



HAL
open science

Contrôle de la différenciation érythroïde terminale : implication de la biogenèse des ribosomes

Salomé Le Goff

► **To cite this version:**

Salomé Le Goff. Contrôle de la différenciation érythroïde terminale : implication de la biogenèse des ribosomes. Hématologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCB061 . tel-04652375

HAL Id: tel-04652375

<https://theses.hal.science/tel-04652375>

Submitted on 18 Jul 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.

Université Paris Descartes (Paris V)

École doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (HOB, ED 561)

Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité Hématologie

**Contrôle de la différenciation érythroïde terminale :
Implication de la biogenèse des ribosomes**

Salomé Le Goff

Equipe « Hématopoïèse normale et pathologique »
Département Développement, Reproduction et Cancer
Institut Cochin, INSERM U1016, Paris

Co-directeurs de thèse : Pr Michaela Fontenay
Dr Patrick Mayeux

Présentée et soutenue publiquement le 17 juin 2019

Jury :

Dr Jean-Jacques Diaz	Rapporteur
Dr Sandrina Kinet	Rapporteur
Dr Stefano Fumagalli	Examineur
Pr Lydie Da Costa	Examineur
Pr Pierre-Emmanuel Gleizes	Examineur

Remerciements

Ces trois ans et demi de thèse passés à l'Institut Cochin furent riches en enseignements, rencontres et surtout en émotions. Je souhaite adresser ici ma reconnaissance aux nombreuses personnes qui m'ont accompagnée pendant ces années et qui ont contribué au bon déroulé de ces travaux.

En premier lieu, je souhaite exprimer ma gratitude aux membres du jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie le Docteur Jean-Jacques Diaz et le Docteur Sandrina Kinet, rapporteurs de ce travail, pour avoir pris le temps d'examiner mon manuscrit de thèse. Je remercie également le Docteur Stefano Fumagalli et les Professeurs Lydie Da Costa et Pierre-Emmanuel Gleizes pour leur présence dans mon jury de thèse et pour l'apport de leur expertise scientifique.

Je remercie mes directeurs de thèse, le Professeur Michaela Fontenay et le Docteur Patrick Mayeux.

Michaela, je vous remercie de m'avoir donné la chance d'accéder à l'exercice de la thèse, et pour votre accompagnement tout au long de ces trois années et demie. J'ai beaucoup appris de votre enseignement. Votre détermination, votre rigueur et votre exigence à mon égard m'ont permis de progresser et de mener au mieux ce projet.

Patrick, je te remercie beaucoup pour l'aide précieuse que tu m'as apportée. Merci pour ta disponibilité et pour m'avoir laissé profiter de ta grande expertise scientifique lors de la thèse.

Je remercie tous ceux qui ont directement participé à ce travail :

Ismael, ce fut un réel plaisir de partager les projets ribosomes avec toi. Ta bienveillance et ta gentillesse à mon égard ont été d'un grand secours et j'espère te les avoir rendues. Merci de me communiquer continuellement ta passion pour la Science, que j'admire. Je te souhaite force et courage pour finir cette thèse à ton tour.

Isabelle Hatin, je vous remercie pour votre aide précieuse dans la réalisation des profils de polysomes. Merci également d'avoir suivi ma thèse dès le début grâce à votre participation lors des comités annuels. Mes journées passées à Orsay furent à chaque fois un bol d'air frais revigorant et nos longues discussions m'ont apporté beaucoup d'apaisement.

Marjorie, je te remercie pour ton efficacité dans le traitement de mes échantillons au sein de la plateforme de protéomique 3P5, pour ton aide et ta disponibilité lors de mes diverses interrogations.

Charlotte et Eric Soler, je vous remercie de m'avoir chaleureusement accueillie au CEA lors des expériences de ChIP-seq.

Je remercie enfin celles qui ont initié ce projet, Anna Raimbault, qui m'a accueillie dès mon arrivée au laboratoire et m'a transmis la bonne conduite à adopter auprès des érythroblastes, et Célia Floquet.

L'Institut Cochin est riche de ses diverses plateformes qui nous permettent d'accéder à des technologies de qualité. En particulier, merci à tous les membres de la plateforme de cytométrie (CYBIO), de protéomique (3P5), de génomique (GENOM'IC), d'imagerie photonique (IMAG'IC), et d'imagerie cellulaire pour leur aide experte.

Merci au laboratoire d'excellence GR-Ex et la Société Française d'Hématologie qui ont financé ma thèse.

Je remercie vivement tous les membres de l'ancienne équipe Mayeux/Bouscary. Le 7^{ème} étage du bâtiment Gustave Roussy fut un cocon chaleureux et inoubliable, où se sont mêlées de nombreuses personnalités :

Merci à tous les chercheurs de l'équipe, Yaël Zermati, Frédérique Verdier, Frédéric Pendino, Isabelle Dusanter, Evelyne Lauret, Olivier Kosmider, Nicolas Chapuis et Jérôme Tamburini, pour votre aide quotidienne et vos conseils avisés. En particulier, Yaël, merci pour ton soutien scientifique mais surtout pour ton soutien psychologique ! Nos confessions me manquent depuis que tu es partie mais je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle équipe de recherche. Frédérique et Frédéric, merci pour votre gentillesse et votre constante bonne humeur au labo. Merci également à Lamya, pour ta sérénité et ton calme à toute épreuve. Vous avez tous les quatre grandement contribué à apporter douceur et rires à ces années de thèse.

Lilia, merci de veiller sur tes « petits » au labo et d'apporter volontiers ton réconfort. Merci aussi pour ton enthousiasme constant, et ton aide lors des productions virales.

Alice, merci pour ton esprit sarcastique et ta joie de vivre. Merci aussi d'avoir été l'organisatrice officielle des événements festifs du labo.

Shanti, merci d'avoir été souvent arrangeante dans le partage des hottes du L2, ou des postes de la pièce Filo.

Je remercie les chercheurs post-doctorantes du laboratoire. Émilie-Fleur et Sarah, merci pour votre présence au début de ma thèse, et de m'avoir souvent aiguillée dans le laboratoire.

Carine, merci énormément d'avoir veillé sur Sabrina et moi. Les derniers mois de thèse, j'ai pris place tes côtés et je ne te remercierai jamais assez d'avoir épongé et temporisé mes humeurs. Ton calme et ton pragmatisme à toute épreuve sont admirables. Je te remercie aussi d'avoir lu et apporté tes corrections à ma thèse.

Camille, je suis contente d'avoir eu l'occasion de te rencontrer. Tu es très drôle et sympathique et je suis sûre que tu vas contribuer à perpétuer la bonne humeur dans le bureau !

Je remercie très chaleureusement chacun de mes co-doctorants. C'est une chance unique que j'ai eue d'avoir partagé tout mon parcours de thèse avec vous ! Je vous remercie tous autant que vous êtes pour avoir apporté de la joie, de l'amitié, et beaucoup de fous rires à cette thèse.

Sabrina, ma superbe co-thésarde. Te rencontrer fut l'une des plus belles choses de la thèse. Derrière ton humour et ta spontanéité, j'ai découvert une femme sensible, attachante, et généreuse en amitié. On a partagé toute notre vie pendant la thèse et je te remercie infiniment pour ta présence à mes côtés, au labo, et surtout ailleurs.

Fetta, je suis admirative de ton parcours et ton courage. Merci pour ta douceur, ta délicatesse, et pour ton amitié réconfortante. Depuis toutes les pièces du labo jusqu'à la salle de sport et en passant par les restaurants, merci pour tous les réjouissants moments passés avec ensemble, et, comme pour Sabrina, je sais qu'il y en aura plein d'autres.

Meriem, tu fais partie de ces rencontres marquantes de la thèse. Je te remercie pour ta gentillesse, et tous les fous rires que l'on a partagés. Nos longues discussions sur la vie, nos séances shopping et coiffeur sur internet me manquent beaucoup ! Je souhaite que tu sois heureuse de l'autre côté de la Méditerranée, et j'espère que l'on se reverra bientôt pour un voyage avec les filles.

Justine, tu es la délicatesse incarnée. Ta sensibilité et ta subtilité sont belles et je te remercie d'avoir fait partie avec moi du côté angélique du bureau, quoique... pas si ange que ça ! Mais c'est comme ça qu'on t'aime.

Pierre, avec toi j'ai tant rigolé et beaucoup trop fort ! Notre passion commune des restaurants en tous genres a égayé mes midis. Merci pour ta simplicité et pour la belle complicité que l'on a développé et qui ne faiblit pas.

Adrien, derrière cet esprit pragmatique et éclairé se cache un grain de folie qui a provoqué tant de fous rires dans le bureau. Merci pour ces moments hilarants qui sont gravés.

Gabriel, ton écoute attentive et ta compassion ont été salvateurs à bien des moments ! Merci pour ta gentillesse, ton amitié et ton soutien continu au cours de la thèse.

Cyrielle, tu es si adorable et attachante. Merci pour tous nos échanges, ton réconfort quand je me plains (souvent) et tes bras grands ouverts ! Je te souhaite un grand courage et de la force pour finir la thèse à ton tour.

Rudy, heureusement que tu es là pour nous faire dédramatiser la thèse. Tes blagues répétitives et inlassables m'ont fait rire beaucoup trop facilement. Avec Johanna, vous formez un très beau duo, généreux, bienveillant et brillant.

Charles, tu es le plus calme et le plus serein d'entre nous ! Merci d'avoir offert au bureau un nouveau terrain de jeu et de contribuer à la bonne humeur du labo.

Godelieve, merci pour ta gentillesse et ta générosité extrême. Je te souhaite tout le meilleur dans ta vie personnelle et professionnelle.

Samia, qui vient d'arriver au bureau avec Amandine et Sandra. Même si on est parfois un peu serrées, on s'est bien adaptées et il était agréable de partager les derniers mois de thèse avec vous et Zubaydan.

Merci à tous les stagiaires de passage au labo, qui chaque année, contribuent à l'atmosphère agréable du 7^{ème} étage : El Hassan, Axel, Agathe, Tony, Florian, Myriam, Sylvain, Sophie, Clarisse et tous les autres.

Je remercie infiniment mes proches, amis et famille qui m'ont accompagnée pendant toutes mes études, en particulier :

J'ai une pensée pour Antonin, Marina et toute la B. team. Merci Antonin de m'encourager constamment et pour ton amitié depuis toutes ces années.

Merci également en particulier à Nidal, car depuis la fac on a tous les deux réalisé un beau parcours, et je sais que je peux toujours compter sur toi.

Élodie, merci pour ta présence et pour tous les moments que l'on a passé ensemble, à la maison, à Paris, et à l'autre bout de la Méditerranée. Tu es drôle et attachante et j'aime beaucoup discuter de tout avec toi.

Je tiens à remercier Frédéric, mon éternel Professeur de piano, car même si la thèse a fini par m'éloigner un peu de ma passion première, les séances pianistiques et philosophiques au

Conservatoire me manquent énormément et je n'ai nul doute que l'on aura l'occasion de les reprendre d'une manière ou d'une autre.

Merci Sandra, ma tante qui me laissait jouer petite en tapotant quelques phrases de sa thèse à l'ordinateur, sous sa dictée. Quelque part c'est toi qui m'as ouvert la voie ! Tu es un modèle de force et de réussite pour moi. Merci à mon oncle Stéphane pour toujours me remettre à ma place, et me rappeler que la thèse ne m'exempte pas de mes devoirs domestiques. Merci à ma petite cousine Sarah, pour nos discussions passionnantes et éclairées, et à mes petits cousins Raphael et Charlie d'apporter de la fraîcheur et de la jovialité aux réunions de famille.

Je remercie aussi en particulier mon oncle Alain, qui s'attache toujours à faire plaisir à son entourage. Merci pour ta générosité, et ta prévenance. Merci aussi de m'avoir beaucoup trop nourrie de gâteaux pendant la rédaction de la thèse.

Mamie Hélène, je te remercie pour ta gentillesse et pour tous les bons moments que l'on a passé ensemble. Merci pour ton dévouement envers tes enfants et tes petits-enfants.

Mes grands parents Simone et Meyer. Vous êtes les personnes les plus fantastiques que je connaisse. Mamie, tu as toujours raison sur tout, et il n'y a pas plus juste que toi. Papy, tu as tellement de savoir et j'adore écouter toutes tes belles histoires. Merci à tous les deux de m'avoir couverte d'amour et de bienveillance depuis toujours. Je vous aime énormément.

Mes parents, je vous dois absolument tout. C'est vous qui m'avez donné les moyens d'arriver jusque là. Maman, merci d'être aussi simple et constante. Tu es un magnifique exemple pour moi. Papa, merci pour ton immense gentillesse et générosité envers tes enfants, et merci de t'intéresser autant à mes péripéties du labo. Merci pour la confiance que vous m'accordez toujours, c'est chez vous que j'ai puisé toute la motivation de finir cette thèse. Ma reconnaissance envers vous est infinie et je vous aime tous les deux plus que tout. Cette thèse vous est entièrement dédiée.

Mes derniers remerciements vont à mes trois petits frères chéris, Nathan, Samuel, et Jonas. Vous êtes ma petite équipe, mes meilleurs amis et je suis très fière d'avoir trois frères aussi géniaux que vous. Nathan, le plus grand de mes petits frères. Tu es un homme d'une gentillesse et d'une sensibilité rare. Tu es rempli d'amour et je te remercie d'en inonder tes proches. Samuel, tu vas bientôt entrer dans la vie d'adulte mais tu as déjà acquis une grande maturité. Tu es doté d'une grande droiture et tu suis tes convictions avec une assurance épatante. Enfin, Jonas, le grand petit dernier de la fratrie. Depuis que tu es né tu me remplis de joies. Tu es un grand garçon fantastique et doté d'un courage exemplaire. À vous trois, il est beau de savoir que nous pourrons toujours compter les uns sur les autres. Merci enfin pour votre amour, votre soutien indéfectible et inestimable, et sachez qu'il sera à jamais réciproque.

Résumé

La biogenèse du ribosome est un processus complexe qui assure la synthèse protéique indispensable à la croissance et la prolifération cellulaire. Les ribosomopathies telles que l'anémie de Blackfan-Diamond et le syndrome myélodysplasique 5q- sont associées à une mutation ou une délétion d'un gène codant une protéine ribosomique. Le symptôme dominant de ces deux pathologies est une anémie hypoplasique. Pour comprendre le tropisme érythroïde des ribosomopathies, nous avons étudié la biogenèse des ribosomes et les conséquences de son inhibition au cours de l'érythropoïèse humaine normale.

D'une part, nous avons déterminé la cinétique de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse. Pour cela, nous avons développé une technique de protéomique (Pulse Silac) permettant l'identification et la quantification du renouvellement des protéines ribosomiques au sein d'échantillons d'érythroblastes primaires humains. Ainsi, nous avons mis en évidence un effondrement de la biogenèse des ribosomes à partir du stade érythroblaste basophile. L'inhibition prématurée de la biogenèse du ribosome dans les précurseurs immatures grâce à un inhibiteur spécifique de l'ARN pol I, le CX-5461, conduit à une accélération de la différenciation érythroïde. Ces résultats soulignent un rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'érythropoïèse. Puis, nous avons exploré les déterminants de la différenciation érythroïde lorsque la biogenèse des ribosomes s'arrête. Nous observons que cet arrêt est concomitant à une activation de la protéine p53 et de ses gènes cibles spécifiquement impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans l'arrêt du cycle cellulaire, identifiés par ChIP-seq. Enfin, nous avons exploré le mécanisme d'activation de p53 lors de l'arrêt de la biogenèse des ribosomes. La phosphorylation de CHK1 sur la sérine 345, concomitante à l'activation de p53, et l'inhibition de l'activation de p53 par un inhibiteur spécifique d'ATR suggèrent l'implication de la voie de réparation ATR/CHK1/p53. De plus, au cours de la différenciation érythroïde, la structure du nucléole, lieu de biogenèse du ribosome, évolue de nucléoles actifs vers un micronucléole inactif. Ces résultats suggèrent que la différenciation érythroïde pourrait provoquer un stress nucléolaire induisant l'activation de la voie de réparation ATR/CHK1/p53 et un arrêt du cycle cellulaire.

En parallèle, deux modèles mimant le syndrome 5q- ont été développés dans les lignées cellulaires UT-7/EPO et K562, dont l'expression du gène codant la protéine ribosomique *RPS14* est ciblée par stratégie shARN. La diminution d'expression de *RPS14* conduit à une réduction de moitié du contenu cellulaire en ribosomes et une traduction sélective au détriment du facteur de transcription érythroïde majeur GATA1. Afin d'explorer les paramètres qui gouvernent la traduction globale dans ces modèles, nous avons analysé les transcrits exprimés sur les polysomes. Ainsi, il apparaît que les transcrits caractérisés par une courte séquence, avec une extrémité 3'UTR hautement structurée, et un

taux élevé de codons optimaux sont les plus affectés en terme d'efficacité de traduction. De plus, une analyse intégrée du transcriptome et du protéome des cellules UT-7/EPO sh*RPS14* confirme que la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes est directement liée à ces critères de sélectivité de traduction. Par ailleurs, nous avons étudié la régulation de la traduction au cours de l'érythropoïèse normale. Nous montrons que les protéines les plus abondantes dans les stades érythroïdes matures correspondent à des transcrits de courte séquence, et avec un taux élevé de codons optimaux. Ces résultats indiquent que les transcrits codant pour les protéines qui s'accumulent au cours de l'érythropoïèse possèdent des caractéristiques optimales pour la traduction en conditions physiologiques, mais qui s'avèrent délétères en condition de disponibilité limitée en ribosomes.

En conclusion, ces travaux montrent que la biogenèse des ribosomes diminue au cours de l'érythropoïèse et semble contrôler la différenciation érythroïde terminale. La voie de réparation impliquant la kinase CHK1 et p53 participe à la régulation de la différenciation érythroïde terminale. Nous avons également montré que l'haploinsuffisance de la protéine RPS14 conduit à une sélectivité de la traduction au détriment des transcrits courts, très structurés et présentant une proportion élevée de codons optimaux.

Abstract

Ribosome biogenesis is the complex process ensuring protein synthesis, which is essential for cell growth and proliferation. Ribosomopathies such as Blackfan-Diamond anemia and acquired 5q-myelodysplastic syndrome are caused by ribosomal protein-coding gene mutation or deletion. The major symptom of these two pathologies is hypoplastic anemia. To understand the erythroid tropism of ribosomopathies, we studied ribosome biogenesis and the consequences of its inhibition during normal human erythropoiesis.

We first determined the kinetic of ribosome biogenesis during erythropoiesis. For this, we developed a proteomic technique (Pulse Silac) allowing identification and quantification of ribosomal protein renewal in human primary erythroblasts. We show that ribosome biogenesis collapses from the basophilic erythroblast stage onwards. Premature inhibition of ribosome biogenesis in immature precursors by a RNA pol I specific inhibitor, CX-5461, leads to an acceleration of erythroid differentiation. These results highlight the role of ribosome biogenesis in erythropoiesis. Then, we explored determinants of erythroid differentiation while ribosome biogenesis is stops. We observe that ribosome biogenesis arrest is concomitant with an activation of the p53 protein, and its related target genes specifically which are involved in DNA damage response and cell cycle arrest are activated, as identified by ChIP-seq. Finally, we explored the mechanisms upstream of p53 activation upon ribosome biogenesis inhibition. We show that CHK1 activation is concomitant with p53 activation, and inhibition of p53 activation by a specific ATR inhibitor suggests the involvement of the ATR/CHK1/p53 repair pathway during erythropoiesis. In addition, the structure of the nucleolus, major site for ribosome biogenesis, evolves from active nucleoli to an inactive micronucleolus during erythroid differentiation. These results suggest that erythroid differentiation could induce nucleolar stress that triggers ATR/CHK1/p53 repair pathway activation and cell cycle arrest.

In addition, two models mimicking the 5q- syndrome have been developed in the UT-7/EPO and K562 cell lines, whose ribosomal protein gene *RPS14* expression was targeted by shRNA strategy. Decreased expression of *RPS14* leads to a decrease of ribosome cellular content by half and selective translation at the expense of the major erythroid transcription factor GATA1. In order to explore the parameters that govern global translation in these models, we analyzed transcripts bound on polysomes. This analysis suggests that short length transcripts, with a highly structured 3'UTR, and a high proportion of optimal codons are the most affected in translation efficiency. In addition, the integrated analysis of transcriptomic and proteomic data generated in UT-7/EPO sh*RPS14* cells confirms that post-transcriptional regulation of gene expression is directly related to these selective criteria of translation. In addition, we studied translation regulation during normal erythropoiesis. We showed that most abundant proteins in mature erythroid stages correspond to short-sequence

transcripts, with a high rate of optimal codons. These results indicate that these transcripts possess optimal characteristics for an effective translation under normal conditions, but that those are deleterious under ribosome limited availability condition.

In conclusion, this work shows that ribosome biogenesis decreases during erythropoiesis and controls terminal erythroid differentiation. The repair pathway involving both the CHK1 kinase and p53 appears to regulate terminal erythroid differentiation. Also, we have shown that *RPS14* haploinsufficiency leads to translation selectivity at the expense of short and highly structured transcripts containing a high proportion of optimal codons.

