- Paraqindes, H., Mourksi, N.-E.-H., Ballesta, S., Hedjam, J., Bourdelais, F., Fenouil, T., Picart, T., Catez, F., Combe, T., Ferrari, A., Kielbassa, J., Thomas, E., Tonon, L., Viari, A., Attignon, V., Carrere, M., Perrossier, J., Giraud, S., Vanbelle, C., ... Durand, S. (2023). IDHwt and IDHmut adult-type diffuse gliomas display distinct alterations in ribosome biogenesis and 2'O-methylation of ribosomal RNA. *Neuro-Oncology*.

<https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAD140>

- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J. F., Wellinger, R. J., Chabot, B., & Elela, S. A. (2011). Introns within Ribosomal Protein Genes Regulate the Production and Function of Yeast Ribosomes. *Cell*, *147*(2), 320–331. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.08.044>
- 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. *Science Advances*, *4*(2). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAO0665>
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, *13*(4), 271–282. <https://doi.org/10.1038/NRG3162>
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A. A., Lorsch, J. R., & Ramakrishnan, V. (2007). The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome. *Molecular Cell*, *26*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.03.018>
- Pauli, C., Liu, Y., Rohde, C., Cui, C., Fijalkowska, D., Gerloff, D., Walter, C., Krijgsveld, J., Dugas, M., Edemir, B., Pabst, C., Müller, L. P., Zhou, F., & Müller-Tidow, C. (2020). Site-specific methylation of 18S ribosomal RNA by SNORD42A is required for acute myeloid leukemia cell proliferation. *Blood*, *135*(23), 2059–2070. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2019004121>
- Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donzé, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., & Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, *371*(6500), 762–767. <https://doi.org/10.1038/371762A0>
- Peinado, Hector, Ballestar, E., Esteller, M., & Cano, A. (2004). Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(1), 306–319. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.306-319.2004>
- Peinado, Héctor, Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, *7*(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>

- Pelaseyed, T., & Bretscher, A. (2018). Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *131*(20). <https://doi.org/10.1242/JCS.221853>
- Pelechano, V., Jimeno-González, S., Rodríguez-Gil, A., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., & Chávez, S. (2009). Regulon-Specific Control of Transcription Elongation across the Yeast Genome. *PLoS Genetics*, *5*(8), 1000614. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000614>
- Peña, C., Hurt, E., & Panse, V. G. (2017). Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(9), 689–699. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3454>
- Penzo, M., Ludovini, V., Treré, D., Siggillino, A., Vannucci, J., Bellezza, G., Crinò, L., & Montanaro, L. (2015). Dyskerin and TERC expression may condition survival in lung cancer patients. *Oncotarget*, *6*(25), 21755. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4580>
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*, *21*(4), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.031>
- Petibon, C., Parenteau, J., Catala, M., & Elela, S. A. (2016). Introns regulate the production of ribosomal proteins by modulating splicing of duplicated ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Research*, *44*(8), 3878. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW140>
- Pober, B. R. (2010). Williams–Beuren Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *362*(3), 239–252. https://doi.org/10.1056/NEJMRA0903074/SUPPL_FILE/NEJM_POBER_239SA1.PDF
- Poincioux, R., Lizárraga, F., & Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of Cell Science*, *122*(17), 3015–3024. <https://doi.org/10.1242/JCS.034561>
- Polymenis, M. (2020). Ribosomal proteins: mutant phenotypes by the numbers and associated gene expression changes. *Open Biology*, *10*(8). <https://doi.org/10.1098/RSOB.200114>
- Postigo, A. A. (2003). Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF β /BMP signaling pathway. *The EMBO Journal*, *22*(10), 2443–2452. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG225>