Sommaire

Résumé.....	6
Abstract	8
Sommaire.....	10
Liste des abréviations	14
Liste des tableaux	17
Liste des figures	18
Introduction	20
I. Structure et biogenèse des ribosomes eucaryotes.....	21
A. Le ribosome.....	21
1. Structure et composition des ribosomes	21
2. Fonction des ribosomes et acteurs de la traduction	26
3. Mécanisme général de la traduction	28
a. Initiation de la traduction.....	28
- Initiation de la traduction coiffe dépendante	28
- Initiation de la traduction coiffe-idépendante	29
b. Elongation de la traduction.....	29
c. Terminaison de la traduction	30
d. Dissociation et recyclage du ribosome.....	31
4. Bases de la régulation de la traduction	33
a. Mécanismes de régulation de la traduction « en trans ».....	33
- L'inhibition du facteur eIF2.....	33
- L'inhibition du facteur eIF4E	34
b. Mécanismes de régulation de la traduction « en cis »	35
B. La biogenèse des ribosomes	37
1. Le nucléole, site de la biogenèse des ribosomes.....	38
2. La transcription de l'ADNr.....	41
3. La maturation des ARNr.....	44
4. Les modifications post-traductionnelles des ARNr	45
5. La synthèse des protéines ribosomiques.....	47
6. L'assemblage des sous-unités ribosomiques	48
C. La régulation de la biogenèse des ribosomes	49
1. Régulation croisée de la biogenèse des ribosomes et de la croissance cellulaire	49
a. La voie mTOR	50
- Le complexe mTORC1	50
- Le complexe mTORC2	54
b. L'axe de signalisation RAS/RAF/ERK	54

c.	Le facteur de transcription <i>c-Myc</i>	55
2.	Régulation croisée de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire	56
a.	Généralités sur le cycle cellulaire eucaryote	56
b.	La biogenèse des ribosomes au cours du cycle cellulaire	58
c.	Connexions entre le cycle cellulaire, la croissance et la biogenèse des ribosomes	60
3.	Les fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques (indépendamment de p53) 62	
a.	Stabilité et disponibilité des protéines ribosomiques libres	62
b.	Fonctions extra-ribosomiques des RPs dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes 63	
-	La régulation de <i>c-Myc</i> par les RPs	63
-	Le rétrocontrôle de l'expression des RPs	63
c.	Fonctions extra-ribosomiques des RPs dans la régulation de la transcription et de la traduction	64
II.	Physiologie de l'érythropoïèse humaine	66
A.	Vue d'ensemble de l'hématopoïèse humaine adulte	66
1.	Hiérarchie du système hématopoïétique et notion de CSH	66
2.	Régulation du système hématopoïétique	68
3.	Ontogenèse de l'hématopoïèse	69
B.	La différenciation érythroïde humaine	70
1.	L'érythropoïèse précoce	71
2.	L'érythropoïèse terminale : du proérythroblaste à l'érythroblaste acidophile	72
a.	Caractérisation morphologique et biochimique des érythroblastes	73
b.	Caractérisation des érythroblastes par les marqueurs de surface	74
c.	Évolution de l'expression génique au cours de l'érythropoïèse terminale	75
-	Au niveau transcriptomique	75
-	Au niveau protéique	76
d.	La modulation du cycle cellulaire	76
3.	La maturation du réticulocyte	77
C.	La régulation de l'érythropoïèse	78
1.	Régulation par les cytokines et facteurs de croissance	78
a.	Le SCF et son récepteur <i>c-KIT</i>	78
b.	L'EPO et son récepteur <i>EPO-R</i>	80
c.	Voies de signalisation activées en aval des récepteurs <i>c-KIT</i> et <i>EPO-R</i>	81
-	La voie <i>PI3K-AKT</i>	81
-	La voie <i>MAPK/ERK</i>	82
-	La voie <i>STAT</i>	83
d.	Synergie entre les récepteurs <i>c-KIT</i> et <i>EPO-R</i>	84
2.	Régulation au niveau transcriptionnel	85
a.	Le facteur de transcription <i>GATA-1</i>	86

b.	Les partenaires de GATA-1	88
3.	Régulation de l'érythropoïèse par les caspases.....	89
a.	Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes	89
b.	Rôle des caspases dans la régulation négative de l'érythropoïèse	91
III.	Le ribosome en pathologies	93
A.	Les ribosomopathies.....	93
1.	L'anémie de Blackfan-Diamond.....	94
2.	Le syndrome 5q-	97
B.	Les modèles physiopathologiques des ribosomopathies	99
1.	L'implication de la protéine p53 dans la physiopathologie des ribosomopathies	99
a.	Généralités sur la protéine p53	99
b.	Le rôle de la protéine p53 dans la régulation de la biogenèse des ribosomes	103
c.	Le stress ribosomique et l'activation de p53	106
-	Le stress ribosomique	106
-	La régulation de p53 par MDM2	106
-	La voie RP-MDM2-p53	107
-	L'activation de p53 indépendamment des RPs	111
d.	Activation de la voie de signalisation p53 dans les modèles de ribosomopathie.....	112
2.	La régulation du cycle cellulaire indépendamment de p53	113
a.	La régulation de E2F-1 par MDM2	113
b.	La régulation de c-Myc par les RPs	114
	Résultats	116
	Partie I : Cinétique de la biogenèse des ribosomes et régulation de la différenciation érythroïde normale.....	117
I.	Problématique.....	117
II.	Objectifs.....	118
III.	Résultats : manuscrit en préparation	119
IV.	Conclusion	179
	Partie II : La régulation de la biogenèse des ribosomes et de la traduction au cours de l'érythropoïèse pathologique	181
I.	Problématique.....	181
II.	Objectifs.....	182
III.	Résultats	183
IV.	Conclusion	231
	Discussion et Perspectives.....	233
I.	Discussion partie I :.....	234
A.	La biogenèse des ribosomes est régulée au cours de l'érythropoïèse.....	234
1.	La diminution de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse.....	234
2.	Le rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'érythropoïèse	235

3. Hypothèses des facteurs responsables de la diminution de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse	237
4. La diminution de la biogenèse des ribosomes : vers un mécanisme général de la différenciation ?.....	238
B. L'implication de la voie p53 au cours de l'érythropoïèse normale.....	239
1. La protéine p53 est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale	239
2. La protéine p53 régule le cycle cellulaire au cours de l'érythropoïèse	241
3. Différentiel de l'activation de p53 dans le contexte physiologique et dans le contexte pathologique	242
4. L'activation de p53 comme cible thérapeutique ?.....	244
C. La différenciation érythroïde induit un stress nucléolaire.....	246
1. Quel est le mécanisme en amont de l'activation de p53 ?.....	246
2. Un dommage à l'ADN ribosomique au cours de l'érythropoïèse ?.....	247
D. Le ribosome dans l'érythropoïèse normale et pathologique	248
II. Discussion partie II.....	251
A. La sélectivité de la traduction dans un contexte d'altération de la biogenèse des ribosomes	251
B. La spécificité de l'atteinte érythroïde dans les ribosomopathies.....	252
C. Un défaut de recyclage/ re-initiation ?	253
Bibliographie.....	256

Liste des abréviations

- 0...9 -

3'UTR	<i>3' Untranslated region</i>
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
5'TOP	<i>5' Terminal Oligopyrimidine</i>
5'UTR	<i>5' Untranslated region</i>

- A -

ABD	Anémie de Blackfan-Diamond
Acido-E	Erythroblastes acidophiles
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AGM	Aorte-gonades-mésonephros
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol I	ARN polymérase I
ARN pol II	ARN polymérase II
ARN pol III	ARN polymérase III
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique

- B -

Baso-E	Erythroblastes basophiles
BFU-E	<i>Burst Forming Unit-Erythroid</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>

- C -

CFU-E	<i>Colony Forming Unit-Erythroid</i>
CD	Cluster de différenciation
CF	Centre fibrillaire
CFD	Composant fibrillaire dense
CG	Composant granulaire
CLP	Progéniteurs communs lymphoïdes
CMN	Cellules mononucléées
CMP	Progéniteurs communs myéloïdes
CSH	Cellules souches hématopoïétiques

- E -

EPO	Erythropoïétine
EPOR	Récepteur à l'érythropoïétine
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ETS	<i>Externally Transcribed Sequence</i>

- G -

GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMP	Progéniteurs granulomonocytaires
GPA	Glycophorine A
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>

- H -

HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>

- I -

IL3	Interleukine 3
IL6	Interleukine 6
ITS	<i>Internally Transcribed Sequence</i>

- J,K -

JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
KO	<i>Knock-out</i>

- L -

LARP1	<i>La-related protein 1</i>
LMPP	Progéniteurs lympho-myéloïdes

- M -

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 protein</i>
MEP	Progéniteurs érythro-mégacaryocytaires
MGG	May-Grünwald Giemsa
MPP	Progéniteurs multipotents
mSCF	Forme membranaire du SCF
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>

- P -

p70S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PEM	Progéniteurs érythro-myéloïdes
PHD	Prolyl-hydroxylase
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>

PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol-triphosphate
Poly-E	Erythroblastes polychromatophiles
Pré-ARNm	ARN pré-messager
Pré-ARNr	Précurseur ARN ribosomique
Pro-E	Proérythroblastes

- R -

RBP	RNA binding protein
RNA-Seq	Séquençage de l'ARN
RP	Protéine ribosomique
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> , transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase
RT-qPCR	RT-PCR quantitative

- S -

SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SH2	<i>Src Homology domain 2</i>
SH3	<i>Src Homology domain 3</i>
SL1	<i>Selectivity Factor 1</i>
SMD	Syndrome myélodysplasique
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snoRNP	<i>small nucleolar Ribonucleoprotein</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
sSCF	Forme soluble du SCF
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>

- T, U -

TFR1	Récepteur à la transferrine de type 1 (TFRC, CD71)
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
UBF	<i>Upstream Binding Factor</i>

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des RPs de la sous-unité 40S humaine.	24
Tableau 2 : Liste des RPs de la sous-unité 60S humaine. Voir légende Tableau 1	25
Tableau 3 : Exemples de ribosomopathies et leurs caractéristiques moléculaires et cliniques.	94

Liste des figures

Figure 1 : Structure des deux sous-unités ribosomiques 40S et 60S humaines.	22
Figure 2 : Représentation des trois sites A, P et E de liaison aux l'ARNt et d'un ARNm au sein du ribosome 70S.	27
Figure 3 : Schéma général de la voie d'initiation de la traduction eucaryote.	32
Figure 4: Mécanisme de régulation de l'initiation de la traduction par 4E-BP1.....	35
Figure 5 : Vue d'ensemble de la biogenèse des ribosomes.....	38
Figure 6 : Organisation de l'ultrastructure du nucléole.....	40
Figure 7 : Organisation des répétitions en tandem des gènes de l'ADNr et composition du complexe de l'ARN pol I.	43
Figure 8 : Les étapes de la maturation des ARN ribosomiques.	45
Figure 9 : Structure des snoARN à boîte C/D et à boîte H/ACA, d'après (Kiss, 2002).	47
Figure 10 : Régulation de la biogenèse des ribosomes par le complexe mTORC1.	53
Figure 11 : La régulation de la succession des phases du cycle cellulaire et la cinétique de transcription de l'ADNr au cours du cycle.....	59
Figure 12 : Modèle classique de l'hématopoïèse humaine adulte.....	67
Figure 13 : Modèle revisité de l'hématopoïèse humaine adulte (d'après Notta et al., 2016). .	68
Figure 14 : Les différences vagues de l'érythropoïèse humaine au cours du développement embryonnaire et foetal (d'après Nandakumar et al., 2016).....	70
Figure 15 : Erythropoïèse humaine adulte.	71
Figure 16 : Un îlot érythroblastique	73
Figure 17 : Isolement et caractérisation des stades cellulaires de l'érythropoïèse terminale (d'après Hu et al., 2013).....	75
Figure 18 : Représentation schématique de l'activation du récepteur c-KIT par son ligand SCF et voies de signalisation associées.....	80
Figure 19 : Voies de signalisation activées en aval du récepteur EPO-R.	84
Figure 20 : Profils d'expression de GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse.	87
Figure 21 : Voie d'activation de la caspase 3 au cours de la différenciation érythroïde terminale.....	90
Figure 22 : La protéine chaperone HSP70 protège GATA-1 du clivage par les caspases au cours de l'érythropoïèse.	92

Figure 23 : Cytologie caractéristique d'un patient atteint du syndrome 5q-.....	97
Figure 24 : Domaines structuraux et fonctionnels d'un monomère de la protéine p53.	100
Figure 25 : Mécanisme général de l'activation de p53 en réponse à divers signaux de stress et conséquences cellulaires.	102
Figure 26 : Le rôle de p53 dans la régulation de la biogenèse des ribosomes	105
Figure 27 : L'axe de régulation RP-MDM2-p53 en réponse à un stress ribosomique.....	110
Figure 28 : Mécanisme de régulation du cycle cellulaire indépendant de p53.	114
Figure 29: La biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse humaine et murine.....	235
Figure 30 : Modèle d'élimination des ribosomes par l'enzyme UBE2O dans les réticulocytes (d'après (Nguyen et al., 2017)).	238
Figure 31 : Les modifications post-traductionnelles de la protéine p53 à la suite d'un dommage à l'ADN.	243

Introduction

I. Structure et biogenèse des ribosomes eucaryotes

Les ribosomes sont des complexes macromoléculaires qui assurent la synthèse protéique. Le processus de la biogenèse des ribosomes requiert la coordination de la synthèse de 4 ARN ribosomiques (ARNr), 80 protéines ribosomiques (RPs), plus de 300 facteurs non ribosomiques et plus de 200 petits ARN non codants appelés snoARN. Chez les eucaryotes, la majorité des étapes de la biogenèse des ribosomes prend place dans le nucléole.

A. Le ribosome

1. Structure et composition des ribosomes

En 1955, les ribosomes ont été observés pour la première fois par microscopie électronique par Georges Palade. Dans des cellules de pancréas de rat, il signala la présence de particules granulaires parsemées à la surface externe au réticulum endoplasmique et libres baignant dans le cytoplasme (Palade, 1955). Initialement appelés microsomes puis particules de Palade, les granules ont ensuite été renommés ribosomes par la révélation de leur composition riche en acide ribonucléique (ARN) au cours des années 1960. La découverte de ces particules valut à Georges Palade le prix Nobel de Physiologie ou Médecine, en 1974.

Pendant plusieurs décennies, la détermination de la structure tridimensionnelle des ribosomes a monopolisé les travaux des chercheurs structuraux. Le développement de méthodes couplant des techniques de cristallographie aux rayons X et de cryo-microscopie électronique (cryo-ME), a permis d'étudier les structures de complexes macromoléculaires avec un niveau de résolution très élevé, de l'ordre de l'atome. Ainsi, la première structure cristallographique des ribosomes a été élucidée chez les procaryotes par les équipes d'Ada Yonath, Thomas Steitz et Venkatraman Ramakrishnan qui ont été récompensées par le prix Nobel de chimie en 2009 (Ban et al., 2000; Schluzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). La structure du ribosome eucaryote de plus grande taille et complexité que le ribosome procaryote, a été déterminée en 2010 à partir de la levure *S. cerevisiae*. Les ribosomes ont été cristallisés puis analysés par spectrométrie aux rayons X, à une résolution atomique de 4,15 angströms (Å) (Ben Shem, 2010). En combinant les densités électroniques et les structures cristallographiques établies de ribosomes eucaryotes avec la prédiction des structures

secondaires des ARN ribosomiques humains, un modèle moléculaire complet de la structure du ribosome humain a été construit en 2013 (Anger et al., 2013). Plus récemment, en 2015, l'amélioration des méthodes de cristallographie et de microscopie électronique ont considérablement augmenté la résolution du ribosome humain des cellules HeLa, jusqu'à 2,9 angströms pour les régions analysées les plus stables (Khatter et al., 2015). Ces travaux fournissent des données essentielles sur le détail des interactions entre les différents composants ribosomiques et permettent d'améliorer la compréhension de leur rôle dans le ribosome et leur implication dans la traduction.

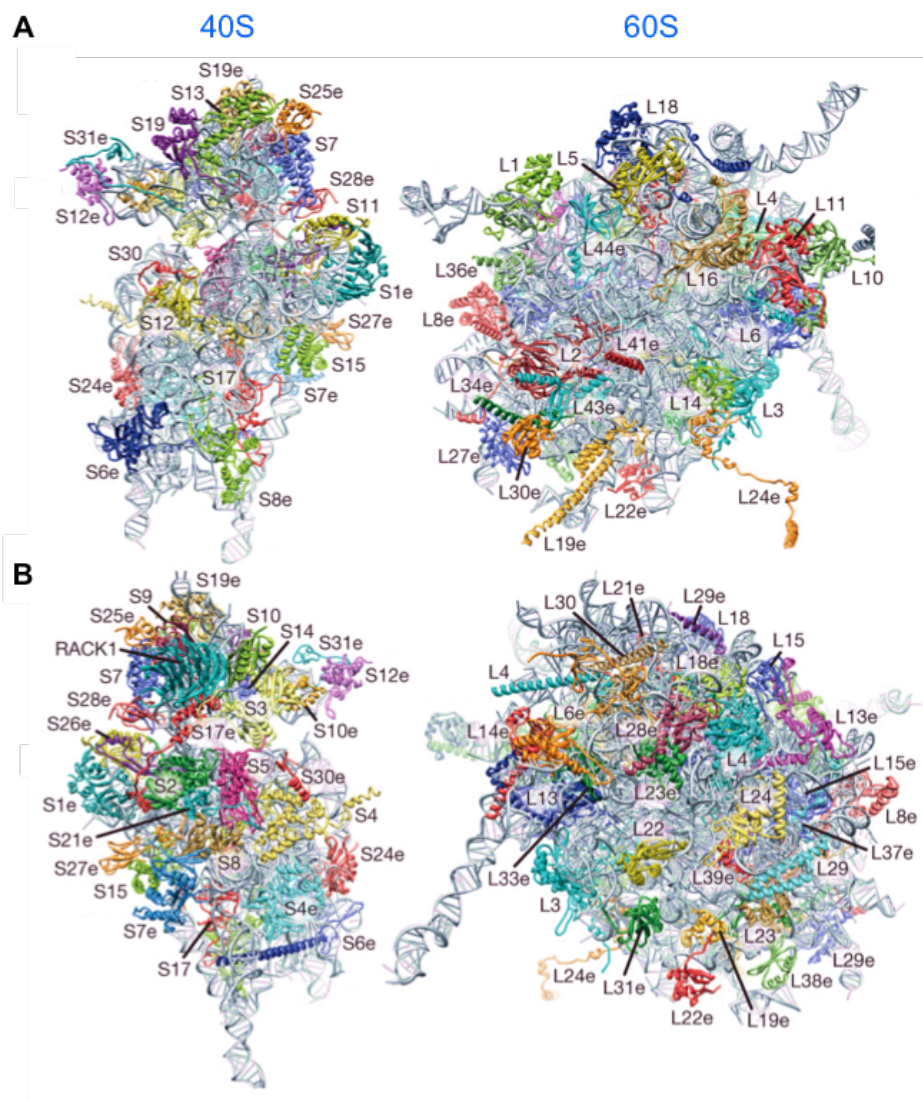


Figure 1: Structure des deux sous-unités ribosomiques 40S et 60S humaines.

Vue des deux sous-unités ribosomiques humaines 40S (gauche) et 60S (droite), au niveau de l'interface entre les deux sous unités (A) et au niveau du côté exposé au solvant (B). L'ARNr est représenté en gris et les protéines ribosomiques sont colorées individuellement.

Adapté de (Anger et al., 2013).

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques puisqu'ils sont composés, chez l'Homme, de 4 ARN ribosomiques (ARNr) et de 80 protéines ribosomiques (RPs) (voir **figure 1, tableau 1 et 2**). Ils sont organisés de manière asymétrique en deux sous-unités : la petite sous-unité 40S et la grande sous-unité 60S, le « S » faisant référence à l'unité de mesure du coefficient de sédimentation, le Svedberg.

La petite sous-unité 40S (ou SSU pour *small subunit*) est formée de 33 protéines ribosomiques appelées RPS (pour *Ribosomal Protein Small*) associées autour d'une molécule d'ARN ribosomique 18S. La grande sous-unité 60S (ou LSU pour *large subunit*) est formée de 47 protéines ribosomiques appelées RPL (pour *Ribosomal Protein Large*) associées autour des trois différents ARN ribosomiques 28S, 5.8S et 5S. Lorsque les deux sous-unités s'assemblent sur un ARNm dans le cytoplasme, elles forment le ribosome fonctionnel 80S d'une masse moléculaire d'environ 4,3 MDa (Anger et al., 2013).

Description (humain)	Protéine	Nouvelle nomenclature
Petite sous-unité 40S		
Protéine ribosomique SA 40S	RPSA	uS2
Protéine ribosomique S2 40S	RPS2	uS5
Protéine ribosomique S3 40S	RPS3	uS3
Protéine ribosomique S3A 40S	RPS3A	eS1
Protéine ribosomique S4 40S	RPS4	eS4
Protéine ribosomique S5 40S	RPS5	uS7
Protéine ribosomique S6 40S	RPS6	eS6
Protéine ribosomique S7 40S	RPS7	eS7
Protéine ribosomique S8 40S	RPS8	eS8
Protéine ribosomique S9 40S	RPS9	uS4
Protéine ribosomique S10 40S	RPS10	eS10
Protéine ribosomique S11 40S	RPS11	uS19
Protéine ribosomique S12 40S	RPS12	eS12
Protéine ribosomique S13 40S	RPS13	uS15
Protéine ribosomique S14 40S	RPS14	uS11
Protéine ribosomique S15 40S	RPS15	eS19
Protéine ribosomique S15 40S	RPS15A	uS8
Protéine ribosomique S16 40S	RPS16	uS9
Protéine ribosomique S17 40S	RPS17	eS17
Protéine ribosomique S18 40S	RPS18	uS13
Protéine ribosomique S19 40S	RPS19	eS19
Protéine ribosomique S20 40S	RPS20	uS10
Protéine ribosomique S21 40S	RPS21	eS21
Protéine ribosomique S23 40S	RPS23	uS12
Protéine ribosomique S24 40S	RPS24	eS24
Protéine ribosomique S25 40S	RPS25	eS25
Protéine ribosomique S26 40S	RPS26	eS26
Protéine ribosomique S27 40S	RPS27	eS27
Protéine ribosomique S27 40S	RPS27A	eS31
Protéine ribosomique S28 40S	RPS28	eS28
Protéine ribosomique S29 40S	RPS29	uS14
Protéine ribosomique S30 40S	RPS30	eS30
RACK1	RACK1	RACK1

Tableau 1 : Liste des RPs de la sous-unité 40S humaine.