- Postigo, A. A., Depp, J. L., Taylor, J. J., & Kroll, K. L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO Journal*, *22*(10), 2453. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG226>
- Prakash, V., Carson, B. B., Feenstra, J. M., Dass, R. A., Sekyrova, P., Hoshino, A., Petersen, J., Guo, Y., Parks, M. M., Kurylo, C. M., Batchelder, J. E., Haller, K., Hashimoto, A., Rundqvist, H., Condeelis, J. S., Allis, C. D., Drygin, D., Nieto, M. A., Andäng, M., ... Vincent, C. T. (2019). Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nature Communications*, *10*(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10100-8>
- Proudfoot, N. J., Furger, A., & Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell*, *108*(4), 501–512. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00617-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00617-7)
- Puppo, M., Jaafar, M., Diaz, J. J., Marcel, V., & Clézardin, P. (2022). MiRNAs and snoRNAs in Bone Metastasis: Functional Roles and Clinical Potential. *Cancers*, *15*(1), 242. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15010242>
- Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Brusco, A., Calabrese, R., Dufour, C., Longoni, D., Misuraca, A., Vinti, L., Aspesi, A., Biondini, L., Loreni, F., Dianzani, I., & Ramenghi, U. (2010). Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica*, *95*(2), 206–213. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2009.011783>
- Quaresma, M. C., Pankonien, I., Clarke, L. A., Sousa, L. S., Silva, I. A. L., Railean, V., Doušová, T., Fuxe, J., & Amaral, M. D. (2020). Mutant CFTR Drives TWIST1 mediated epithelial–mesenchymal transition. *Cell Death & Disease*, *11*(10), 1–18. <https://doi.org/10.1038/S41419-020-03119-Z>
- Raška, I., Koberna, K., Malínský, J., Fidlerová, H., & Mašata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell*, *96*(8), 579–594. <https://doi.org/10.1016/J.BIOLCEL.2004.04.015>
- Ray, P. S., Grover, R., & Das, S. (2006). Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Reports*, *7*(4), 404. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400623>
- Recher, G., Jouralet, J., Brombin, A., Heuzé, A., Mugniery, E., Hermel, J. M., Desnoulez, S., Savy, T., Herbomel, P., Bourrat, F., Peyriéras, N., Jamen, F., & Joly, J. S. (2013). Zebrafish

- midbrain slow-amplifying progenitors exhibit high levels of transcripts for nucleotide and ribosome biogenesis. *Development*, 140(24), 4860–4869. <https://doi.org/10.1242/DEV.099010/VIDEO-6>
- Reese, J. C. (2003). Basal transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(2), 114–118. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00013-3)
- Richter, J. D., & Collier, J. (2015). Pausing on Polyribosomes: Make Way for Elongation in Translational Control. *Cell*, 163(2), 292. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.09.041>
- Rickards, B., Flint, S. J., Cole, M. D., & LeRoy, G. (2007). Nucleolin Is Required for RNA Polymerase I Transcription In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 937. <https://doi.org/10.1128/MCB.01584-06>
- Ridley, A. J. (2011). Life at the Leading Edge. *Cell*, 145(7), 1012–1022. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.06.010>
- Rocchi, L., Pacilli, A., Sethi, R., Penzo, M., Schneider, R. J., Treré, D., Brigotti, M., & Montanaro, L. (2013). Dyskerin depletion increases VEGF mRNA internal ribosome entry site-mediated translation. *Nucleic Acids Research*, 41(17), 8308. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT587>
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the Cell*, 107(6), 159–174. <https://doi.org/10.1111/BOC.201400077>
- Rogers, G. W., Richter, N. J., Lima, W. F., & Merrick, W. C. (2001). Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30914–30922. <https://doi.org/10.1074/JBC.M100157200>
- Rogers, G. W., Richter, N. J., & Merrick, W. C. (1999). Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12236–12244. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.18.12236>
- Romano, L. A., & Runyan, R. B. (2000). Slug is an Essential Target of TGFβ2 Signaling in the Developing Chicken Heart. *Developmental Biology*, 223(1), 91–102. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9750>
- Roux, P. P., & Topisirovic, I. (2012). Regulation of mRNA Translation by Signaling Pathways.