Depuis 2014, un nouveau système de nomenclature des RPs a été établi. Celui-ci intègre les homologies structurelles des RPs entre les espèces (bactéries, levure, archées, mammifères), dans l'objectif de créer une dénomination universelle (Ban et al., 2014).

e : eukaryotic, u : universal

Description (humain)	Protéine	Nouvelle nomenclature
Grande sous-unité 60S		
Protéine ribosomique L3 60S	RPL3	uL3
Protéine ribosomique L4 60S	RPL4	uL4
Protéine ribosomique L5 60S	RPL5	uL18
Protéine ribosomique L6 60S	RPL6	eL6
Protéine ribosomique L7 60S	RPL7	uL30
Protéine ribosomique L7A 60S	RPL7A	eL8
Protéine ribosomique L8 60S	RPL8	uL2
Protéine ribosomique L9 60S	RPL9	uL6
Protéine ribosomique L10 60S	RPL10	uL16
Protéine ribosomique L10A 60S	RPL10A	uL1
Protéine ribosomique L11 60S	RPL11	uL5
Protéine ribosomique L12 60S	RPL12	uL11
Protéine ribosomique L13 60S	RPL13	eL13
Protéine ribosomique L13A 60S	RPL13A	uL13
Protéine ribosomique L14 60S	RPL14	eL14
Protéine ribosomique L15 60S	RPL15	eL15
Protéine ribosomique L17 60S	RPL17	uL22
Protéine ribosomique L18 60S	RPL18	eL18
Protéine ribosomique L18A 60S	RPL18A	eL20
Protéine ribosomique L19 60S	RPL19	eL19
Protéine ribosomique L21 60S	RPL21	eL21
Protéine ribosomique L22 60S	RPL22	eL22
Protéine ribosomique L23 60S	RPL23	uL14
Protéine ribosomique L23A 60S	RPL23A	uL23
Protéine ribosomique L24 60S	RPL24	eL24
Protéine ribosomique L26 60S	RPL26	uL24
Protéine ribosomique L27 60S	RPL27	eL27
Protéine ribosomique L27A 60S	RPL27A	uL15
Protéine ribosomique L28 60S	RPL28	eL28
Protéine ribosomique L29 60S	RPL29	eL29
Protéine ribosomique L30 60S	RPL30	eL30
Protéine ribosomique L31 60S	RPL31	eL31
Protéine ribosomique L32 60S	RPL32	eL32
Protéine ribosomique L34 60S	RPL34	eL34
Protéine ribosomique L35 60S	RPL35	uL29
Protéine ribosomique L35A 60S	RPL35A	eL33
Protéine ribosomique L36 60S	RPL36	eL36
Protéine ribosomique L36A 60S	RPL36A	eL42
Protéine ribosomique L37 60S	RPL37	eL37
Protéine ribosomique L37A 60S	RPL37A	eL43
Protéine ribosomique L38 60S	RPL38	eL38
Protéine ribosomique L39 60S	RPL39	eL39
Protéine ribosomique L40 60S	RPL40	eL40
Protéine ribosomique L41 60S	RPL41	eL41
Protéine ribosomique P0 60S	RPLP0	uL10
Protéine ribosomique P1/2 60S	RPLP1/2	P1/P2

Tableau 2 : Liste des RPs de la sous-unité 60S humaine. Voir légende Tableau 1

2. Fonction des ribosomes et acteurs de la traduction

Les ribosomes sont considérés comme des ribozymes avec une activité catalytique portée par les ARN ribosomiques. Les RPs exercent quant à elles un rôle structural pour le maintien et la stabilité de la structure tridimensionnelle des ARNr. Dans tous les organismes vivants, les ribosomes constituent le cœur de la machinerie de la synthèse protéique. Les ribosomes assurent la traduction de l'information génétique portée par les ARNm en chaînes contiguës d'acides aminés pour former les protéines. En plus des ribosomes, la synthèse protéique fait intervenir de nombreux acteurs non ribosomiques incluant les ARN messagers (ARNm), les ARN de transfert (ARNt), et divers facteurs de traduction.

Les ARN de transfert (ARNt) sont des courts ARNs non codants (environ 80 nucléotides). Ils sont les adaptateurs universels entre les codons de l'ARNm et les acides aminés. Chaque ARNt possède une boucle anti-codon, qui est un triplet de bases complémentaires du codon présent sur l'ARNm, et porte l'acide aminé correspondant, au niveau de son extrémité 3'. Il existe donc une grande diversité de molécules d'ARNt. Une fois dans le ribosome, l'acide aminé attaché à l'ARNt est transféré à la protéine en cours de synthèse. Une fois que l'acide aminé est incorporé à la chaîne polypeptidique en construction, l'ARNt est libéré. Les ribosomes contiennent trois principaux sites catalytiques, qui sont également des sites de fixation aux ARNt. Ils sont appelés les sites A, P et E (voir **figure 2**). Sur le site A (pour *Aminoacyl-ARNt*), les ARNt aminoacylés se lient après reconnaissance spécifique du codon de l'ARNm. Le site P (pour *Peptidyl-ARNt*) est occupé par l'ARNt portant la chaîne polypeptidique naissante et est le lieu de formation de la liaison peptidique. Enfin, le site E (pour *Exit*) permet la libération de l'ARNt déacylé qui a livré son acide aminé.

Les ARNm sont composés d'au moins 3 régions fonctionnelles. La région codante débute en général par le codon d'initiation AUG (correspondant à l'acide aminé méthionine) et se termine par un codon de terminaison UAG, UGA, ou UAA. La région codante est encadrée par deux régions non codantes, qui sont appelées les extrémités 5' et 3' UTR (pour *Untranslated Regions*). Ces dernières contiennent des modifications post-traductionnelles. En effet, à l'extrémité 5', une méthylguanosine se fixe sur le premier nucléotide par une liaison 5'-5', et forme la « coiffe » de l'ARNm. Cet ajout sert de protection de l'extrémité 5' envers l'activité des exonucléases et participe ainsi à la stabilisation de l'ARNm. La coiffe est également nécessaire à l'export de l'ARNm vers le cytoplasme et permet le recrutement de

facteurs d'initiation de la traduction, dont eIF4E. A l'extrémité 3', l'ajout d'une queue poly(A) par polyadénylation permet le recrutement de la protéine PABP (*Poly A Binding Protein*). Cette protéine de liaison à l'ARN a pour fonction de stabiliser et protéger l'ARNm. De plus, PABP participe à la circularisation des ARNm en formant un complexe avec le facteur d'initiation eIF4E fixé à la coiffe à l'extrémité 5'. La circularisation des ARNm est une étape indispensable pour le recrutement du ribosome. Ce phénomène constitue un système de surveillance d'un intérêt majeur puisqu'il introduit un contrôle de qualité de l'ARNm. Ainsi, les ARNm pourvus d'une coiffe à l'extrémité 5' et d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' sont traduits, tandis que les ARNm incomplets ou clivés ne peuvent pas recruter les ribosomes, ce qui évite la production de protéines anormales. Cependant, ce mécanisme de traduction n'est pas universel et il existe des cas particuliers : certains ARNm ne possèdent pas de queue polyA, et c'est le cas par exemple pour les histones canoniques.

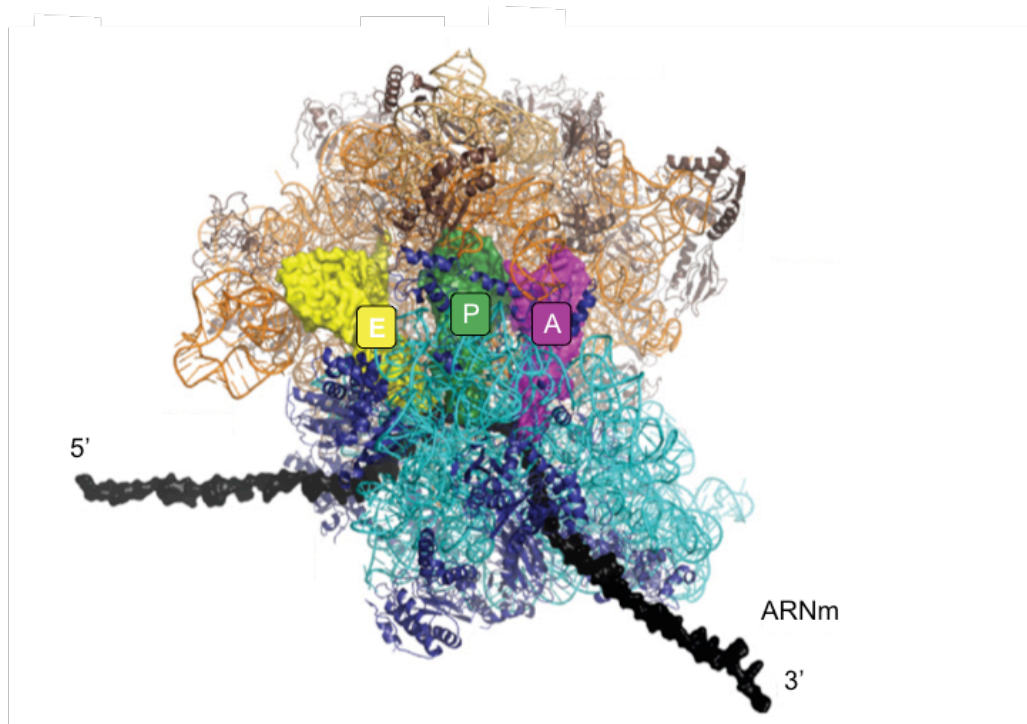


Figure 2 : Représentation des trois sites A, P et E de liaison aux l'ARNt et d'un ARNm au sein du ribosome 70S.

Ce modèle de la structure du ribosome eucaryote 70S (procaryote) illustre les trois sites de liaison à l'ARN de transfert (ARNt), qui sont conservés entre les espèces. Le site A correspond au recrutement initial de l'Aminoacyl-ARNt (violet). Le site P est fixé par le Peptidyl-ARNt portant la chaîne polypeptidique en formation (vert). Enfin le site E permet la sortie (Exit) de l'ARNt déacylé du ribosome. Un ARNm en cours de traduction est représenté en noir.

Adapté de (Schmeing and Ramakrishnan, 2009).

3. Mécanisme général de la traduction

Le processus de la traduction des ARNm se déroule en quatre étapes majeures : l'initiation, l'élongation, la terminaison et enfin le recyclage des ribosomes. Chacune de ces étapes est accompagnée par l'action de nombreux facteurs protéiques qui interagissent avec les sous-unités ribosomiques, les ARNt et l'ARNm. La partie ci-dessous décrira brièvement les mécanismes fondamentaux de la traduction d'un ARNm par le ribosome eucaryote (Schmeing and Ramakrishnan, 2009).

a. Initiation de la traduction

– *Initiation de la traduction coiffe dépendante*

L'initiation de la traduction est l'étape la plus complexe de la synthèse protéique, et la plus hautement régulée (voir **figure 3**). Elle fait intervenir plus de 12 facteurs d'initiation de la traduction appelés eIF pour « *eukaryotic Initiation Factors* ». La grande majorité des protéines de la cellule eucaryote est synthétisée avec un mécanisme d'initiation de la traduction dit « coiffe-dépendant ».

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les ARNm cytoplasmiques matures forment une structure circulaire, dénommée sous le terme anglo-saxon « closed-loop ». Cette structure est le résultat de la reconnaissance de la coiffe en 5'UTR par le facteur d'initiation eIF4E. Ce dernier recrute ensuite les facteurs eIF4A et eIF4G, qui forment avec eIF4E, un complexe multiprotéique nommé eIF4F. eIF4G est la protéine d'assemblage qui lie l'extrémité 3'UTR *via* la protéine PABP et permet la circularisation de l'ARNm. En parallèle, dans le cytoplasme, la petite sous-unité ribosomique s'associe avec les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. Ces derniers favorisent le recrutement d'un complexe ternaire comprenant eIF2 lié à une molécule GTP, et l'ARNt initiateur portant l'acide aminé méthionine. Le complexe de pré-initiation (PIC) de la traduction 43S ainsi formé est ensuite recruté sur les ARNm grâce à l'interaction entre eIF3 (du complexe PIC) et le complexe eIF4F (associé à l'ARNm). L'hélicase eIF4A du complexe eIF4F déroule les structures secondaires de l'extrémité 5' de l'ARNm pour permettre au complexe PIC de progresser. En effet, une fois fixé sur l'extrémité 5' de l'ARNm, le complexe PIC scanne l'ARNm dans la

direction 5' vers 3' jusqu'à la reconnaissance d'un codon initiateur de la traduction AUG entouré de la séquence optimale Kozak (Kozak, 1987).

Enfin, la reconnaissance du codon initiateur AUG par l'ARNt initiateur entraîne l'hydrolyse de la molécule GTP portée par eIF2 en un GDP et la libération des facteurs eIF1, eIF3, eIF5 et eIF2-GDP. La grande sous-unité ribosomique, en complexe avec eIF5B, peut ensuite s'associer à la petite sous-unité ribosomique, formant le ribosome fonctionnel 80S qui entre dans la phase d'élongation de la traduction.

– Initiation de la traduction coiffe-indépendante

En plus du mécanisme général de démarrage de la traduction chez les eucaryotes, une catégorie d'ARNm a la capacité de recruter les ribosomes par un mécanisme dit « coiffe-indépendant ». Certains ARNm présentent en leur séquence 5'UTR des structures appelées IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) qui permettent au ribosome de s'associer directement sur le codon initiateur sans nécessairement requérir l'assistance de tous les facteurs d'initiation de la traduction eIF. Cette alternative est notamment utilisée par certains virus tel que le virus de l'hépatite C (HCV) ou le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), dans le but de détourner la machinerie cellulaire eucaryote à leur profit. Chaque ARNm possédant un IRES possède une structure secondaire et tertiaire particulière, ce qui suggère une hétérogénéité des mécanismes d'initiation de la traduction coiffe-indépendants. Il est intéressant de noter que certains ARNm possédant une séquence IRES codent pour des protéines impliquées dans des voies cellulaires essentielles telles que la survie et la prolifération cellulaire. Par exemple, chez l'Homme, les ARNm codant pour les protéines p53, c-Myc, et bcl-2 comprennent une séquence IRES.

b. Elongation de la traduction

L'élongation de la traduction est l'étape qui consiste en la formation de la chaîne polypeptidique. Durant cette phase, le ribosome 80S progresse le long de l'ARNm codon par codon, et incorpore, par le biais des aminoacyl-ARNt, les acides aminés correspondants dans la chaîne polypeptidique en cours de formation. Ce processus est réalisé de manière cyclique

et fait intervenir les deux facteurs d'élongation eEF1 α et eEF2 (eEF pour « *eukaryotic Elongation Factors* »).

Dans le cytoplasme, le facteur d'élongation eEF1 α lie l'aminocyl-ARNt et le dirige jusqu'à l'entrée du site A du ribosome. Une correspondance parfaite entre le codon placé au site A et la boucle anti-codon de l'aminocyl-ARNt est nécessaire pour l'appariement entre ces deux derniers. Ensuite, des changements conformationnels permettent le rapprochement de l'aminocyl-ARNt et du peptidyl-ARN portant la chaîne peptidique en formation. Ce rapprochement a lieu au sein du centre peptidyl-transférase du ribosome (PTC), qui réside dans la grande sous-unité ribosomique et est constitué exclusivement d'éléments d'ARNr hautement conservés. Ce site actif catalyse la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé du site P et celui du site A, puis le transfert de la chaîne polypeptidique en formation du site P vers le site A. Après la formation de la liaison peptidique, le facteur d'élongation eEF2 déclenche le mouvement des ARNt. D'une part, l'ARNt déacylé du site P est transloqué temporairement au site E avant sa libération du ribosome, et d'autre part le peptidyl-ARNt situé au site A est transloqué jusqu'au site P. Ainsi, le site A est à nouveau vacant et disponible pour la liaison du prochain aminocyl-ARNt lié par eEF1 α . Ce cycle d'élongation est répété jusqu'à ce que le ribosome parvienne au niveau d'un codon de terminaison UAA, UGA ou UAG.

c. Terminaison de la traduction

La terminaison de la traduction a lieu lorsqu'un codon d'arrêt (UAA, UGA ou UAG) advient au niveau du site A, attestant que le ribosome a atteint la fin de la séquence codante. Chez les organismes eucaryotes, cette étape est catalysée les deux facteurs protéiques eRF1 et eRF3 (eRF pour « *eukaryotic Release Factors* »).

Les codons d'arrêt sont reconnus par le facteur de terminaison eRF1, qui possède une structure tridimensionnelle qui mime celle d'un ARNt. Ainsi, lorsqu'un codon d'arrêt est rencontré pour la première fois, les facteurs eRF1 et eRF3 s'associent en complexe au niveau du site A, provoquant l'activation du centre peptidyl-transférase du ribosome. Celui-ci catalyse l'hydrolyse de la liaison ester entre le dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique en formation et le peptidyl-ARNt fixé au site P du ribosome. La chaîne polypeptidique néosynthétisée est ainsi libérée et émerge du ribosome au travers d'un tunnel de sortie qui traverse la grande sous-unité ribosomique.

d. Dissociation et recyclage du ribosome

Une fois que la chaîne polypeptidique complète est libérée dans le cytoplasme, le ribosome 80S reste lié à l'ARNm, avec l'ARNt désacylé accroché sur son site P et le facteur de terminaison eRF1 fixé au site A. Ce complexe de post-terminaison doit ensuite être désassemblé et les sous-unités ribosomiques dissociées afin de régénérer les composants nécessaires à un nouveau cycle de traduction. La première étape du recyclage des ribosomes est stimulée par l'enzyme ABCE1 (*ATP-binding cassette sub-family E member 1*) qui s'associe au facteur de terminaison eRF1 (pour revue, (Hellen, 2018)). Ce complexe dissocie et libère la grande sous-unité ribosomique 60S, laissant le complexe 40S-ARNt fixé à l'ARNm (Pisarev et al., 2010). Par la suite, en se fixant à la sous unité 40S, les facteurs d'initiation assurent l'éjection de l'ARNt et la libération de la petite sous-unité 40S pour la préparer au prochain cycle de traduction. Des analyses de profilage de ribosomes réalisées dans un modèle de levure invalidé pour la protéine ABCE1 indiquent que les ribosomes s'accumulent au niveau des codons d'arrêt des régions codantes et des régions 3'UTR des ARNm (Young et al., 2015). La détection de peptides aberrants résultant de la traduction de régions 3'UTR de certains gènes démontre qu'une réinitiation de la traduction s'opère une fois que les ribosomes 80S ont dépassé un codon d'arrêt de la région codante. Ces études mettent en évidence le rôle crucial du mécanisme de recyclage des ribosomes pour le contrôle de la réinitiation de la traduction et pour le maintien d'un réservoir de ribosomes libres disponibles continuellement.

Une étude récente a établi un lien entre le recyclage des ribosomes et l'érythropoïèse. Ces travaux ont montré que l'expression de ABCE1 décroît naturellement au cours de la différenciation érythroïde et est responsable d'une accumulation de ribosomes bloqués dans la région 3'UTR des ARNm des réticulocytes (Mills et al., 2016). Cette équipe a également montré qu'en conditions physiologiques, le facteur PELO permet compenser la perte physiologique d'ABCE1 au cours de la différenciation érythroïde et permet de maintenir une quantité suffisante de ribosomes disponibles nécessaires pour la synthèse protéique (Mills et al., 2016). De ce fait, ces travaux montrent que le recyclage des ribosomes est primordial au cours de l'érythropoïèse terminale.