Perspectives in Biology, 4(11). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012252>

- Roux, P. P., & Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Molecular and Cellular Biology*, 38(12). <https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18>
- Ruggero, D. (2012). Revisiting the Nucleolus: From Marker to Dynamic Integrator of Cancer Signaling. *Science Signaling*, 5(241), pe38. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2003477>
- Ruggero, D., Grisendi, S., Piazza, F., Rego, E., Mari, F., Rao, P. H., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2003). Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science*, 299(5604), 259–262. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1079447/SUPPL_FILE/RUGGERO.SOM.PDF
- Russell, J., & Zomerdijk, J. C. B. M. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochemical Society Symposium*, 73(73), 203. <https://doi.org/10.1042/BSS0730203>
- Ruvinsky, I., Katz, M., Drezzen, A., Gielchinsky, Y., Saada, A., Freedman, N., Mishani, E., Zimmerman, G., Kasir, J., & Meyuhas, O. (2009). Mice Deficient in Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Suffer from Muscle Weakness that Reflects a Growth Defect and Energy Deficit. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005618>
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., & Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*, 19(18), 2199. <https://doi.org/10.1101/GAD.351605>
- Samanfar, B., Shostak, K., Moteshareie, H., Hajikarimlou, M., Shaikho, S., Omidi, K., Hooshyar, M., Burnside, D., Márquez, I. G., Kazmirchuk, T., Naing, T., Ludovico, P., York-Lyon, A., Szereszewski, K., Leung, C., Jin, J. Y., Megarbane, R., Smith, M. L., Babu, M., ... Golshani, A. (2017). The sensitivity of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, to acetic acid is influenced by DOM34 and RPL36A. *PeerJ*, 2017(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.4037>
- Sánchez-Tilló, E., Lázaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E. C., Castells, A., Engel, P., & Postigo, A. (2010). ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene*, 29(24), 3490–3500. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.102>

- Santoro, R., Schmitz, K. M., Sandoval, J., & Grummt, I. (2010). Intergenic transcripts originating from a subclass of ribosomal DNA repeats silence ribosomal RNA genes in trans. *EMBO Reports*, *11*(1), 52. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2009.254>
- Sawh-Martinez, R., & Steinbacher, D. M. (2019). Syndromic Craniosynostosis. *Clinics in Plastic Surgery*, *46*(2), 141–155. <https://doi.org/10.1016/J.CPS.2018.11.009>
- Schachman, H. K., Pardee, A. B., & Stanier, R. Y. (1952). Studies on the macromolecular organization of microbial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *38*(1), 245–260. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(52)90029-5)
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R., & Hurt, E. C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *The EMBO Journal*, *8*(13), 4015. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1989.TB08584.X>
- Schnaper, H. W., Hayashida, T., Hubchak, S. C., & Poncelet, A. C. (2003). TGF- β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *284*(2), 53-2. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00300.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H20231013004.JPEG>
- Schwarzbauer, J. E., Tamkun, J. W., Lemischka, I. R., & Hynes, R. O. (1983). Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell*, *35*(2), 421–431. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90175-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90175-7)
- Seetharaman, S., & Etienne-Manneville, S. (2020). Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology*, *30*(9), 720–735. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2020.06.004>
- Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2015). Adhesion in Mammary Development: Novel Roles for E-Cadherin in Individual and Collective Cell Migration. *Current Topics in Developmental Biology*, *112*, 353–382. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2014.12.001>
- Sharma, S., & Lafontaine, D. L. J. (2015). ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(10), 560–575. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.07.008>
- Shi, Y., Sawada, J. I., Sui, G., Affar, E. B., Whetstine, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P. S., Nakatani, Y., & Shi, Y. (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP

- co-repressor complex. *Nature*, 422(6933), 735–738.
<https://doi.org/10.1038/NATURE01550>
- Shi, Z., & Barna, M. (2015). Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 31–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125346>
- 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(1), 71–83.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Shirai, A., Sadaie, M., Shinmyozu, K., & Nakayama, J. (2010). Methylation of Ribosomal Protein L42 Regulates Ribosomal Function and Stress-adapted Cell Growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22448–22460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.132274>
- Shu, J., Resende E Silva, B. V., Gao, T., Xu, Z., & Cui, J. (2017). Dynamic and Modularized MicroRNA Regulation and Its Implication in Human Cancers. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13470-5>
- Sims, R. J., Mandal, S. S., & Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(3), 263–271. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2004.04.004>
- Simsek, D., & Barna, M. (2017). An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *Current Opinion in Cell Biology*, 45, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.010>
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741–4751. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.215>
- Slavov, N., Semrau, S., Airoidi, E., Budnik, B., & van Oudenaarden, A. (2015). Differential

- Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins. *Cell Reports*, 13(5), 865–873.
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.09.056>
- Sloan, K. E., Warda, A. S., Sharma, S., Entian, K. D., Lafontaine, D. L. J., & Bohnsack, M. T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biology*, 14(9), 1138.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259781>
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), 731.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.01.042>
- Song, M. J., Yoo, E. H., Lee, K. O., Kim, G. N., Kim, H. J., Kim, S. Y. H., & Kim, S. Y. H. (2010). A novel initiation codon mutation in the ribosomal protein S17 gene (RPS17) in a patient with Diamond-Blackfan anemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 54(4), 629–631.
<https://doi.org/10.1002/PBC.22316>
- Song, Y., Zhang, Z., Yu, X., Yan, M., Zhang, X., Gu, S., Stuart, T., Liu, C., Reiser, J., Zhang, Y., & Chen, Y. (2006). Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Developmental Dynamics*, 235(5), 1334–1346.
<https://doi.org/10.1002/DVDY.20717>
- Sornjai, W., Lithanatudom, P., Eroles, J., Joly, P., Francina, A., Hacot, S., Fucharoen, S., Svasti, S., Diaz, J. J., Mertani, H. C., & Smith, D. R. (2017). Hypermethylation of 28S ribosomal RNA in β -thalassemia trait carriers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 728–734. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.10.039>
- Stoneley, M., Paulin, F. E. M., Le Quesne, J. P. C., Chappell, S. A., & Willis, A. E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, 16(3), 423–428. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201763>
- Strizzi, L., Bianco, C., Normanno, N., Seno, M., Wechselberger, C., Wallace-Jones, B., Khan, N. I., Hirota, M., Sun, Y., Sanicola, M., & Salomon, D. S. (2004). Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *Journal of Cellular Physiology*, 201(2), 266–276.
<https://doi.org/10.1002/JCP.20062>
- Stults, D. M., Killen, M. W., Pierce, H. H., & Pierce, A. J. (2008). Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Research*, 18(1), 13.

<https://doi.org/10.1101/GR.6858507>

- Su, H., Xu, T., Ganapathy, S., Shadfan, M., Long, M., Huang, T. H. M., Thompson, I., & Yuan, Z. M. (2013). Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene*, *33*(11), 1348–1358. <https://doi.org/10.1038/ONC.2013.89>
- Sugihara, Y., Honda, H., Lida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., & Nadano, D. (2010). Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *Journal of Proteome Research*, *9*(3), 1351–1366. https://doi.org/10.1021/PR9008964/SUPPL_FILE/PR9008964_SI_002.XLS
- Sulima, S. O., Kampen, K. R., & De Keersmaecker, K. (2019). Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS8030229>
- Tang, G., Zeng, Z., Sun, W., Li, S., You, C., Tang, F., Peng, S., Ma, S., Luo, Y., Xu, J., Tian, X., Zhang, N., Gong, Y., & Xie, C. (2019). Small Nucleolar RNA 71A Promotes Lung Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion via MAPK/ERK Pathway. *Journal of Cancer*, *10*(10), 2261. <https://doi.org/10.7150/JCA.31077>
- Tang, Y., Durand, S., Dalle, S., & Caramel, J. (2020). EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers*, *12*(8), 2154. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12082154>
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Yamauchi, Y., Hirota, K., Nakayama, H., Takahashi, N., & Isobe, T. (2018). Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Research*, *46*(18), 9289. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY811>
- Tassabehji, M. (2003). Williams–Beuren syndrome: a challenge for genotype–phenotype correlations. *Human Molecular Genetics*, *12*(suppl_2), R229–R237. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDG299>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, *2*(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/NRC822>
- Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature Cell Biology*, *2*(5), E71–E72. <https://doi.org/10.1038/35010581>
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance.