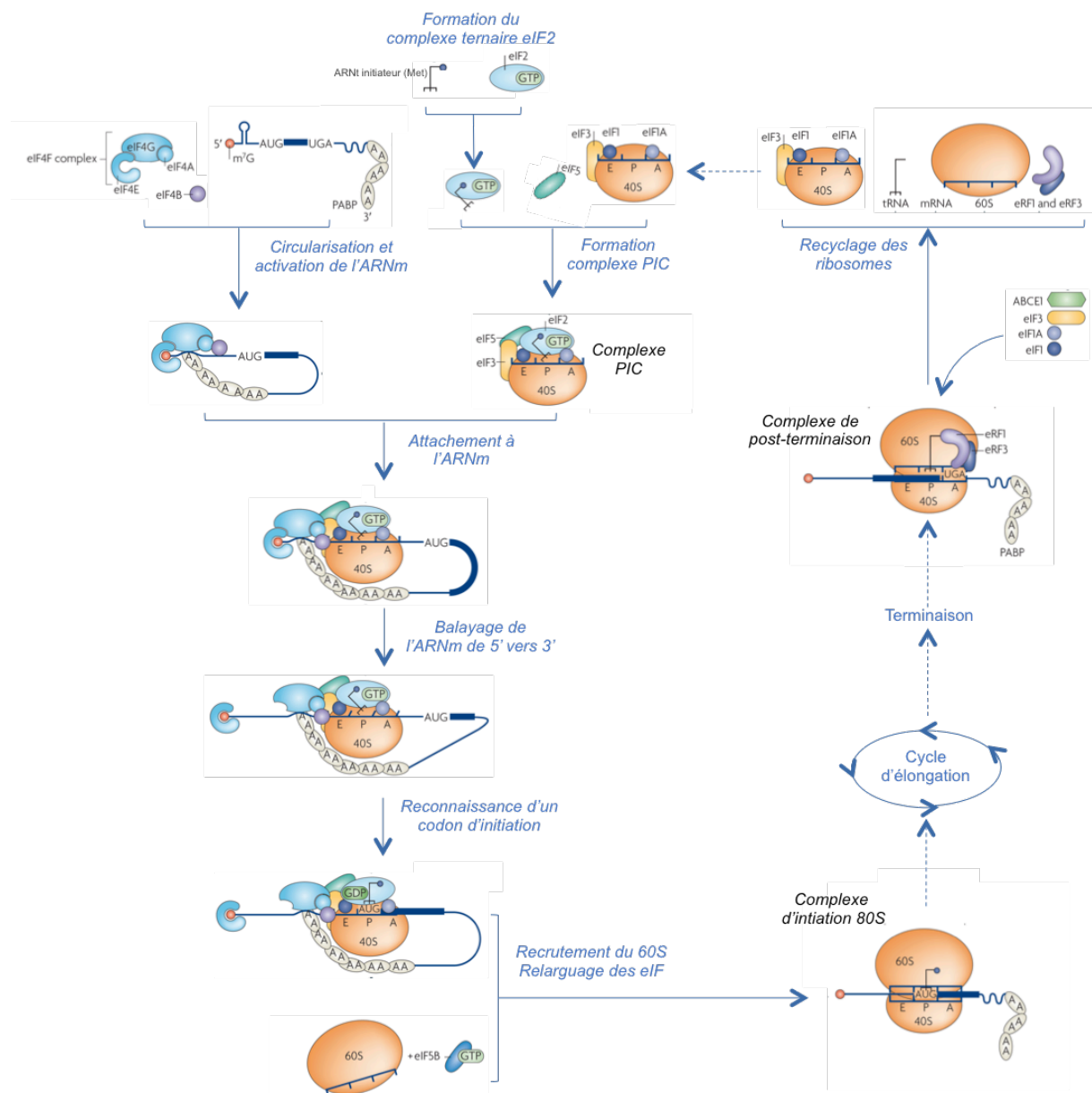


Figure 3 : Schéma général de la voie d'initiation de la traduction eucaryote.

Avant son recrutement sur l'ARNm, la sous-unité 40S est préparée par la fixation de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction incluant eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 et le complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt^{initiateur}. Le complexe ainsi formé est appelé le complexe de pré-initiation de la traduction (PIC). En parallèle, l'ARNm adopte une structure active circulaire grâce à l'interaction entre le complexe eIF4F associé à la coiffe en 5', et le facteur PABP lié à la queue poly(A) à l'extrémité 3'. Ensuite, le complexe PIC s'accroche à l'ARNm par l'interaction directe entre eIF4G et eIF3, et débute le balayage de l'ARNm codon par codon dans la direction 5' vers 3'. La rencontre d'un codon d'initiation AUG au sein du complexe PIC entraîne le relargage de certains facteurs d'initiation de la traduction dont le complexe ternaire eIF2, et le recrutement de la sous-unité 60S préalablement liée à eIF5B. Le ribosome 80S fonctionnel nouvellement formé entre dans la phase d'élongation, où chaque cycle correspond à l'incorporation d'un nouvel acide aminé à la chaîne polypeptidique en formation. À la survenue d'un codon stop, l'étape de terminaison est enclenchée. Le complexe de post-terminaison est finalement dissocié par l'action du facteur ABCE1 associé à certains facteurs d'initiation,

permettant le recyclage des différents composants ribosomiques. Ce schéma a été réalisé à partir d'éléments de la revue (Jackson et al., 2010).

4. Bases de la régulation de la traduction

Le processus de la synthèse protéique permet l'expression des gènes et contrôle le taux de protéines cellulaires (Schwanhäusser et al., 2011). La régulation de ce mécanisme est donc indispensable pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Parmi les quatre étapes de la synthèse protéique décrites précédemment, l'initiation de la traduction est considérée comme la plus déterminante et par conséquent l'étape la plus hautement régulée (Hershey et al., 2012; Sonenberg and Hinnebusch, 2009).

a. Mécanismes de régulation de la traduction « en trans »

La régulation de la traduction protéique peut être exercée à deux différents niveaux. D'une part, il existe des mécanismes de régulation dits « en trans » qui modulent l'activité de la machinerie traductionnelle et ont un effet global sur l'efficacité de la traduction. Cette régulation s'exerce par le contrôle de l'activité de certains facteurs de traduction. Les deux exemples les mieux décrits sont l'inhibition des deux facteurs d'initiation de la traduction : eIF2 et eIF4E (Van Der Kelen et al., 2009).

– *L'inhibition du facteur eIF2*

Pour rappel, le facteur eIF2 forme un complexe avec un ARNt initiateur (portant une acide aminé méthionine) et permet la fixation de ce dernier au sein du site A du ribosome pour amorcer la traduction. Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler eIF2a au niveau de sa sérine 51 : PKR (*double stranded RNA-dependent Protein*), HRI (*Heme-Regulated Inhibitor*), GCN2 (*General Control Non-derepressible 2*) et PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) (Chen, 2014; Harding et al., 2000). Ces kinases sont activées en réponse à différents stress, respectivement : les infections virales, le déficit en molécules d'hème, la carence en nutriments et le stress du réticulum endoplasmique. La phosphorylation de eIF2 empêche sa liaison aux ARNt initiateurs, entraînant une diminution de leur accès aux ribosomes pour l'initiation de la traduction. Il en résulte une diminution globale de la synthèse protéique.

– L'inhibition du facteur eIF4E

Le deuxième exemple de mécanisme de régulation « en trans » concerne le facteur eIF4E. Ce dernier peut être inhibé soit par sa phosphorylation par des kinases de la famille des MAPK, soit par la fixation de son inhibiteur compétitif 4E-BP1 (*eIF4E binding protein*) (voir **figure 4**). Pour rappel, le facteur eIF4E forme un complexe avec eIF4G et eIF4A et interagit directement avec la coiffe de l'ARNm à l'extrémité 5'. 4E-BP1 est un substrat du complexe mTORC1 et partage le même site de liaison que eIF4G sur eIF4E. La voie de signalisation mTORC1 est activée suite à la stimulation par des facteurs de croissance ou par des nutriments, et inhibée en l'absence de ces derniers. En cas d'absence de stimulation de mTORC1, 4E-BP1 n'est pas phosphorylé et possède alors une forte affinité pour eIF4E, s'y lie et empêche finalement la formation du complexe eIF4E-eIF4G. En conséquence, la traduction des transcrits possédant une coiffe en 5' est spécifiquement inhibée. A l'inverse, lorsque mTORC1 est activé, 4E-BP1 est phosphorylé et ne fixe plus eIF4E. Le facteur eIF4E libre peut interagir avec eIF4G et former le complexe d'initiation de la traduction. La traduction spécifique des ARNm à coiffe est ainsi favorisée par l'activation de la voie mTORC1. De plus, il a été montré que mTORC1 contrôle l'initiation de la traduction de certains sous-groupes d'ARNm à coiffe, en particulier les ARNm 5' TOP (*Terminal Oligopyrimidine*) et 5'TOP-like (Thoreen et al., 2012). La très grande majorité des ARNm 5'TOP codent pour des facteurs d'initiation (eIF2, eIF3, eIF4, PABP) et d'élongation (eEF1, eEF2) de la traduction, ainsi que pour toutes les protéines ribosomiques. En ce sens, la voie mTORC1 est un régulateur majeur de la traduction.

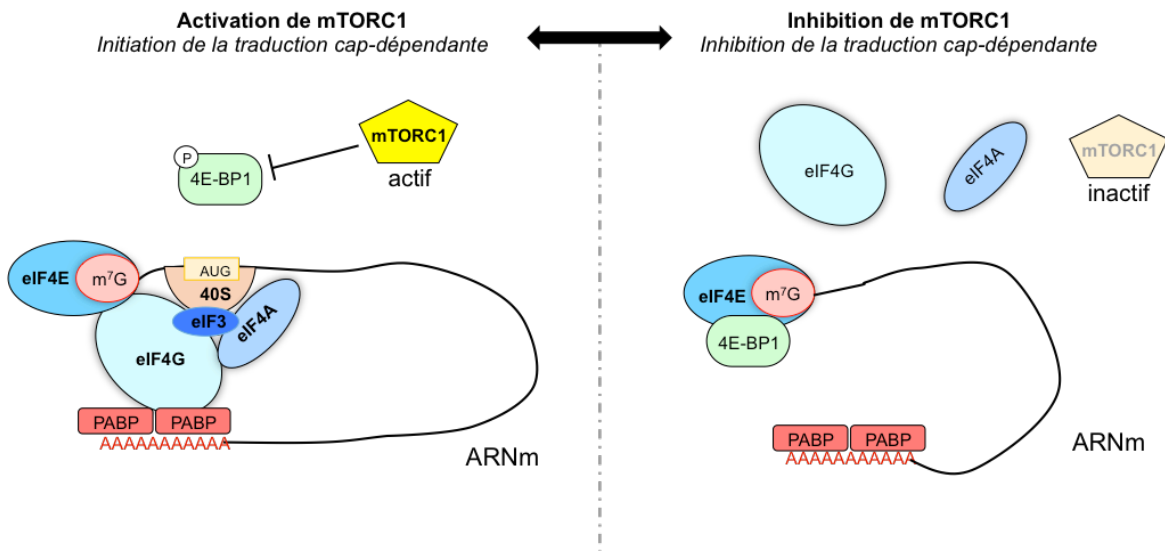


Figure 4: Mécanisme de régulation de l'initiation de la traduction par 4E-BP1.

À la suite de sa stimulation par des facteurs de croissance ou nutritifs (acides aminés), le complexe mTORC1 est activé. Ce complexe est un régulateur majeur de la traduction et réalise la phosphorylation de nombreux substrats, dont 4E-BP1. La phosphorylation de 4E-BP1 est inhibitrice puisqu'elle empêche l'interaction de ce dernier avec le facteur d'initiation eIF4E. Le complexe d'initiation de la traduction (PIC) 43S peut alors se former et la traduction est favorisée pour les ARNm possédant une coiffe en 5', en particulier pour les motifs 5'TOP ou 5'TOP-like. En l'absence de stimulation par des facteurs de croissance ou lorsque l'état nutritionnel de la cellule est faible, mTORC1 est inactif. 4E-BP1 n'est pas phosphorylé et interagit avec eIF4E. Par compétition avec 4E-BP1, le complexe d'initiation de la traduction ne peut se former, la traduction cap-dépendante est inhibée.

b. Mécanismes de régulation de la traduction « en cis »

Il existe des mécanismes de régulation dits « en cis » qui dépendent de propriétés propres de l'ARNm. Contrairement aux mécanismes de traduction qui impactent la machinerie traductionnelle, ce type de régulation affecte spécifiquement la traduction d'un ARNm particulier ou d'un groupe d'ARNm, de manière positive ou négative.

La composition primaire de la séquence nucléotidique des ARNm conditionne leur structure secondaire et tertiaire. La structure de l'ARN décrit sa conformation en trois dimensions. Le repliement de l'ARN est le résultat de l'établissement de liaisons hydrogènes entre les nucléotides par paire, telles que les paires Watson-Crick (A/U et G/C) et les paires Wobble (G/U). L'appariement G-C est celui qui confère le plus de stabilité à la structure de l'ARN. L'ensemble des interactions d'une séquence nucléotidique donnée conduit à la formation d'éléments structuraux particuliers incluant par exemple les boucles et les hélices.

Ainsi, chaque ARNm arbore une structure secondaire qui lui est propre et il existe une diversité importante de structures secondaires dont la complexité est variable.

Les caractéristiques structurelles les plus étudiées concernent la région non codante située en 5'UTR de l'ARNm. Ces dernières jouent un rôle important dans la régulation de traduction, particulièrement à l'étape de l'initiation, pour le recrutement des ribosomes et leur positionnement au niveau d'un codon d'initiation favorable. La stabilité des transcrits peut être mesurée grâce à leurs caractéristiques thermodynamiques (enthalpie ΔG), qui prend en compte leur longueur et leur structure. Il a été montré que les données thermodynamiques des régions 5'UTR influencent fortement l'initiation de la traduction des transcrits. En particulier, plus les séquences en 5'UTR sont longues et arborent des structures complexes, moins leur traduction est efficace (Barrett et al., 2012) (voir introduction de la partie II des résultats).

5. Des ribosomes hétérogènes ?

Les ribosomes ont longtemps été considérés comme des unités constantes et homogènes au sein des cellules. Cependant, depuis plusieurs années, des études interrogent la possibilité de l'existence de ribosomes hétérogènes. L'hétérogénéité des ribosomes pourrait se manifester à trois différents niveaux (Xue and Barna, 2012). D'un côté, l'ARNr pourrait présenter des modifications de séquence primaire et arborer des modifications post-traductionnelles variées. D'un autre côté, la composition en protéines ribosomiques pourrait être différente d'un ribosome à l'autre, et potentiellement impliquer l'utilisation de protéines ribosomiques paralogues. L'ensemble de ces RPs est également soumis aux variations de modifications post-traductionnelles. Enfin, le dernier aspect de l'hétérogénéité des ribosomes concerne les facteurs associés aux ribosomes matures, regroupés sous le terme d'« interactome » du ribosome. L'identité de ces facteurs semble pouvoir varier selon le contexte cellulaire. De nombreuses études ont ainsi tenté de déceler la présence de ribosomes différents entre les espèces ou sein d'un même organisme. De plus, des travaux rapportent que la composition du ribosome peut varier au sein d'un même organisme, selon les conditions physiologiques et/ou selon le tissu cellulaire considéré.

L'exploration de la diversité des ribosomes conduit à l'hypothèse de l'existence de ribosomes à fonctionnalité variable. Ainsi, la spécialisation des ribosomes pourrait être liée à

une capacité des ribosomes à moduler la traduction protéique, entraînant une sélectivité de la traduction, notamment au cours du développement des somites (Kondrashov et al., 2011). Cependant, cette notion est à l'heure actuelle encore sujette à débat. En pratique, il est très difficile d'apporter des preuves expérimentales de l'hétérogénéité des ribosomes et d'une spécialisation de fonction de ces derniers. Au final, le lien entre l'hétérogénéité des ribosomes et la traduction protéique nécessite encore de solides démonstrations (Haag and Dinman, 2019).

B. La biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est l'un des processus cellulaires les plus complexes et les plus coûteux en énergie. Elle nécessite la coordination de la synthèse des composants ribosomiques, à savoir les RPs et les ARNr, et la synthèse de co-facteurs protéiques qui participent aux différentes étapes de ce processus. La synthèse des ribosomes fait intervenir l'activité des trois ARN polymérases (voir **figure 5**). La transcription des ARNr est assurée par l'ARN pol I (18S, 5.8S et 28S) et par l'ARN pol III (5S). L'ARN pol II est responsable de la transcription des ARNm et notamment des protéines ribosomiques. Chez l'Homme, les étapes de la synthèse, la maturation des ARNr et leur assemblage ordonné avec les protéines ribosomiques sont orchestrées par plus de 350 facteurs non ribosomiques et environ 200 snoARN. La majorité des étapes de la biogenèse des ribosomes a lieu dans un compartiment particulier du noyau, le nucléole, mais les étapes finales de la maturation des sous-unités ribosomiques prennent place dans le noyau et dans le cytoplasme. L'ensemble du processus de la biogenèse des ribosomes est étroitement contrôlé pour assurer la production de ribosomes matures fonctionnels. Par ailleurs, la production des ribosomes est finement régulée pour répondre aux besoins de la cellule. Ainsi, durant la prolifération cellulaire, la biogenèse des ribosomes est stimulée pour assurer la synthèse des constituants nécessaires à la division cellulaire. Les mécanismes de régulation les mieux décrits concernent la régulation de la transcription de l'ADNr par l'ARN pol I. La perte de régulation de ce processus entraîne une production incontrôlée de ribosomes, pouvant être responsable du développement de cancers.

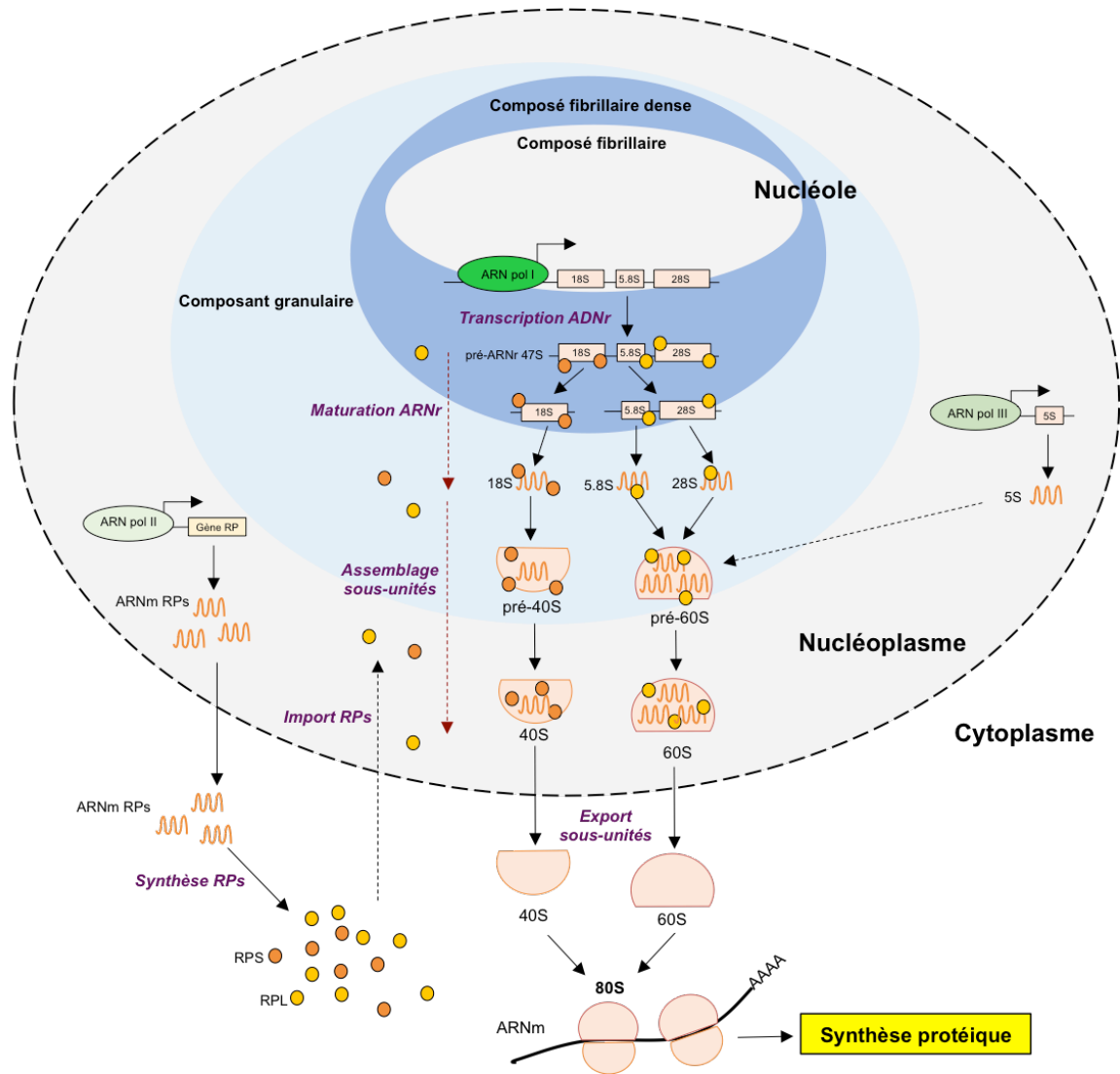


Figure 5 : Vue d'ensemble de la biogenèse des ribosomes.

Le ribosome mature 80S est composé d'une petite sous-unité 40S contenant l'ARNr 18S et 33 RPs, et d'une grande sous-unité 60S contenant les ARNr 5S, 5.8S et 28S et 47 RPs. La majeure partie des étapes de la biogenèse des ribosomes a lieu dans le nucléole, où l'ARN pol I assure la transcription du gène de l'ADNr en un précurseur ARNr 47S (pré-ARNr 47S). Ce dernier va subir une série de clivages endo- et exonucléolytiques pour aboutir à la formation des ARNr matures 18S, 5.8S et 28S. Dans le nucléoplasme, l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN pol III, et l'ARN pol II assure la transcription des ARNm correspondant aux RPs. Une fois traduites dans le cytoplasme, les RPs sont importées dans le nucléole et s'associent graduellement aux ARNr en cours de maturation. Les sous-unités ribosomiques matures néosynthétisées sont exportées dans le cytoplasme où elles vont s'associer sur un ARNm pour former le ribosome fonctionnel 80S.

1. Le nucléole, site de la biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes se déroule majoritairement dans le nucléole qui est un organe intranucléaire, non délimité par une membrane, aisément identifiable en microscopie

électronique du fait de sa taille et de sa densité optique importante (voir **figure 6**). En 1934, Barbara McClintock a montré que les nucléoles sont organisés autour de « corps organisateurs » appelés NOR (pour *Nucleolus Organizer Region*) (McClintock, 1934). Les NOR sont des régions chromosomiques qui portent les gènes de l'ADNr. Chez l'Homme, ces gènes sont répétés en tandem d'environ 400 copies et regroupés sur les bras courts des chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22.

Le nucléole est organisé en trois compartiments majeurs distinguables en microscopie électronique et marqués par des différences de densité aux électrons :

- Le centre fibrillaire (CF) est une région arrondie, peu dense, apparaissant de couleur claire en microscopie électronique. Sa taille oscille entre de 0,1 et 1 μm .

- Le composant fibrillaire dense (CFD) forme généralement un anneau très sombre autour du CF. Son aspect est très dense.