Journal of Cell Science, 126(21), 4815–4821. <https://doi.org/10.1242/jcs.111948>

- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J. M., Díez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J. C., & De La Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & Development*, 18(1), 99–115. <https://doi.org/10.1101/GAD.276304>
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., & Hurt, E. C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *The EMBO Journal*, 10(3), 573. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB07984.X>
- Tollervey, David, Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., & Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72(3), 443–457. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90120-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90120-F)
- Tong, Z. T., Cai, M. Y., Wang, X. G., Kong, L. L., Mai, S. J., Liu, Y. H., Zhang, H. B., Liao, Y. J., Zheng, F., Zhu, W., Liu, T. H., Bian, X. W., Guan, X. Y., Lin, M. C., Zeng, M. S., Zeng, Y. X., Kung, H. F., & Xie, D. (2011). EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene*, 31(5), 583–594. <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.254>
- Tran, H. D., Luitel, K., Kim, M., Zhang, K., Longmore, G. D., & Tran, D. D. (2014). Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Research*, 74(21), 6330–6340. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0923>
- Trecek, O., Juhasz-Boess, I., Lattrich, C., Horn, F., Goerse, R., & Ortmann, O. (2008). Effects of exon-deleted estrogen receptor β transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 110(3), 507–520. <https://doi.org/10.1007/S10549-007-9749-7/FIGURES/5>
- Trecek, O., Pfeiler, G., Horn, F., Federhofer, B., Houlihan, H., Vollmer, A., & Ortmann, O. (2007). Novel estrogen receptor beta transcript variants identified in human breast cancer cells affect cell growth and apoptosis of COS-1 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), 50–60. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2006.10.003>
- Truitt, M. L., & Ruggero, D. (2016). New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nature Reviews Cancer*, 16(5), 288. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.27>

- Uechi, T., Nakajima, Y., Nakao, A., Torihara, H., Chakraborty, A., Inoue, K., & Kenmochi, N. (2006). Ribosomal Protein Gene Knockdown Causes Developmental Defects in Zebrafish. *PLoS ONE*, *1*(1), e37. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000037>
- Vallés, A. M., Boyer, B., Tarone, G., & Thiery, J. P. (2009). $\alpha 2\beta 1$ Integrin is Required for the Collagen and FGF-1 Induced Cell Dispersion in a Rat Bladder Carcinoma Cell Line. *Cell Adhesion and Communication*, *4*(3), 187–199. <https://doi.org/10.3109/15419069609014222>
- Van Riggelen, J., Yetil, A., & Felsher, D. W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature Reviews Cancer*, *10*(4), 301–309. <https://doi.org/10.1038/nrc2819>
- Van Spaendonk, R. M. L., Ramesar, J., Van Wigcheren, A., Eling, W., Beetsma, A. L., Van Gemert, G. J., Hooghof, J., Janse, C. J., & Waters, A. P. (2001). Functional Equivalence of Structurally Distinct Ribosomes in the Malaria Parasite, *Plasmodium berghei*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 22638–22647. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101234200>
- Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S., Tribulo, C., & Aybar, M. J. (2018). Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Developmental Biology*, *444*, S110–S143. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.05.013>
- Voit, R., & Grummt, I. (2001). Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(24), 13631. <https://doi.org/10.1073/PNAS.231071698>
- Voit, Renate, Hoffmann, M., & Grummt, I. (1999). Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *The EMBO Journal*, *18*(7), 1891. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.7.1891>
- Wang, J., Scully, K., Zhu, X., Cai, L., Zhang, J., Prefontaine, G. G., Krones, A., Ohgi, K. A., Zhu, P., Garcia-Bassets, I., Liu, F., Taylor, H., Lozach, J., Jayes, F. L., Korach, K. S., Glass, C. K., Fu, X. D., & Rosenfeld, M. G. (2007). Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*, *446*(7138), 882–887. <https://doi.org/10.1038/NATURE05671>
- Wang, Y., Wu, Y., Xiao, K., Zhao, Y., Lv, G., Xu, S., & Wu, F. (2019). RPS24c Isoform