- Le composant granulaire (CG) est une zone plus grande qui enchâsse les CF et les CFD. D'un aspect granulaire, le CG est riche en particules pré-ribosomiques en cours d'assemblage.

Ces trois composés sont assemblés autour des NOR et supportent des étapes précises de la biogenèse des ribosomes. En 1984, il a été montré que l'ARN polymérase I s'accumule principalement au niveau du CF (Carmo-Fonseca et al., 2000; Scheer and Rose, 1984). En tant que trans-activateur de l'ARN polymérase I, le facteur de transcription UBF est considéré comme un marqueur spécifique du CF et est indispensable à la transcription de l'ADNr (Voit et al., 1995). Il a été suggéré que la transcription de l'ADNr s'effectuerait à l'interface entre le CF et le CFD (Goodfellow and Zomerdijk, 2012). La maturation des ARNr a lieu dans le CFD pour les étapes précoces, puis dans le CG (Puvion-Dutilleul et al., 1991) pour les étapes finales. En effet, la fibrillarine (FBL), enzyme spécifique des étapes précoces de maturation des ARNr, est présente principalement dans le CFD, et représente un marqueur spécifique de ce compartiment.

Le nucléole est donc un organite dynamique dont la structure est modulée en fonction de son activité (Mélèse and Xue, 1995). En effet, l'aspect du nucléole évolue au cours du cycle cellulaire. Durant la phase de mitose, la transcription par l'ARN polymérase I est réprimée, la biogenèse des ribosomes est interrompue et il y a un désassemblage du nucléole dont les composants sont repartis entre les deux cellules filles. Dès le début de la phase G1 du

cycle cellulaire, le nucléole est réassemblé et est actif durant toute l'interphase, l'ARN polymérase I reprend son activité (Boisvert et al., 2007).

Outre leur rôle majeur dans la biogenèse des ribosomes, les nucléoles seraient impliqués dans divers processus nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, les nucléoles seraient impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose (Boisvert et al., 2007; Boulon et al., 2010). En effet, parmi les 4500 protéines nucléolaires identifiées chez l'Homme, seulement 30 % sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes (Ahmad et al., 2009). Pour la majorité de ces protéines nucléolaires, leur fonction n'est pas totalement élucidée. En revanche, un criblage par ARN interférence a montré qu'environ 300 de ces protéines nucléolaires ont une fonction dans la maturation des ARNr (Tafforeau et al., 2013).

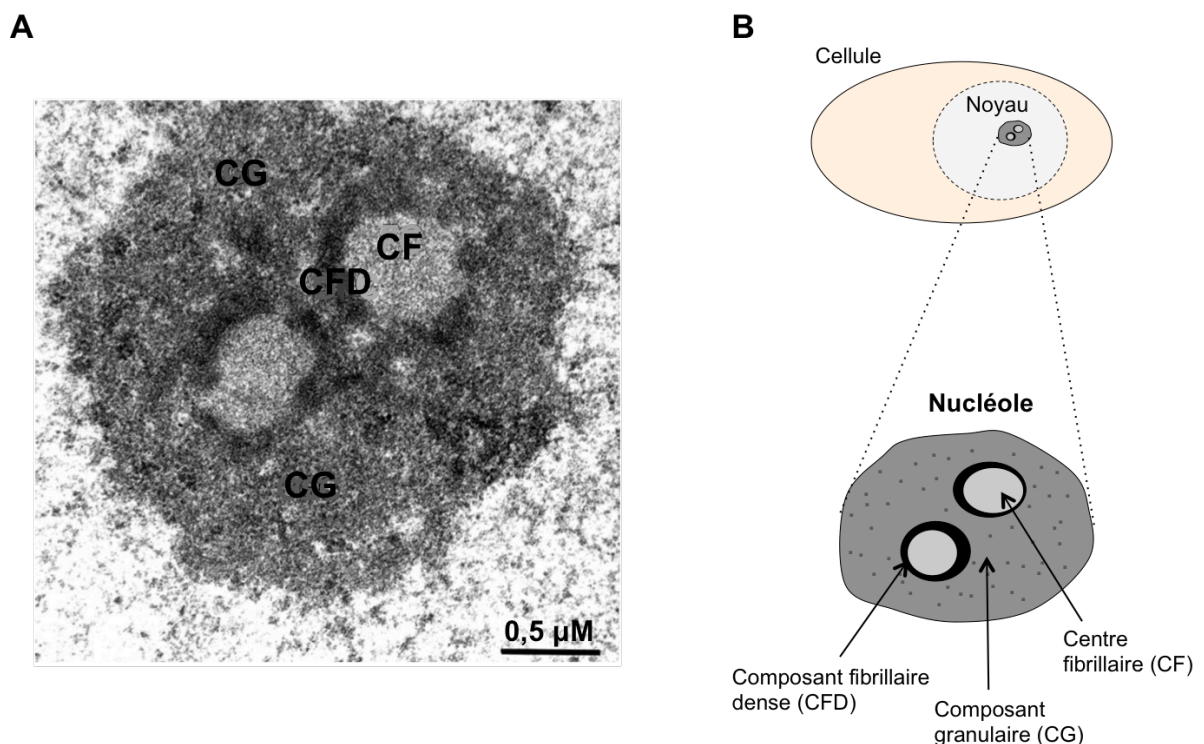


Figure 6 : Organisation de l'ultrastructure du nucléole.

Un nucléole de cellule HeLa capturé par microscopie électronique. Les 3 compartiments nucléolaires sont parfaitement distinguables : le centre fibrillaire (CF), le composant fibrillaire dense (CFD) et le composant granulaire (CG). Image tirée de (Sirri et al., 2002). (B) Représentation schématique de la structure des nucléoles. La transcription de l'ARNr s'opère à l'interface entre le CF et le CFD. La maturation des ARNr s'effectue au sein du DFC et l'assemblage des sous-unités pré-ribosomiques se déroule dans le CG.

2. La transcription de l'ADNr

Chez tous les eucaryotes, les gènes de l'ADN ribosomique sont organisés en tandem, c'est-à-dire que plusieurs copies sont répétées de manière adjacente et orientées dans le même sens de lecture. Bien que l'ADNr soit très fortement transcrit, et représente environ 80% de la synthèse totale d'ARN de la cellule, les 400 copies de l'ADNr comptabilisées chez l'Homme ne sont pas toutes actives (Fewell and Woolford, 1999). Même lorsqu'une forte production de ribosomes est nécessaire en phase exponentielle de croissance cellulaire, il est estimé que seulement 60 % des gènes ribosomiques sont exprimés (Conconi et al., 1989). Cette organisation de l'ADNr semble exercer un niveau de contrôle de l'activité et de l'organisation du nucléole (Shou et al., 2001; Trumtel et al., 2000).

La transcription de l'ADNr est donc la première étape de la biogenèse des ribosomes. Celle-ci est réalisée à la jonction entre le centre fibrillaire et le composant fibrillaire dense. Le gène de l'ADNr code pour un précurseur ARN ribosomique 47S (pré-ARNr 47S). Le pré-ARNr 47S est un ARN polycistronique puisque ce seul transcrit contient les séquences de plusieurs ARN : les ARNr matures 28S, 18S et 5.8S. L'ARNr 5S est transcrit de manière indépendante par l'ARN polymérase III (ARN pol III) dans le noyau puis est importé vers le nucléole pour intégrer la particule pré-ribosomique 60S en formation.

La transcription de l'ADNr nécessite l'assemblage d'un complexe multiprotéique comprenant l'ARN pol I au niveau du promoteur de l'ADNr (Drygin et al., 2010). Le recrutement de l'ARN pol I sur le promoteur de l'ADNr n'est pas spontané et nécessite la fixation préalable de deux cofacteurs spécifiques de l'ARN pol I : UBF et SL1 (Bell et al., 1990; Friedrich et al., 2005) (voir **figure 7**). UBF (*Upstream Binding Factor*) est un facteur d'initiation de la transcription. Sous la forme d'un dimère, UBF se fixe sur la région promotrice de l'ADNr grâce à ses domaines HMG (*High Mobility Group*), mais cette interaction est dynamique et de courte demi-vie. La stabilisation de cette interaction dépend de la liaison du complexe multi-protéique SL1 (*Selectivity Factor 1*), composé du facteur TBT (*TATA Binding Protein*) et de trois facteurs TAFs (*TBP Associated Factors*). Le complexe SL1 réduit la capacité de dissociation de UBF sur l'ADNr, augmentant le temps de transit de UBF au niveau du promoteur. Au sein du complexe stabilisé UBF-SL1-ADNr, SL1 est responsable de la sélectivité du recrutement de l'ARN pol I sur le promoteur de l'ADNr.

L'assemblage final du complexe de pré-initiation de la transcription se fait par la liaison entre le facteur TIF-IA (préalablement associé à l'ARN pol I) et certains facteurs TAF composant le complexe SL1 (pour revue, (Russell and Zomerdijk, 2006). Par la suite, la phase d'élongation de la transcription débute par la dissociation de TIF-IA de l'ARN pol I, tandis que SL1 et UBF restent fixés au promoteur de l'ADNr, afin de recruter une nouvelle molécule d'ARN pol I. De cette manière, les ADNr sont transcrits en même temps par plusieurs ARN pol I, pour permettre d'assurer la production d'une quantité suffisante de ribosomes indispensables au maintien de l'homéostasie cellulaire. Enfin, la déplétion d'UBF induit l'inactivation réversible du promoteur de l'ADNr, par le remodelage de la chromatine inactive. L'expression d'UBF diminue au cours de la différenciation cellulaire ce qui conduit à une diminution du pool d'ADNr disponible (Sanij et al., 2008)

Transcription d'ADNr en microscopie électronique

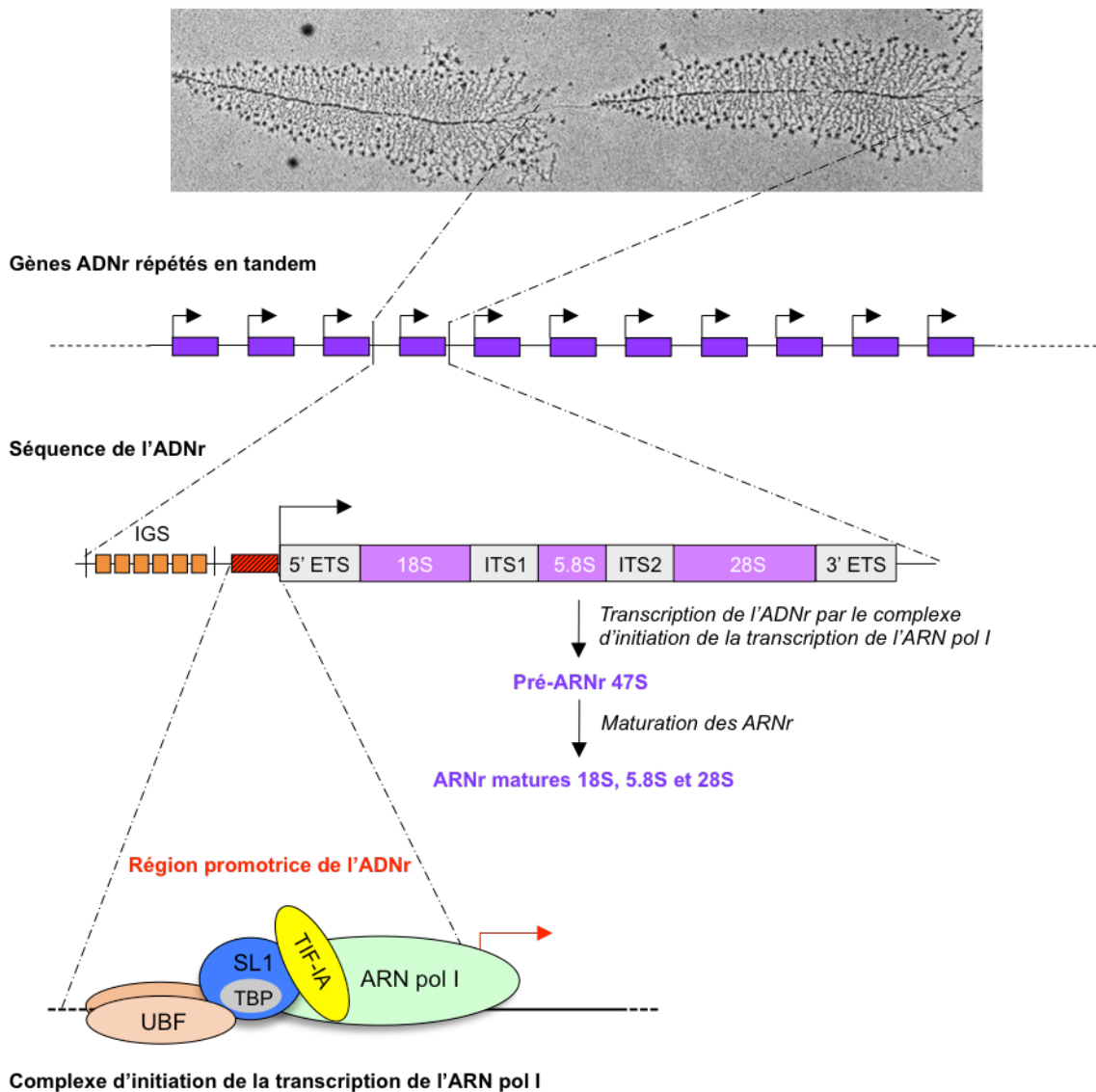


Figure 7 : Organisation des répétitions en tandem des gènes de l'ADNr et composition du complexe de l'ARN pol I.

Des multiples copies du gène de l'ADNr sont répétées en tandem et orientées dans le même sens de lecture au sein d'un locus. Le gène de l'ADNr comprend les séquences des ARNr matures 18S, 5.8S et 28S. Le complexe d'initiation de la transcription de l'ADNr se forme au niveau du promoteur de l'ADNr. Un dimère du facteur d'initiation de la traduction UBF et le complexe SL1 se fixent au préalable au niveau du promoteur de l'ADNr et induisent le recrutement de l'ARN pol I, qui interagit avec SL1 par l'intermédiaire de son cofacteur TIF-IA. Une fois que le complexe d'initiation de la transcription est formé, TIF-IA se dissocie de l'ARN pol I pour permettre l'élongation de la transcription. IGS : *Intergenic spacer* ; ETS : *Externally transcribed sequence* ; ITS : *Internally transcribed sequence*. L'image de microscopie électronique est tirée de *Molecular Biology of the Cell*, quatrième édition, 2002.

3. La maturation des ARNr

L'ARN polymérase I réalise la transcription du précurseur ARNr polycistronique 47S (pré-ARNr 47S). Il contient de 5' en 3' les séquences des ARNr matures 18S, 5.8S et 28S. Ces derniers sont séparés par des séquences internes nommées ITS (*Internally Transcribed Sequence*) : l'ITS1 est situé entre le 18S et le 5.8S, et l'ITS2 est situé entre le 5.8S et le 28S. On retrouve également des séquences externes nommées ETS (*Externally Transcribed Sequence*) en 5' et en 3' (5'ETS et 3'ETS). Après la transcription de l'ADNr, le précurseur ARNr 47S va subir une succession de clivages endonucléolytiques et exonucléolytiques afin d'exciser les séquences ETS et ITS et donner naissance aux ARNr matures.

Chez l'Homme, 12 sites de coupures ont été recensés dans la séquence du pré-ARNr 47S (pour revue, (Mullineux and Lafontaine, 2012). La maturation des ARNr débute par le clivage des deux extrémités des segments 5'ETS et 3'ETS, sur les sites 01 et 02, respectivement, ce qui génère le précurseur ARNr 45S (pré-ARNr 45S) (voir **figure 8**). Ensuite, le pré-ARNr 45S peut suivre deux voies de maturation différentes (Bowman et al., 1981).

Dans la voie majoritaire de maturation, le pré-ARNr 45S est clivé au niveau du site 2 de l'ITS1, formant ainsi les intermédiaires 30S et 32S destinés à la formation des sous-unités pré-40S et pré-60S. Le pré-ARNr 30S est ensuite coupé en 5' aux sites A0 et 1 simultanément pour générer le pré-ARNr 21S. L'extrémité 3' de ce dernier subit différents clivages afin d'obtenir l'intermédiaire de maturation pré-ARNr 18S-E. Ce dernier subit une dernière étape de clivage au niveau du site 3, qui s'effectue dans le cytoplasme, et donne ainsi naissance à l'ARNr mature 18S de la petite sous-unité. En parallèle, le pré-ARNr 32S est coupé au site 3' de l'ITS2 pour donner l'ARNr 28S mature et le pré-ARNr 12S, intermédiaire de maturation du 5.8S. La maturation du 12S en l'ARNr mature 5.8S est assurée par l'exosome, complexe protéique capable d'hydrolyser les molécules d'ARN à partir de leur extrémité 3'.

Dans la voie minoritaire de maturation, le pré-ARNr 45S subit deux clivages successifs dans la région 5'ETS au niveau de sites A0 et 1, générant la forme pré-ARNr 41S. Ensuite, une coupure au sein de la région ITS1 au site 2 permet la formation des précurseurs 21S et 32S qui suivront les mêmes étapes de maturation que la voie majoritaire. Le clivage au niveau de l'ITS1 peut avoir lieu alternativement au site E plutôt qu'au site 2. Les intermédiaires pré-ARNr 18S-E et 36S sont alors formés. Le 36S subit différents clivages et

forme successivement les intermédiaires 36S-C et 32S qui suit les mêmes étapes de clivage que la voie majoritaire.

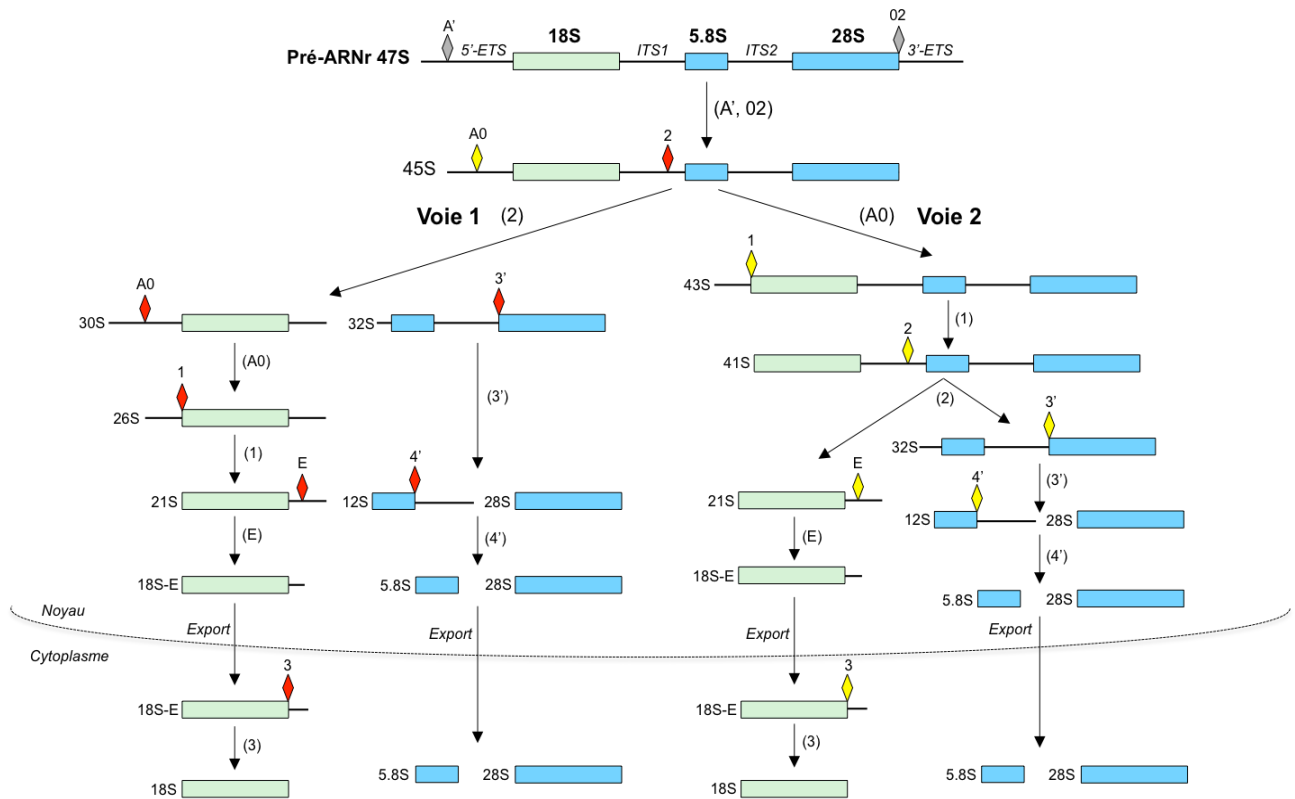


Figure 8 : Les étapes de la maturation des ARN ribosomiques.

Une fois généré, le pré-ARNr 45S peut être clivé soit au niveau du site 2 de la région ITS1, soit au niveau du site A0 de la région 5'ETS, définissant respectivement l'enclenchement de la voie majoritaire (vert) ou de la voie minoritaire (rose et violet) de la maturation des ARN ribosomiques. À la suite de clivages endo- et exonucléolytiques, des intermédiaires différents de précurseurs ARNr sont générés, selon la voie de maturation empreintée. *In fine*, toutes les voies aboutissent à la formation des trois ARNr matures 28S, 18 et 5.8S (Henras et al., 2015).