- Facilitates Tumor Angiogenesis Via Promoting the Stability of MVIH in Colorectal Cancer . *Current Molecular Medicine*, 20(5), 388–395.
<https://doi.org/10.2174/1566524019666191203123943>
- Warner, J. R., & McIntosh, K. B. (2009). How Common are Extra-ribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Molecular Cell*, 34(1), 3.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.03.006>
- Watanabe-Susaki, K., Takada, H., Enomoto, K., Miwata, K., Ishimine, H., Intoh, A., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Sugino, H., Asashima, M., & Kurisaki, A. (2014). Biosynthesis of Ribosomal RNA in Nucleoli Regulates Pluripotency and Differentiation Ability of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*, 32(12), 3099–3111.
<https://doi.org/10.1002/STEM.1825>
- Weber, H. J. (1972). Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, 119(3), 233–248.
<https://doi.org/10.1007/BF00333861>
- Wehrle-Haller, B. (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), 569–581. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2012.06.010>
- 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. J., Qian, S.-B. B., Staudt, L. M., ... Yewdell, J. W. (2019). Ribosomal Proteins Regulate MHC Class I Peptide Generation for Immunosurveillance. *Molecular Cell*, 73(6), 1162–1173.e5.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.12.020>
- White, E. S., Baralle, F. E., & Muro, A. F. (2008). New insights into form and function of fibronectin splice variants. *The Journal of Pathology*, 216(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/PATH.2388>
- White, R. J. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1), 69–78. <https://doi.org/10.1038/nrm1551>
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome Structure and Function. *Perspectives in Biology*, 3(7), a003707. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A003707>
- Willis, B. C., & Borok, Z. (2007). TGF- β -induced EMT: Mechanisms and implications for

- fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(3), 525–534. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00163.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH50100750000001.JPEG>
- Wong, H. L. X., Cao, R., Jin, G., Chan, K. M., Cao, Y., & Zhou, Z. (2012). When MT1-MMP meets ADAMs. *Cell Cycle*, 11(15), 2793–2798. <https://doi.org/10.4161/CC.20949>
- Wu, L.-M., Wang, S.-Y., Wang, S.-X., Huang, Y.-M., & Li, J.-G. (2010). [Proliferation promotion and apoptotic inhibition effects of ribosomal protein RPL36A small interference RNA on U937 cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 18(2), 344–349. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416165>
- Wu, S., Liu, S., Liu, Z., Huang, J., Pu, X., Li, J., Yang, D., Deng, H., Yang, N., & Xu, J. (2015). Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123976>
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology*, 214(2), 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Xu, Y. Y., Lee, D. K., Feng, Z., Xu, Y. Y., Bu, W., Li, Y., Liao, L., & Xu, J. (2017). Breast tumor cell-specific knockout of Twist1 inhibits cancer cell plasticity, dissemination, and lung metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(43), 11494–11499. https://doi.org/10.1073/PNAS.1618091114/SUPPL_FILE/PNAS.1618091114.SAPP.PDF
- Xue, S., & Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 355–369. <https://doi.org/10.1038/nrm3359>
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., & Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *The EMBO Journal*, 31(1), 110–123. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.364>
- Yang, H.-S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., Lockett, S. J., Sonenberg, N., & Colburn, N. H. (2003). The Transformation Suppressor Pcd4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 26. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.26-37.2003>

- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R. J. Y., Kalcheim, C., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*, *117*(7), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- 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., Chang, S. Y., Lee, O. K. S., & Wu, K. J. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial–mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, *12*(10), 982–992. <https://doi.org/10.1038/NCB2099>
- Yi, Y., Li, Y., Meng, Q., Li, Q., Li, F., Lu, B., Shen, J., Fazli, L., Zhao, D., Li, C., Jiang, W., Wang, R., Liu, Q., Szczepanski, A., Li, Q., Qin, W., Weiner, A. B., Lotan, T. L., Ji, Z., ... Cao, Q. (2021). A PRC2-independent function for EZH2 in regulating rRNA 2'-O methylation and IRES-dependent translation. *Nature Cell Biology*, *23*(4), 341. <https://doi.org/10.1038/S41556-021-00653-6>
- Yoon, A., Peng, G., Brandenburg, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., & Ruggero, D. (2006). Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science*, *312*(5775), 902–906. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1123835/SUPPL_FILE/YOON.SOM.PDF
- Young, S. K., & Wek, R. C. (2016). Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(33), 16927. <https://doi.org/10.1074/JBC.R116.733899>
- 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., Conannon, K. F., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, *339*(6119), 580–584.

<https://doi.org/10.1126/science.1228522>

- Yu, Y., Ji, H., Doudna, J. A., & Leary, J. A. (2005). Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: Native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Science*, *14*(6), 1438–1446. <https://doi.org/10.1110/PS.041293005>
- Zeisberg, M., Maeshima, Y., Mosterman, B., & Kalluri, R. (2002). Renal Fibrosis: Extracellular Matrix Microenvironment Regulates Migratory Behavior of Activated Tubular Epithelial Cells. *The American Journal of Pathology*, *160*(6), 2001–2008. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61150-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61150-9)
- Zentner, G. E., Balow, S. A., & Scacheri, P. C. (2014). Genomic characterization of the mouse ribosomal DNA locus. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *4*(2), 243–254. <https://doi.org/10.1534/G3.113.009290>
- Zgadza, Y., Kolosova, O., Stetsenko, A., Wu, C., Bruchlen, D., Usachev, K., Validov, S., Jenner, L., Rogachev, A., Yusupova, G., Sachs, M. S., Guskov, A., & Yusupov, M. (2022). E-site drug specificity of the human pathogen *Candida albicans* ribosome. *Science Advances*, *8*(21), 1062. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABN1062>
- Zhai, W., & Comai, L. (2000). Repression of RNA Polymerase I Transcription by the Tumor Suppressor p53. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(16), 5930. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.16.5930-5938.2000>
- Zhan, Y., Fujino, A., MacLaughlin, D. T., Manganaro, T. F., Szotek, P. P., Arango, N. A., Teixeira, J., & Donahoe, P. K. (2006). Müllerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression. *Development*, *133*(12), 2359–2369. <https://doi.org/10.1242/DEV.02383>
- Zhang, J., & Ma, L. (2012). MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *31*(3–4), 653–662. <https://doi.org/10.1007/S10555-012-9368-6>
- Zhao, J., Li, Y., Wang, C., Zhang, H., Zhang, H., Jiang, B., Guo, X., & Song, X. (2020). IRESbase: A Comprehensive Database of Experimentally Validated Internal Ribosome Entry Sites. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *18*(2), 129–139. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2020.03.001>

- Zheng, D., Zhang, J., Ni, J., Luo, J., Wang, J., Tang, L., Zhang, L., Wang, L., Xu, J., Su, B., & Chen, G. (2015). Small nucleolar RNA 78 promotes the tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-015-0170-5>
- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C. C., Lebleu, V. S., & Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525–530. <https://doi.org/10.1038/NATURE16064>
- Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., & Hung, M. C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 6(10), 931–940. <https://doi.org/10.1038/NCB1173>
- Zhou, F., Aroua, N., Liu, Y., Rohde, C., Cheng, J., Wirth, A. K., Fijalkowska, D., Göllner, S., Lotze, M., Yun, H., Yu, X., Pabst, C., Sauer, T., Oellerich, T., Serve, H., Röllig, C., Bornhäuser, M., Thiede, C., Baldus, C., ... Müller-Tidow, C. (2022). A Dynamic rRNA Ribomethylome Drives Stemness in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discovery*, 13(2), 332. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0210>
- Zhou, F., Liu, Y., Rohde, C., Pauli, C., Gerloff, D., Köhn, M., Misiak, D., Bäumer, N., Cui, C., Göllner, S., Oellerich, T., Serve, H., Garcia-Cuellar, M. P., Slany, R., Maciejewski, J. P., Przychodzen, B., Seliger, B., Klein, H. U., Bartenhagen, C., ... Müller-Tidow, C. (2017). AML1-ETO requires enhanced C/D box snoRNA/RNP formation to induce self-renewal and leukaemia. *Nature Cell Biology*, 19(7), 844–855. <https://doi.org/10.1038/ncb3563>
- Zhu, J., Carman, C. V., Kim, M., Shimaoka, M., Springer, T. A., & Luo, B. H. (2007). Requirement of α and β subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood*, 110(7), 2475. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-03-080077>