4. Les modifications post-traductionnelles des ARNr

Au cours de leur processus de maturation, les pré-ARNr subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles (pour revue (Decatur and Fournier, 2002)). Chez l'Homme, les isomérisations d'uridine en pseudouridines (pseudouridylation) et les méthylations de riboses (2'O-méthylation) sont les modifications les plus courantes. Environ 100 sites de ces deux types de modifications ont été recensés sur l'ARNr humain. Des méthylations de bases nucléotidiques sont également identifiées mais sont dix fois moins nombreuses (Maden, 1990; Piekna-Przybylska et al., 2008). Il est important de noter que ces modifications post-traductionnelles sont réparties dans les régions fonctionnelles des ARNr,

tel que le centre peptidyl-transférase (Nissen et al., 2000). Il a été démontré que la pseudouridylation et la 2'O-méthylation sont cruciales pour l'activité traductionnelle des ribosomes (Esguerra et al., 2008; Tollervey et al., 1993). Bien que la perte individuelle d'une de ces modifications ne semble pas affecter sévèrement la fonction ribosomique, la perte de plusieurs modifications entraîne au contraire des phénotypes drastiques, ce qui prouve leur importance fonctionnelle globale dans l'activité du ribosome (King et al., 2003; Liang et al., 2009). Plus généralement, les modifications post-traductionnelles des ARNr servent de support moléculaire pour stabiliser les conformations requises de l'ARNr (Ofengand, 2002) et sont absentes des régions où les protéines ribosomiques se lient (Decatur and Fournier, 2002).

Les pseudouridylations et les 2'O-méthylations sont dirigées par des petits complexes protéiques nucléolaires, les snoRNP (*small nucleolar Ribonucleoprotein*). Les snoRNP sont composés de petits ARN nucléolaires non codants appelés snoARN (*small nucleolar RNA*), ainsi que d'une dizaine de protéines. Ne possédant pas d'activité enzymatique intrinsèque, les snoARN servent de guide pour les enzymes du complexe. Les snoARN possèdent de courtes séquences hautement conservées qui s'hybrident par complémentarité avec des régions spécifiques de l'ARNr, ce qui leur confèrent une spécificité de reconnaissance des nucléotides à modifier (Cavaillé et al., 1996). Il existe deux classes de snoRNP correspondant selon leur structure et leur motif conservé : les snoRNP à boîte H/ACA et les snoRNP à boîte C/D (voir **figure 9**). Au sein du snoRNP H/ACA, la fibrillarine (FBL) catalyse la 2'O-méthylation des ARNr, tandis que la pseudouridylation est catalysée par la dyskerine au sein du complexe snoRNP C/D (Tollervey and Kiss, 1997). Pour permettre le repliement précis du pré-ARNr et son assemblage avec les protéines ribosomiques, les snoARN doivent se dissocier de l'ARNr. Ces processus impliquent des hélicases à ARN et des facteurs de la famille des RBPs (*RNA-binding proteins*)(Watkins and Bohnsack, 2012).

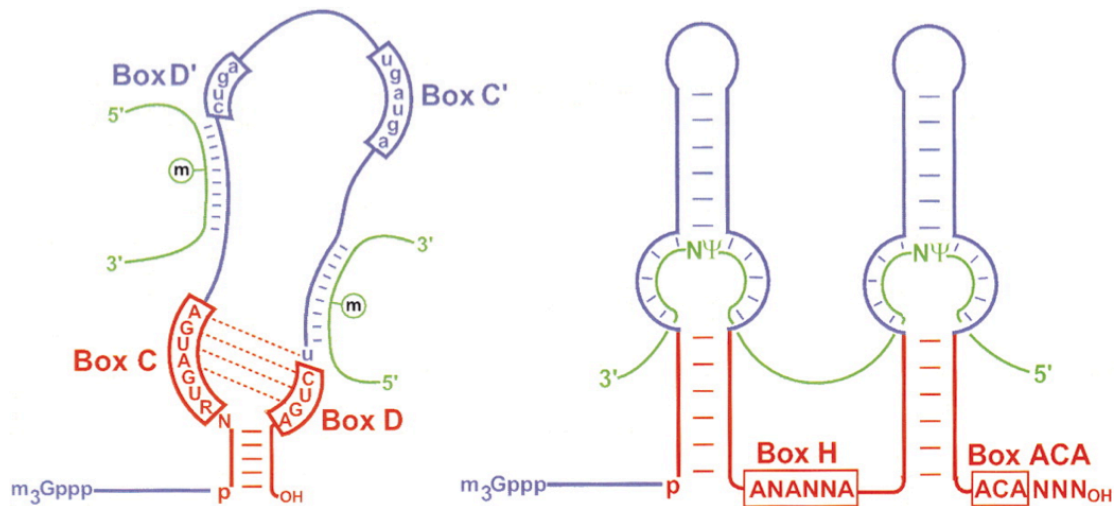


Figure 9 : Structure des snoARN à boîte C/D et à boîte H/ACA, d'après (Kiss, 2002).

Les snoARN sont des petits ARN nucléolaires non codants impliqués dans la maturation des ARNr. Ils sont classés en deux groupes selon les motifs nucléotidiques qui les composent : les snoARN à boîte C/D et les snoARN à boîte H/ACA. Les snoARN dirigent les modifications post-traductionnelles des ARNr en s'hybridant spécifiquement sur les séquences complémentaires des ARNr. Les snoARN à boîte C/D sont responsables des méthylations des ARNr tandis que les snoARN à boîte H/ACA assurent les pseudouridylations.

5. La synthèse des protéines ribosomiques

Comme tous les gènes codant les protéines cellulaires, les gènes codant pour les 80 protéines ribosomiques humaines (RPs) sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARN pol II). Après leur transcription, les ARNm sont exportés vers le cytoplasme où ils sont traduits par les ribosomes matures. Enfin, les 80 protéines ribosomiques sont importées dans le nucléole pour participer à la maturation et l'assemblage des sous-unités ribosomiques. Les phénotypes sévères associés à la perte de fonction de certaines RPs soulignent leur importance dans la production de ribosomes fonctionnels (voir partie III) de l'introduction : le ribosome en pathologies).

Les gènes codant pour les protéines ribosomiques sont dispersés dans le génome mais partagent certaines caractéristiques. Ces gènes ont une séquence codante de petite taille et hautement conservée entre les espèces. Les ARNm des protéines ribosomiques appartiennent tous à la famille des transcrits 5'TOP puisque leur région 5' porte une séquence oligopyrimidique. De plus, leurs séquences en 5'UTR et 3'UTR sont significativement plus courtes que la moyenne du génome entier (Yoshihama et al., 2002).

Suite à leur synthèse dans le cytoplasme, les protéines ribosomiques sont importées dans le nucléole. Pour cela, les RPs sont associées de manière co-traductionnelle à des protéines chaperonnes dont la fonction est de les protéger de la dégradation et de faciliter leur importation dans le nucléole jusqu'à leur site d'assemblage sur les ARNr naissants (Pillet et al., 2015; Schütz et al., 2014). Les RPs non incorporées aux particules pré-ribosomiques sont également ubiquitylées pour être dégradées par le protéasome dans le noyau (Lam et al., 2007). Une fois dans le nucléole, les RPs se fixent de manière séquentielle aux ARNr, dès le stade précurseur 47S et tout au long de la maturation des ARNr. Ainsi, plus la maturation des ARNr progresse, et plus le nombre de RPs associées aux particules pré-ribosomiques est important.

Avant de rejoindre le nucléole, les protéines ribosomiques peuvent subir des modifications post-traductionnelles susceptibles de moduler la stabilité, la localisation subcellulaire et l'interaction des protéines ribosomiques avec certains partenaires. En outre, l'identification de modifications anormales ont été directement liées à certaines pathologies humaines (Simsek and Barna, 2017). La compréhension des mécanismes précis de ces modifications et leurs conséquences sur la stabilité des ribosomes ainsi que sur le contrôle de l'activité traductionnelle sont des questions qui émergent et suscitent l'intérêt des chercheurs.

6. L'assemblage des sous-unités ribosomiques

L'assemblage des particules pré-ribosomiques débute de manière co-transcriptionnelle. En effet, il est important de comprendre que la transcription de l'ADNr, la maturation et les modifications des ARNr, l'assemblage des protéines ribosomiques, sont des étapes qui ont lieu simultanément dans le nucléole. L'assemblage des ARNr aux protéines ribosomiques et le remodelage des particules pré-ribosomiques font intervenir plus de 300 facteurs non ribosomiques, tels que des ARN hélicases, ATPases et GTPases qui permettent de fournir l'énergie nécessaire à ces modifications moléculaires.

Le précurseur ARNr 47S en cours de transcription est rapidement pris en charge par les premières RP et les premiers facteurs d'assemblage, formant ainsi la particule pré-ribosomique 90S (pour revues, (Bohnsack and Bohnsack, 2019; Thomson et al., 2013). Cette dernière est la première particule pré-ribosomique stable isolée *in vivo*, et se constitue avant que les étapes de clivages des pré-ARNr ne débutent. Le clivage au site 2 du pré-ARNr

conduit à la séparation des pré-ARNr des sous-unités naissantes, dénommées la pré-40S et la pré-60S. La biogenèse suit ensuite deux voies distinctes : la maturation de la pré-40S pour produire la petite sous-unité et la maturation de la pré-60S pour produire la grande sous-unité. Ces étapes de maturation nécessitent une séquence ordonnée d'assemblage hiérarchique des RPs et des facteurs d'assemblage au sein des sous-unités en formation, appelées pré-40S et pré-60S, qui transitent dans le nucléole. Ces sous-unités ribosomiques immatures sont ensuite exportées vers le noyau, puis à travers le pore nucléaire vers le cytoplasme où elles subissent les dernières étapes de maturation et d'assemblage pour former les deux sous-unités fonctionnelles.

C. La régulation de la biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est un processus crucial qui fournit aux cellules la machinerie traductionnelle indispensable à la production des protéines cellulaires. La croissance cellulaire (augmentation de la masse cellulaire) et la prolifération cellulaire (augmentation du nombre de cellules) sont deux phénomènes intimement liés à la synthèse protéique et donc à la production des ribosomes (pour revues (Donati et al., 2012; Grummt, 2003)). En effet, la prolifération cellulaire nécessite une augmentation progressive de la croissance cellulaire - par la stimulation de la synthèse protéique et de la production de ribosomes - avant chaque division, garantissant aux cellules filles une composition optimale.

De par l'extraordinaire complexité de la biogenèse des ribosomes et la quantité importante de ribosomes requis pour qu'une cellule prolifère, ce processus est le plus important consommateur d'énergie de la cellule. Chez la levure, 60% de transcription globale est dédiée à la transcription de l'ADNr, et 50% de la transcription par l'ARN pol II est dédiée à la synthèse de protéines ribosomiques (Warner and McIntosh, 2009). Un contrôle étroit de la biogenèse des ribosomes est donc fondamental afin que la cellule adapte sa croissance et sa prolifération en fonction de la disponibilité des ressources cellulaires.

1. Régulation croisée de la biogenèse des ribosomes et de la croissance cellulaire

Les cellules ajustent leur croissance et leur prolifération cellulaire en réponse à différents signaux intra- et extracellulaires, tels que la disponibilité en facteurs de croissance,

en nutriments, et le statut énergétique de la cellule. L'intégration de ces signaux est critique pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, et est au centre d'un réseau de voies de signalisation (Kusnadi et al., 2015). Ces voies de signalisation interviennent dans la croissance et la prolifération cellulaire et régulent directement la biogenèse des ribosomes à différents niveaux. En particulier, il est clairement établi que les voies de signalisation mTOR et RAS/RAF/ERK, en association avec le facteur de transcription *c-Myc*, forment un vaste réseau de contrôle de la biogenèse des ribosomes.

a. La voie mTOR

La sérine/thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est très conservée chez les eucaryotes, et constitue le centre catalytique de deux complexes multiprotéiques distincts nommés mTORC1 et mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 1 et complex 2*) (Laplante and Sabatini, 2009; Saxton and Sabatini, 2017). Par l'intégration des signaux environnants (métaboliques, nutritifs et énergétiques), mTOR est un régulateur clé de la croissance et de la prolifération cellulaire. L'activité des voies de signalisation mTOR s'adapte aux ressources cellulaires pour coordonner la biosynthèse des protéines et la biogenèse des ribosomes.

– *Le complexe mTORC1*

Le complexe mTORC1 est composé de cinq facteurs, dont le rôle fonctionnel exact n'est pas clairement élucidé. Lorsqu'il est actif, le complexe mTORC1 phosphoryle un grand nombre de substrats dont certains sont connus pour réguler la biogenèse des ribosomes à différents niveaux (voir **figure 10**). D'une part, mTORC1 est impliqué dans l'activation de la transcription de l'ADNr. Pour rappel, la transcription de l'ADNr est réalisée par l'ARN pol I dont le recrutement nécessite la liaison initiale du facteur de transcription UBF sous sa forme phosphorylée au promoteur, et le facteur TIF-1A qui est préalablement fixé à l'ARN pol I. En 2003, une équipe a montré qu'un des substrats majeurs de mTORC1, p70S6K (*Ribosomal protein S6 kinase*), régule l'activité du facteur UBF en favorisant la phosphorylation de son domaine d'activation en C-terminal (Hannan et al., 2003). L'inhibition de mTORC1 par la rapamycine inhibe la phosphorylation de UBF, ce qui empêche la liaison entre UBF et TIF-1A (Hannan et al., 2003). Le complexe de pré-initiation de la transcription de l'ARN pol I

(PIC) ne peut se former et la transcription de l'ADNr est inhibée (Hannan et al., 2003). Une autre équipe a montré, dans des lignées embryonnaires humaine et murine, que mTORC1 régule aussi le facteur TIF-1A. En favorisant la phosphorylation du résidu sérine 44 requise pour l'activité de TIF-1A, et en diminuant la phosphorylation inactivatrice sur le résidu sérine 199, mTORC1 régule à un autre niveau la formation du complexe PIC de l'ARN pol I sur le promoteur de l'ADNr (Mayer et al., 2004).

En plus de réguler la transcription de l'ADNr, mTORC1 serait impliqué dans la transcription de l'ARNr 5S et des ARNt. Ces derniers sont transcrits par l'ARN pol III qui forme un complexe avec différents facteurs d'initiation de la transcription dont le facteur TIF-IIIc. Une étude publiée en 2010 montre que le complexe mTORC1 est retrouvé associé sur le promoteur du gène de l'ARNr 5S par une interaction directe entre mTOR et TIF-IIIc, suggérant un contrôle positif direct de la transcription de cet ARNr 5S (Kantidakis et al., 2010). De plus, le répresseur Maf1, qui lie et inhibe directement l'ARN pol III, peut être phosphorylé par mTORC1, ce qui inhibe sa fonction de répresseur transcriptionnel (Kantidakis et al., 2010). En plus de réguler la transcription des ARNr, mTORC1 pourrait contrôler le processus de maturation des ARNr. En effet, le traitement des cellules avec la rapamycine provoque la dégradation des ARNr nouvellement fabriqués et l'accumulation subséquente d'intermédiaires pré-ARNr (le 30S et le 32S), indiquant que des étapes spécifiques de la maturation des ARNr seraient bloquées par l'inhibition de mTORC1 (Iadevaia et al., 2014).

En outre, mTORC1 orchestre la traduction des protéines ribosomiques et des facteurs de la biogenèse des ribosomes (RiBi pour *Ribosome Biogenesis*). Les ARNm codant pour les protéines ribosomiques présentent tous une séquence courte à l'extrémité 5' riche en pyrimidines, nommée 5'TOP. L'existence d'un motif commun à tous les transcrits des RPs est essentiel pour coordonner leur traduction. La spécificité de la régulation de la traduction des ARNm 5'TOP par mTORC1 dépend de la protéine LARP1 (*La-related protein 1*). Récemment identifiée, LARP1 est un substrat direct de mTORC1 qui reconnaît et se fixe spécifiquement sur le motif 5'TOP des ARNm (Fonseca et al., 2015). La régulation de la traduction de ce groupe d'ARNm est dépendante de l'état de croissance de la cellule. Ainsi, lorsque les conditions ne sont pas optimales pour la croissance et la prolifération cellulaire, mTORC1 est inhibé, LARP1 se lie au motif 5'TOP et sur la région 3'UTR, réprimant fortement la traduction des transcrits des RPs. A l'inverse lorsque les conditions de croissance

et de prolifération sont optimales, mTORC1 est stimulé et phosphoryle LARP1 qui ne fixe plus le motif 5'TOP, libérant ainsi l'espace pour le complexe d'initiation de la traduction qui devient pleinement actif (Lahr et al., 2017; Philippe et al., 2018). En outre, mTORC1 régule également la traduction des facteurs de la biogenèse des ribosomes (RiBi). Enfin, dans un modèle murin invalidé pour la protéine p70S6K, l'équipe de M. Pende observé une diminution de plus de 75% des facteurs RiBi. Cette étude révèle le rôle de p70S6K dans le contrôle d'un programme transcriptionnel spécifique des gènes codant les RiBi (Chauvin et al., 2014).

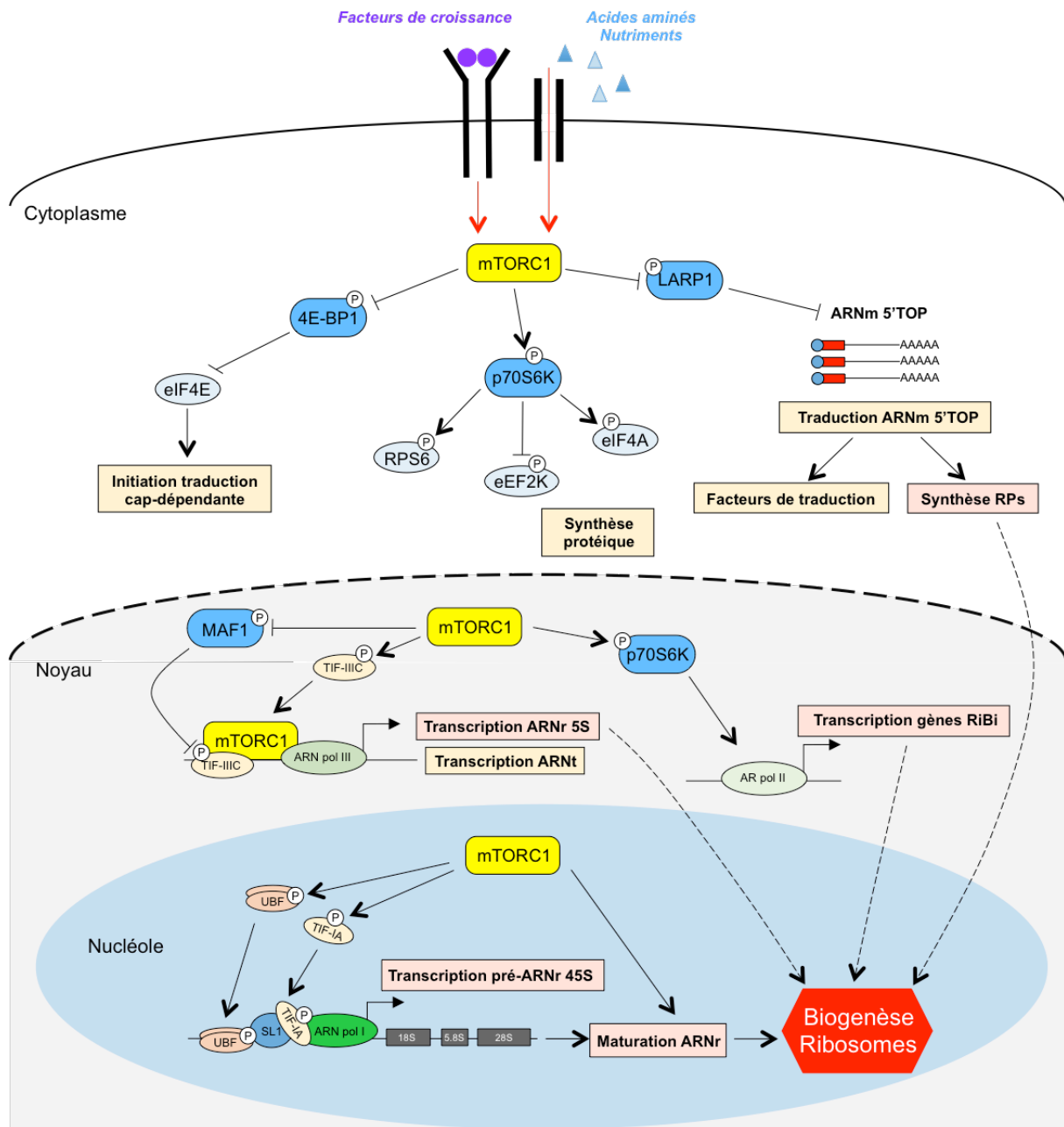


Figure 10 : Régulation de la biogenèse des ribosomes par le complexe mTORC1.

La voie mTORC1, activée par les facteurs de croissance et l'abondance de nutriments, intervient à plusieurs niveaux dans la régulation des ribosomes. Dans le nucléole, le complexe mTORC1 favorise la transcription de l'ADNr en activant le recrutement des cofacteurs de l'ARN pol I au niveau de la région promotrice de l'ADNr ; et participe à la maturation des ARNr par des mécanismes moléculaires encore non élucidés. Dans le noyau, le complexe mTORC1 régule la transcription spécifique de l'ARN pol III, permettant la synthèse de l'ARNr 5S et des ARNt. En parallèle, le substrat de mTORC1, p70S6K, active un programme transcriptionnel spécifique des gènes de la biogenèse des ribosomes (RiBi). Enfin, dans le cytoplasme, le complexe mTORC1 phosphoryle plusieurs substrats. La phosphorylation de LARP1 favorise la traduction des ARNm 5'top, dont les gènes codant les RPs et un grand nombre de facteurs de traduction font partie. La phosphorylation de p70S6K active la synthèse protéique et la phosphorylation inhibitrice de 4E-BP1 entraîne l'activation de la traduction cap-dépendante.

Ainsi, mTORC1 est capable de moduler l'activité de toutes les ARN polymérases I, II et III, et donc coordonner à la fois la traduction protéique et la biogenèse des ribosomes. Par son rôle global dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire, mTORC1 est un intégrateur de la physiologie de la cellule et de l'environnement extracellulaire, permettant d'offrir aux cellules une croissance et une prolifération adaptée (Mayer and Grummt, 2006).

– Le complexe mTORC2

La voie de signalisation mTORC2 est bien moins connue que la voie mTORC1. Alors que mTORC1 participe à des voies de signalisation contrôlant la croissance et la prolifération cellulaire, mTORC2 régule la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette de l'actine. Parmi les cibles notoires de mTORC2, il y a la protéine kinase Akt, qui notamment régule mTORC1. Akt est l'effecteur clé de la voie de signalisation PI3K/Akt contrôlant la prolifération et la survie cellulaire. Deux études récentes ont révélé un lien entre les ribosomes et mTORC2. En effet, mTORC2 est capable de s'associer directement sur les ribosomes matures (Oh et al., 2010; Zinzalla et al., 2011). Selon Zinzalla et al., cette association est requise pour l'activation de la voie de signalisation de mTORC2, et cela indépendamment de la synthèse protéique. Plus particulièrement, l'interaction de mTORC2 avec le ribosome serait réalisée en réponse à l'activation de la voie PI3K/Akt (Zinzalla et al., 2011). La seconde équipe s'est intéressée à la signalisation induite par l'interaction de mTORC2 avec les ribosomes. Durant la traduction de Akt, mTORC2 est capable d'intervenir de manière co-translationnelle pour phosphoryler le peptide naissant sur le résidu thréonine 450, permettant ainsi de stabiliser la kinase (Oh et al., 2010).

b. L'axe de signalisation RAS/RAF/ERK

La signalisation RAS/RAF/ERK joue un rôle important dans la régulation de la biogenèse des ribosomes. En effet, il a été montré que la kinase ERK, activée notamment en aval de l'activation de récepteurs de facteurs de croissance, régule la transcription de l'ADNr. D'une part, ERK peut phosphoryler TIF-IA sur le résidu sérine 649, et une approche de mutagenèse démontre que cette phosphorylation est indispensable à l'initiation de la transcription dépendante de l'ARN pol I (Zhao et al., 2003). D'autre part, le facteur UBF est

phosphorylé par ERK sur deux thréonines essentielles pour l'élongation de la transcription par l'ARN pol I (Stefanovsky et al., 2001). Ces données établissent un lien de signalisation entre la stimulation des cellules par les facteurs de croissance et la régulation de la biogenèse des ribosomes.

c. Le facteur de transcription *c-Myc*

Le facteur de transcription *c-Myc* est décrit comme un régulateur global de nombreux processus cellulaires, incluant la croissance, la prolifération, l'apoptose ou encore le cycle cellulaire. De ce fait, la dérégulation de l'expression de *c-Myc* a été impliquée dans le développement d'un grand nombre de cancers (Dang et al., 2006). Plusieurs études récentes suggèrent que Myc peut réguler positivement la synthèse protéique globale par la stimulation directe de la biogenèse des ribosomes (pour revue, (van Riggelen et al., 2010).

En effet, Myc est capable d'activer la transcription de l'ADNr par plusieurs mécanismes. D'une part, en se fixant sur la région promotrice de l'ADNr, Myc favorise la formation du complexe de pré-initiation de transcription (PIC) par le recrutement des cofacteurs de l'ARN pol I, UBF et TIF-IA. La transcription de l'ARN pol I est également favorisée par le remodelage de la structure de la chromatine (Arabi et al., 2005; Grandori et al., 2005). Myc se fixe également sur les promoteurs des gènes de UBF et TIF-IA, favorisant l'expression des cofacteurs de l'ARN pol I, ainsi que des sous-unités de l'ARN pol I (Poortinga et al., 2004). D'autre part, Myc régule la transcription de l'ARNr 5S et des ARNt en se liant sur TIF-IIIB, le co-facteur de l'ARN pol III (Gomez-Roman et al., 2003). Enfin, Myc peut coordonner la transcription par l'ARN pol II d'un grand nombre de gènes, codant notamment pour des protéines ribosomiques et des facteurs impliqués dans la maturation des ARNr. C'est par exemple le cas de la fibrillarine (FBL) et de la nucléophosmine (NPM1) (Coller et al., 2000; Schlosser et al., 2003; Zeller et al., 2001). En particulier, Myc active la transcription du gène codant la protéine ribosomique RPL11, et par un rétrocontrôle négatif, cette dernière peut inhiber l'activité de Myc et l'expression de ses gènes cibles, révélant des régulations croisées complexes (Dai et al., 2007).

En outre, Myc est un effecteur en aval de plusieurs voies de signalisation contrôlant la croissance et la prolifération cellulaire. En tant que substrat direct de la kinase ERK, la phosphorylation de Myc entraîne une augmentation de sa stabilité (Sears et al., 1999). De

plus, la stimulation de la voie mTORC1, *via* l'activation de 4E-BP1, promeut la traduction de *c-Myc* (West et al., 1998). Ces boucles de régulations peuvent amplifier la stimulation de la biogenèse des ribosomes, notamment lorsque Myc est surexprimé dans les cancers.

2. Régulation croisée de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire

a. Généralités sur le cycle cellulaire eucaryote

Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère croît jusqu'à atteindre une taille critique et accumule le matériel nécessaire pour sa division en deux cellules filles identiques. Le cycle cellulaire eucaryote se décompose en quatre phases majeures (voir **figure 11A**). La phase G1 (*Growth 1*) est la période qui suit la mitose, et qui correspond à une phase de croissance cellulaire. L'accumulation des composants cellulaires par la synthèse continue d'ARN et de protéines permet à la cellule de doubler sa taille et sa masse. Durant la phase S (*Synthesis*), la cellule réplique son ADN afin de générer deux copies identiques du matériel génétique qui sont ensuite réparties équitablement entre les deux cellules filles. Au cours de la phase G2 (*Growth 2*), la cellule se prépare pour la division cellulaire. Les premières modifications de la structure cellulaire apparaissent et la cellule met en place des machineries nécessaires pour sa division. Enfin, la phase M (*Mitosis*) est la division cellulaire. Cette période correspond à la séparation physique des chromosomes, ainsi que du contenu nucléaire et cytoplasmique entre les deux cellules filles. La phase M est classiquement divisée en 5 étapes, qui seront décrites brièvement. Durant la prophase, les chromosomes se condensent, les centrosomes sont répliqués et se répartissent de part et d'autre du noyau. Ensuite, les chromosomes s'alignent tous au niveau de la plaque équatoriale du fuseau mitotique, pendant la prométaphase et la métaphase. Pendant l'anaphase, les deux chromatides de chaque chromosome se séparent vers les pôles opposés du fuseau. Enfin, la télophase est la dernière phase de la mitose au cours de laquelle la chromatine se décondense et la division des deux cellules filles est achevée.

Pour assurer le déclenchement et la succession parfaite des différentes phases du cycle cellulaire, la cellule dispose d'un système de régulation qui fait intervenir une famille de protéines kinases spécifiques du cycle cellulaire, appelées CDKs (*Cyclin dependant kinases*). Les CDKs sont activées uniquement lorsqu'elles forment un hétéro-dimère avec une classe de

petites sous-unités régulatrices, appelée cyclines. Les cyclines ne sont pas exprimées pendant toutes les phases du cycle cellulaire. Leur synthèse est transitoire et leur demi-vie courte, ce qui leur permet d'intervenir de façon périodique à des étapes précises du cycle cellulaire. Les CDKs peuvent interagir avec plusieurs cyclines différentes, ou bien rester sous forme inactive non associée à une cycline. Le cycle cellulaire est contrôlé par au minimum six complexes CDK/cycline différents qui interviennent à des étapes précises du cycle cellulaire. Le déroulement de la phase G1 est contrôlé par deux types de complexes : CDK4/cycline D et CDK6/cycline D. Puis, l'association CDK2/cycline E assure la transition entre la phase G1 et la phase S, suivie par le complexe CDK2/cycline A qui contrôle le déroulement de la phase S. Enfin, le couple CDK1/cycline A intervient durant la phase G2, et CDK1/cycline B régule la transition entre la phase G2 et l'entrée en mitose. En dehors de leur association avec les cyclines, l'activité des CDK est régulée d'autre part par des événements de phosphorylations/déphosphorylations catalysés par différents types de facteurs. Par exemple, les phosphatases de la famille CDC25 (CDC25A, CDC25B, CDC25C) sont responsables de la déphosphorylation activatrice de certaines CDK. En outre, l'activité des CDK peut être inhibée par des CKI (*CDK inhibitor*), tels que p16, p21 et p27 qui agissent sur les complexes CDK/cycline.

Alors que les CDKs permettent la succession des étapes du cycle cellulaire, d'autres mécanismes se chargent de surveiller le déroulement optimal des processus fondamentaux de la cellule pendant le cycle. Ces mécanismes de surveillance assurent un contrôle qualité et vérifient que les conditions sont favorables à la poursuite du cycle cellulaire. Le DDCP (*DNA damage checkpoint*) est le mécanisme de surveillance de l'intégrité de l'ADN, et le MCP (*Mitotic checkpoint*) est le mécanisme de surveillance de l'achèvement total de la réplication. Ces mécanismes assurent donc le maintien de l'intégrité de l'ADN et la qualité de réplication de l'ADN. Si des lésions de l'ADN sont détectées, ou si la réplication n'est pas effectuée correctement, le cycle cellulaire est bloqué. Cet arrêt a pour but de donner à la cellule le temps d'effectuer les réparations des dommages à l'ADN ou de terminer correctement la réplication avant le passage en mitose. Si les anomalies sont trop importantes ou si les réparations échouent, un programme de mort cellulaire par apoptose est enclenché.

b. La biogenèse des ribosomes au cours du cycle cellulaire

Dans la progression du cycle cellulaire, on observe de nombreuses modifications dans le fonctionnement de la cellule, comme par exemple la réorganisation de la structure du noyau, ou la modulation de la transcription de certaines classes de gènes. Il en est de même pour le processus de la biogenèse du ribosome, dont l'activité varie au cours du cycle cellulaire (voir **figure 11B**). La première évidence de ce fait est la dispersion de la structure du nucléole observée durant la mitose des cellules eucaryotes. La transcription des ARNr et l'assemblage des particules ribosomiques sont régulés par divers mécanismes spécifiques à chaque phase du cycle. Les mécanismes les mieux décrits concernent la régulation de la transcription de l'ADNr au cours du cycle cellulaire, dépendant directement de l'activité de l'ARN pol I et de ses cofacteurs. L'activité de ces derniers est principalement régulée par des modifications post-traductionnelles effectuées par les différents couples CDK/cycline spécifiques de chaque phase du cycle (Fonseca et al., 2015). Dans les cellules quiescentes en phase G0, le facteur UBF est hypophosphorylé. Si la phosphorylation sur plusieurs sites permet d'amorcer la formation du complexe d'initiation de la transcription de l'ARN pol I (Voit et al., 1992). Pendant la phase G1, le résidu sérine 484 d'UBF est phosphorylé par le couple CDK4/cycline D1. Ceci est en faveur du recrutement de l'ARN pol I dont l'activité augmente progressivement. Puis, une deuxième vague de phosphorylation d'UBF sur la sérine 388 est réalisée par les couples CDK2/cycline E et CDK2/cycline A lors des phases S et G2, respectivement. La phosphorylation de ce deuxième site augmente l'activité d'UBF qui est alors maximale. Pendant la mitose, la transcription de l'ADNr est inhibée. Ceci est dû à la phosphorylation inhibitrice du complexe SL1 (TAF₁₁₀ sur la thréonine 852), réalisée par le complexe CDK1/cycline B. L'interaction entre SL1 et UBF n'est plus possible, et UBF est inactivé. À la fin de la mitose, le complexe SL1 est déphosphorylé par la phosphatase Cdc14B. Enfin, cette levée de l'inhibition du complexe SL1 mais l'hypophosphorylation d'UBF entraînent une reprise progressive de l'activité de l'ARN pol I durant la phase G1.

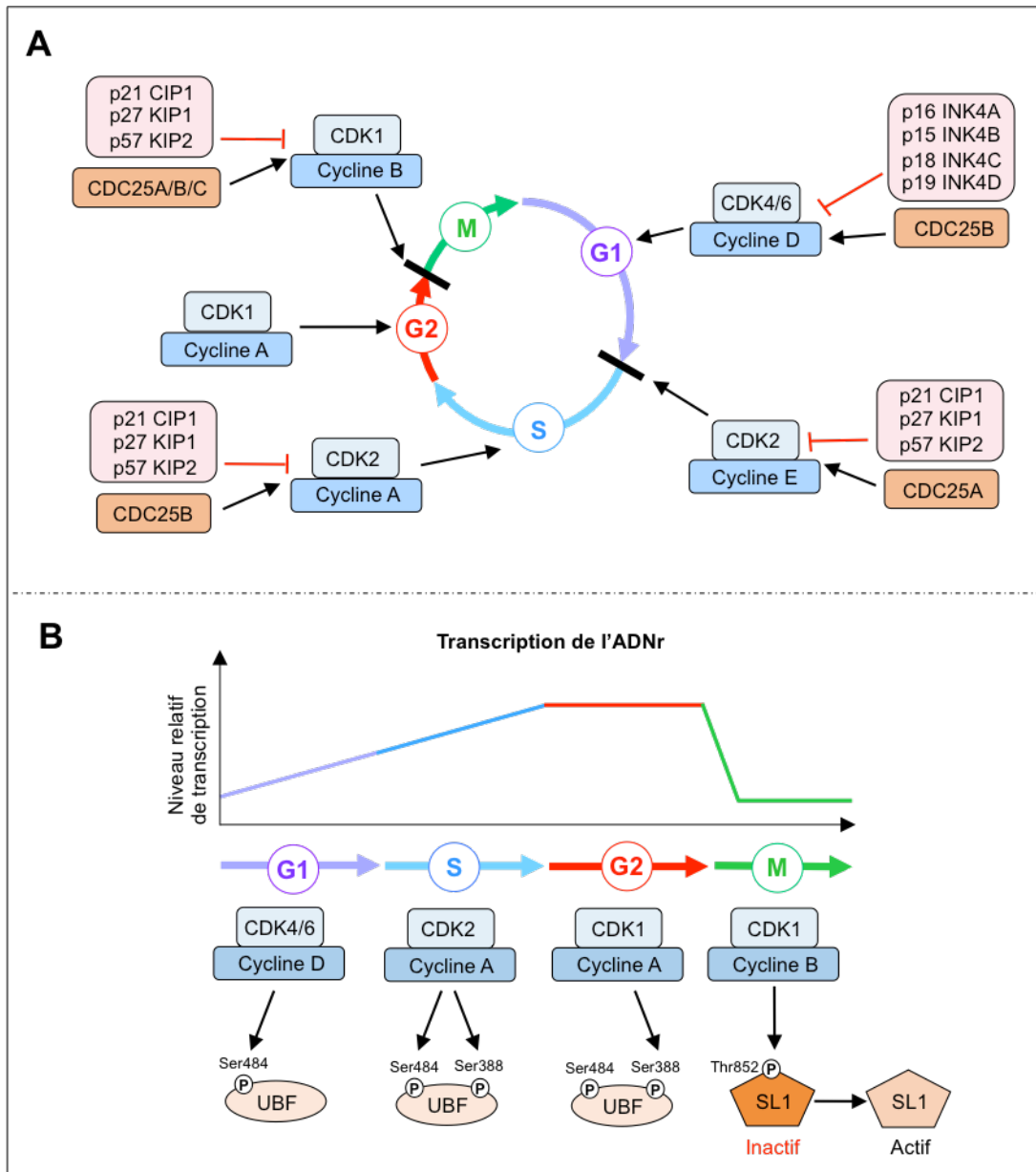


Figure 11 : La régulation de la succession des phases du cycle cellulaire et la cinétique de transcription de l'ADNr au cours du cycle.

(A) Différents complexes CDK/cycline interviennent à des phases spécifiques du cycle cellulaire pour assurer le bon déroulement et la progression du cycle. Ces complexes sont activés par des phosphatases de la famille CDC25 (en jaune) et inhibés par des CKI (*CDK inhibitor*) (en rouge). (B) La transcription de l'ADNr augmente progressivement au cours de la phase G1, atteint un taux maximal au cours des phases S et G2, puis est complètement arrêtée lors de la mitose. L'activité des cofacteurs de l'ARN pol I est directement régulée par les couples CDK/cycline spécifiques de chaque phase du cycle cellulaire. Adapté de (Drygin et al., 2010).

c. Connexions entre le cycle cellulaire, la croissance et la biogenèse des ribosomes

La progression du cycle cellulaire est corrélée à la croissance cellulaire et à la biogenèse des ribosomes. Pour pouvoir se diviser, une cellule doit croître jusqu'à atteindre une taille critique. Des études ont nommé ce seuil critique le « point de restriction » ou le « point START » qui a lieu en fin de phase G1 et conditionne l'entrée en début de phase S. Ce phénomène a été observé dans une grande variété d'organismes procaryotes et eucaryotes, en passant par la levure et les érythroblastes de poulet (Dolznig et al., 2004; Nurse and Thuriaux, 1977). Le point de restriction désigne un événement spécifique de la phase G1 qui peut être subdivisée en phase G1 précoce et G1 tardive (Hartwell et al., 1974). Avant ce point, les cellules en phase G1 « précoce » augmentent activement la synthèse des constituants cellulaires nécessaires pour un passage en phase S, sous l'action des facteurs de croissance. Et passé ce point, en phase G1 « tardive », les cellules ne sont plus sensibles aux facteurs de croissance et prolifèrent indépendamment des stimuli mitogéniques. À partir de ce stade, la cellule est définitivement engagée dans le cycle de la division.

Chez la levure, le blocage du cycle au point de restriction peut être causé par la carence en nutriments ou en facteurs de croissance (Unger and Hartwell, 1976). En particulier, plusieurs études indiquent que c'est la quantité de ribosomes présente dans la cellule qui conditionne la transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire. En effet, l'augmentation de la croissance des cellules en phase G1 nécessite une synthèse importante de protéines, et donc une biogenèse des ribosomes conséquente. De nombreuses études réalisées chez la levure montrent que des défauts de la biogenèse des ribosomes entraînant une diminution du contenu cellulaire en ribosomes a pour conséquence une accumulation des cellules en phase G1 (Bernstein et al., 2007; Rosado et al., 2007; Saracino et al., 2004). De plus, le traitement des levures avec un inhibiteur global de la synthèse protéique, le cycloheximide, empêche la progression des cellules en phase S, ce qui confirme l'importance d'une synthèse protéique active pour la croissance en phase G1 et le passage en phase S (Popolo et al., 1982).

Chez les mammifères, lors de la transition des phases G1 à S, le point de restriction peut être associé à l'activation de la famille des facteurs de transcription E2F (Sherr and McCormick, 2002). E2F régule la transcription de gènes spécifiques à la progression des

cellules en phase S, comme par exemple les gènes de la cycline E, la cycline A, et CDK2. Au début de la phase G1, E2F est inactif car séquestré par la protéine du rétinoblastome (Rb). Au cours de la phase G1, les complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D s'activent progressivement et vont phosphoryler pRb, qui perd son affinité pour E2F. Ceci permet alors la libération de E2F qui se fixe sur l'ADN pour activer l'expression des gènes nécessaires à la progression du cycle en phase S. La transcription de la cycline E et de CDK2 induite par E2F permet ensuite la formation du complexe CDK2/cycline E spécifique de la transition G1/S. Par une boucle de rétro-activation, ce complexe est également capable de phosphoryler Rb, ce qui a pour conséquence d'amplifier le signal d'activation de la transcription des cyclines E et A, induisant le passage en phase S. Des études réalisées dans des modèles de cellules mammifères ont établi un lien entre l'expression de la cycline E et la biogenèse des ribosomes. En effet, l'inhibition de la synthèse d'ARNr dans des cellules hépatiques de rat entraîne un blocage du cycle en phase G1 (Derenzini et al., 2005). En particulier, la diminution globale du contenu cellulaire en ribosomes est associé à une diminution de l'expression de la cycline E, malgré la formation de complexes CDK4/cycline D actifs (Derenzini et al., 2005). De plus, dans un modèle de souris ayant subi une hépatectomie partielle, la délétion de l'expression de la protéine RPS6 (de la petite sous-unité ribosomique) entraîne une altération spécifique de l'expression de la cycline E, et un blocage de la prolifération cellulaire (Volarevic et al., 2000).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la progression de la phase G1 à la phase S est dépendante de l'obtention d'une quantité suffisante de ribosomes produits pour assurer la division de la cellule. Ainsi, ce mécanisme de régulation permet aux cellules de détecter des défauts de la biogenèse des ribosomes et d'arrêter la progression du cycle pour prévenir des défauts plus sévères qui pourraient aboutir à la mort cellulaire. Cet arrêt du cycle est la conséquence de l'induction d'un mécanisme appelé stress ribosomique, qui sera décrit ultérieurement dans la partie 3).

3. Les fonctions extra-ribosomiques des protéines ribosomiques (indépendamment de p53)

a. Stabilité et disponibilité des protéines ribosomiques libres

Au sein du ribosome, les protéines ribosomiques exercent un rôle fondamental dans la stabilisation et la conformation des ARNr matures, et assurent l'assemblage correct des sous-unités ribosomiques. Outre ce rôle primaire dans la structure des ribosomes, les RPs peuvent présenter des fonctions additionnelles dans la cellule, qui sont appelées fonctions extra-ribosomiques (Warner and McIntosh, 2009; Zhou et al., 2015). Ainsi, certaines RP sont fonctionnelles lorsqu'elles ne sont pas intégrées aux ribosomes. Cela suppose que les RP doivent avoir une stabilité suffisante lorsqu'elles sont libres, pour pouvoir exercer leur fonction extra-ribosomique. Or, plusieurs études ont démontré que les RPs libres sont des protéines très instables qui sont rapidement importées dans le nucléoplasme pour être dégradées par le protéasome 20S. En effet, l'inhibition du protéasome entraîne une accumulation des RPs dans le nucléole et le nucléoplasme. Par ailleurs, l'inhibition de la transcription des ARNr par l'actinomycine D conduit à la dégradation rapide des RPs dans le nucléoplasme, par l'impossibilité de former des ribosomes (Lam et al., 2007). La dégradation des RPs requiert l'ubiquitination préalable de résidus lysine spécifiques (Sung et al., 2016a). Les RPs qui sont importées dans le nucléole, incorporées dans les particules ribosomiques puis exportées vers le cytoplasme au sein des ribosomes sont stables. Au sein des ribosomes, les résidus lysine ciblés par le protéasome ne sont pas exposés au solvant, expliquant la différence de stabilité des RPs associées ou non aux ribosomes (Sung et al., 2016b). Cependant, certaines RPs libres sont capables de s'accumuler dans la cellule. Cela suppose que ces dernières peuvent interagir avec des partenaires ADN/ARN ou protéiques, et former des complexes fonctionnels camouflant les résidus lysines ciblés par le protéasome, comme plusieurs cas ont été rapportés. À titre d'exemple, les protéines RPS3 et RPS6 peuvent interagir avec Hsp90, ce qui prévient leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome (Kim et al., 2005).

b. Fonctions extra-ribosomiques des RPs dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes

Parmi les fonctions extra-ribosomiques décrites, certaines RPs ont été rapportées pour jouer un rôle dans la régulation de la biogenèse des ribosomes. En particulier, les RPs libres peuvent exercer un rétro-contrôle négatif de leur propre expression, afin de contrôler leur abondance et assurer l'équilibre stoechiométrique entre toutes les RPs. Cette régulation peut s'exercer soit par un contrôle global de la synthèse de toutes RPs, soit par un contrôle spécifique de l'expression d'une ou plusieurs RPs.

– La régulation de c-Myc par les RPs

D'une part, plusieurs études ont révélé l'interaction de certaines RPs avec c-Myc. Par exemple, il a été montré que RPL11 et RPL5 lient la région 3'UTR de l'ARNm de *c-Myc*, induisant le recrutement du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ce complexe promeut la dégradation de l'ARNm de *c-Myc*, inhibant son expression (Liao et al., 2014). RPL11 est également capable d'interagir avec c-Myc au niveau protéique. La formation du complexe c-Myc-RPL11 empêche l'interaction de c-Myc avec son co-activateur TRRAP, indispensable pour induire l'acétylation des histones au niveau des promoteurs des gènes cibles de *c-Myc*. En conséquence, RPL11 inhibe la transcription des gènes cibles de *c-Myc*, incluant *RPL11* (Dai et al., 2007). C-MYC étant un activateur majeur de la transcription des gènes des protéines ribosomiques, ces mécanismes permettent de réguler la néosynthèse de protéines ribosomiques de manière globale, afin d'éviter une biogenèse des ribosomes aberrante.

– Le rétrocontrôle de l'expression des RPs

D'autre part, certaines protéines ribosomiques sont capables de réprimer l'expression de leur propre transcrit. En effet, les RPs possèdent différents motifs dans leur structure secondaire, tel que les doigts de zinc, qui leur permettent de se fixer sur les acides nucléiques, ARN et ADN. Ceci a été démontré pour les protéines RPL30 et RPL14, chez la levure, qui inhibent l'épissage de leur propre transcrit par interaction directe sur les introns de leur pré-ARNm (Eng and Warner, 1991; Fewell and Woolford, 1999). Chez *C. elegans*, le même

mécanisme a été mis en évidence pour la protéine RPL12 (Mitrovich and Anderson, 2000), et chez l'Homme pour les protéines RPS13 (Malygin et al., 2007) et RPL7 (Neumann et al., 1995). RPS28 semble utiliser un autre mécanisme conduisant à la dégradation de son propre ARNm (Badis et al., 2004).

Cette autorégulation de l'expression des RPs permet d'adapter leur synthèse au niveau transcriptionnel afin de prévenir un déséquilibre d'expression parmi les différentes RPs. En effet, dans les cellules humaines, la réduction du niveau d'expression d'une RP au sein d'une sous-unité entraîne l'inhibition correspondante de l'expression de toutes les autres RPs de cette même sous-unité. De plus, l'épuisement des RPs dans les cellules humaines entraîne une altération de la synthèse des ARNr matures 18S et 28S (Robledo et al., 2008). Ce contrôle équilibré du niveau d'expression des protéines ribosomiques doit certainement faire partie d'un système global incluant le contrôle de la stabilité des ARNm des RPs, de la dégradation des RPs libres, de la transcription des ARNr et de la traduction des RPs, afin d'éviter l'accumulation désordonnée d'un composant ribosomique par rapport aux autres, qui serait responsable d'un stress ribosomique délétère pour les cellules.

c. Fonctions extra-ribosomiques des RPs dans la régulation de la transcription et de la traduction

Outre leur implication dans la biogenèse des ribosomes, certaines RPs peuvent jouer un rôle global dans la transcription et la traduction de gènes (pour revue, (Lindström, 2009). En 2007, un rôle extra-ribosomique pour la protéine RPS3 a été découvert, en tant que sous-unité du complexe hétéro-dimère NFκB p65-p50 de liaison à l'ADN (Wan et al., 2007). Cette étude a identifié des domaines KH (*K homology*) au sein de la protéine RPS3 qui renforce, par synergie, la liaison à l'ADN du complexe nucléaire NFκB. La perte d'expression de RPS3 affecte négativement la capacité de NFκB à contrôler la transcription de ses gènes cibles (Wan et al., 2007). Un autre exemple concerne la protéine RPL22. Chez *D. melanogaster*, RPL22 s'associe à l'histone H1 et ces deux protéines sont co-localisées au niveau de régions de chromatine condensée. La surexpression de RPL22 ou de l'histone H1 entraîne une répression de la transcription génique, alors que la déplétion de l'expression de RPL22 conduit à une activation transcriptionnelle spécifique d'un groupe de gènes (Ni et al., 2006). Une étude réalisée également en 2007 révèle un mécanisme par lequel la protéine RPL13a se

fixe à eIF4G, provoquant une répression traductionnelle par inhibition de l'étape d'initiation de la traduction (Kapasi et al., 2007).

Les mécanismes décrits ici ne sont évidemment pas exhaustifs. De nombreuses études ont étendu l'éventail des RPs possédant des fonctions extra-ribosomiques ainsi que la nature de ces fonctions. En effet, en dehors de leur implication dans la biogenèse des ribosomes, la traduction et la transcription, de nombreuses RPs possèdent des fonctions diverses liées à des processus cellulaires fondamentaux tel que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et particulièrement le cycle cellulaire. Les mécanismes impliquant le cycle cellulaire seront décrits dans la partie III) de l'introduction de la thèse.

II. Physiologie de l'érythropoïèse humaine

L'érythropoïèse est une branche spécialisée de l'hématopoïèse, processus par lequel l'organisme produit tous les éléments figurés du sang. Chez l'adulte, l'érythropoïèse représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec une production d'environ 200 milliards de globules rouges (GR) par jour. Appelés également hématies ou érythrocytes, les GR sont produits à partir d'une cellule souche hématopoïétique indifférenciée de la moelle osseuse. D'une durée de vie de 120 jours, le rôle principal des hématies est d'assurer le transport de l'oxygène, capté dans les poumons, vers les différents tissus.

A. Vue d'ensemble de l'hématopoïèse humaine adulte

1. Hiérarchie du système hématopoïétique et notion de CSH

L'hématopoïèse est un processus continu et hiérarchisé qui permet de générer tous les éléments figurés du sang ; c'est-à-dire les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes, à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) multipotente. Chez l'adulte, les CSHs sont situées majoritairement dans la moelle osseuse rouge, tissu spongieux de certains os courts et plats tels que le sternum et l'os iliaque (bassin).

Les CSHs sont des cellules indifférenciées qui ont des caractéristiques particulières. En majorité quiescentes, elles sont capables de s'autorenouveler, permettant le maintien d'une hématopoïèse fonctionnelle constante ; et capables de se différencier pour assurer le renouvellement des cellules qui meurent physiologiquement. En cas d'accroissement des besoins, l'hématopoïèse peut s'adapter et assurer un renouvellement plus rapide des cellules sanguines.

Dans le modèle classique (**figure 12**, flèches pleines), l'hématopoïèse est initiée par les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui donnent naissance à des progéniteurs multipotents (MPP). Ces derniers vont s'orienter soit vers la myélopoïèse en produisant des progéniteurs communs myéloïdes (CMP), soit vers la lymphopoïèse en produisant les

progéniteurs communs lymphoïdes (CLP). Dans la lignée myéloïde, deux progéniteurs bipotents émergent des CMP : les progéniteurs granulo-monocytaires (GMP), à l'origine de la production des granulocytes et monocytes, et les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) à l'origine de la production des érythrocytes et des plaquettes.

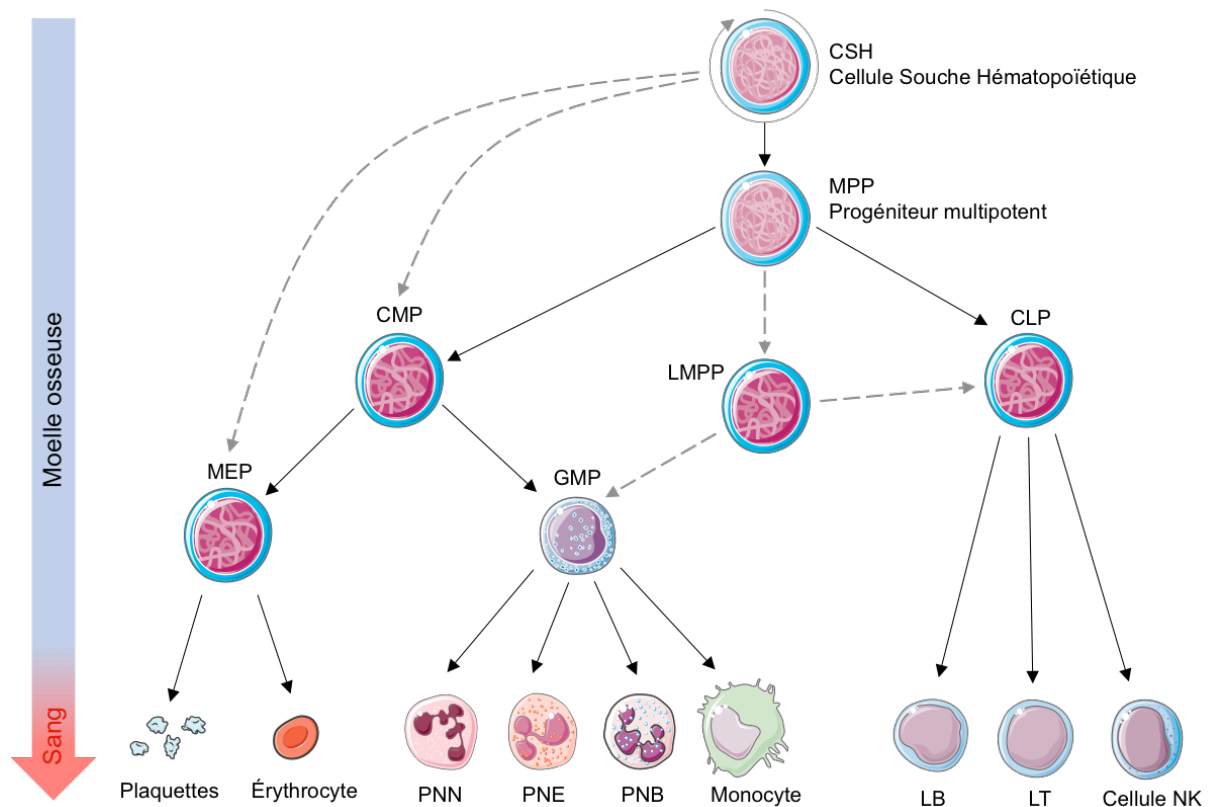


Figure 12 : Modèle classique de l'hématopoïèse humaine adulte.

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes sont capables d'auto-renouvellement et de se différencier en progéniteurs multipotents (MPP). Ces derniers donnent naissance à deux types de progéniteurs : soit un progéniteur commun lymphoïde (CLP), soit un progéniteur commun myéloïde (CMP). Deux progéniteurs bipotents émergent des CMP : les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) et les progéniteurs granulo-monocytaires (GMP). De récentes études ont mis en évidence des voies alternatives à l'hématopoïèse classique (flèches pointillées). En effet, les CSH sont capables de se différencier en un progéniteur multipotent lymphoïde (LMPP), ou directement en CMP ou en MEP. PNN : Polynucléaire neutrophile, PNE : Polynucléaire éosinophile, PNB : Polynucléaire basophile, LT : Lymphocyte T, LB : Lymphocyte B, NK : Natural Killer

Depuis quelques années, plusieurs équipes proposent des révisions de l'organisation hiérarchique classique de l'hématopoïèse en suggérant des voies concomitantes ou alternatives (**figure 12**, flèches pointillées). En effet, il a été montré chez la souris que les

MEP pouvaient directement dériver des CSH (Yamamoto et al., 2013). En 2016, l'équipe de John Dick supporte l'hypothèse de Yamato et al. chez l'homme en couplant des techniques de phénotypage par cytométrie en flux et de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) à l'échelle unicellulaire (Notta et al., 2016). Chez l'adulte, la spécificité du lignage érythro-mégacaryocytaire serait limitée au compartiment des CSH, et le compartiment des progéniteurs serait composé de progéniteurs à descendance unilatérale, formant un système à deux niveaux, avec peu d'intermédiaires progéniteurs oligopotents (**figure 13**). Cependant, ce modèle est à l'heure actuelle encore débattu.

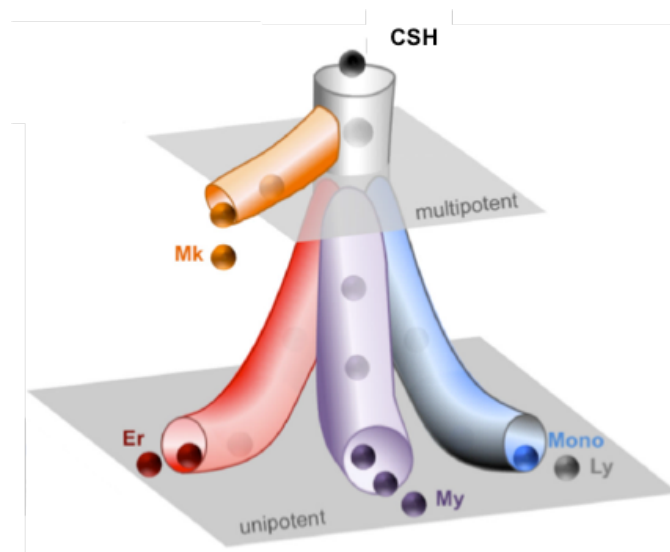


Figure 13 : Modèle révisé de l'hématopoïèse humaine adulte (d'après Notta et al., 2016).

Ce nouveau modèle de l'hématopoïèse révisée par Notta et al. décrit seulement deux niveaux de compartiments cellulaires. Les MEP multipotentes dérivent majoritairement des CSH tandis que les progéniteurs unipotents forment un compartiment à descendance unilatérale. Cette connexion rapprochée entre les CSH et le lignage érythro-mégacaryocytaire peut expliquer l'impact plus important des MEP par rapport aux GMP lors d'une anémie aplasique. Mk : mégacaryocytes, Er : érythrocytes, My : granulocytes, Ly : lymphocytes, Mono : monocytes.

2. Régulation du système hématopoïétique

Le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique et son adaptation à toutes les contraintes et stress survenant au long de la vie nécessite une régulation fine, particulièrement au niveau des CSH. Cette régulation repose sur de multiples facteurs intrinsèques et extrinsèques. Des interactions entre les cellules hématopoïétiques et leur microenvironnement spécifique, appelé niche hématopoïétique, permettent une signalisation

bidirectionnelle de ces mécanismes. La niche hématopoïétique est une structure anatomique et fonctionnelle de la moelle osseuse constituée de différents types cellulaires (tels que des cellules endothéliales, ostéoblastes, cellules stromales) et d'une matrice extracellulaire complexe. Chacun de ces composants participe activement à la régulation des CSHs par des interactions directes cellule-cellule, et des interactions indirectes via la sécrétion et de facteurs solubles (cytokines, facteurs de croissance) dans le microenvironnement médullaire. La combinaison de ces mécanismes est déterminante dans l'orientation de la différenciation des CSH en un lignage particulier.

3. Ontogenie de l'hématopoïèse

Chez l'homme, le siège de l'hématopoïèse se déplace au cours du développement et se déroule en trois étapes successives appelées hématopoïèse primitive, définitive et adulte (voir **figure 14**). L'hématopoïèse primitive débute à partir du 19^{ème} jour de la vie embryonnaire et est caractérisée par la formation d'îlots sanguins dans le sac vitellin (Baron et al., 2012). Ces îlots contiennent en majorité des progéniteurs érythroïdes et des macrophages, indispensables pour le développement et la survie de l'embryon vers le stade fœtus (Tavian and Péault, 2005). Les érythrocytes primitifs circulants ainsi produits ont la particularité d'être nucléés, contrairement aux érythrocytes adultes. A ce stade, les CSHs ne sont pas encore caractérisées. Ensuite, l'hématopoïèse définitive apparaît de nouveau à partir du sac vitellin, avec l'émergence des progéniteurs multipotents érythro-myéloïdes (PEM), qui sont capables de migrer vers le foie fœtal (Palis et al., 2001). Dans un second temps, les premières CSHs émergent vers la 5^{ème} semaine de gestation au niveau de l'aorte dorsale de la région aortogonado-mésonephros (AGM), résultant d'une transdifférenciation de cellules endothéliales (Ivanovs et al., 2011). Vers la fin du premier trimestre de grossesse, ces CSHs, capables d'auto-renouvellement, vont migrer vers le foie foetal puis la rate, pour être amplifiées et donner naissance à tous les types de cellules sanguines. Enfin, à partir du 4^{ème} mois de grossesse, la moelle osseuse commence à être colonisée et prendra progressivement la relève des autres sites. Elle sera le site exclusif de l'hématopoïèse adulte durant la vie post-natale.

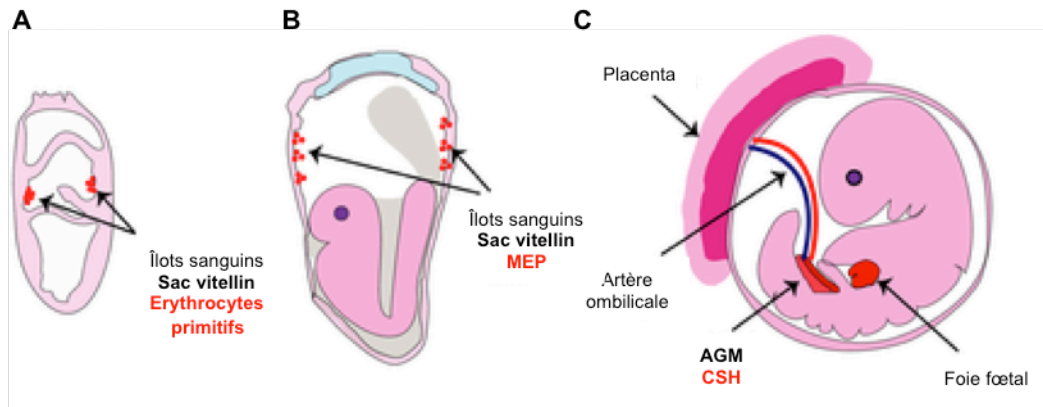


Figure 14 : Les différences vagues de l'érythropoïèse humaine au cours du développement embryonnaire et fœtal (d'après Nandakumar et al., 2016).

(A) La première vague de l'érythropoïèse est marquée par l'émergence d'érythroblastes primitifs au sein des îlots sanguins du sac vitellin. (B) Lors de la deuxième vague, les progéniteurs multipotents érythro-myéloïdes (MEP) émergent du sac vitellin et migrent vers le foie du fœtus, produisant des érythroblastes définitifs. (C) Enfin, à partir du 4ème mois de grossesse, la cellule souche hématopoïétique (CSH) émerge au niveau de la région aorto-gonado-mésonephros (AGM). Les CSH migrent vers le foie fœtal et finalement vers la moelle osseuse adulte, produisant des érythroblastes définitifs. MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire, CSH : cellule souche hématopoïétique, AGM : aorte-gonades-mésonephros.

Pour la suite de la thèse, les données présentées se focaliseront sur une branche spécifique de l'hématopoïèse humaine : l'érythropoïèse.

B. La différenciation érythroïde humaine

L'érythropoïèse adulte est divisée en deux phases : une phase de prolifération des progéniteurs érythroïdes, appelée « érythropoïèse précoce » et une phase de différenciation des précurseurs érythroïdes, appelée « érythropoïèse tardive ». A la fin de cette dernière phase, une étape d'énucléation aboutit à la formation du réticulocyte, qui termine alors sa maturation en érythrocyte dans la circulation sanguine.

L'érythropoïèse est un processus continu et essentiel puisqu'il assure une production d'érythrocytes suffisant pour maintenir une oxygénation optimale et constante des tissus. Ce système est donc très finement contrôlé afin de maintenir un équilibre entre prolifération et différenciation pour éviter un défaut de production (anémie) ou un excès de production (polyglobulie) des globules rouges.

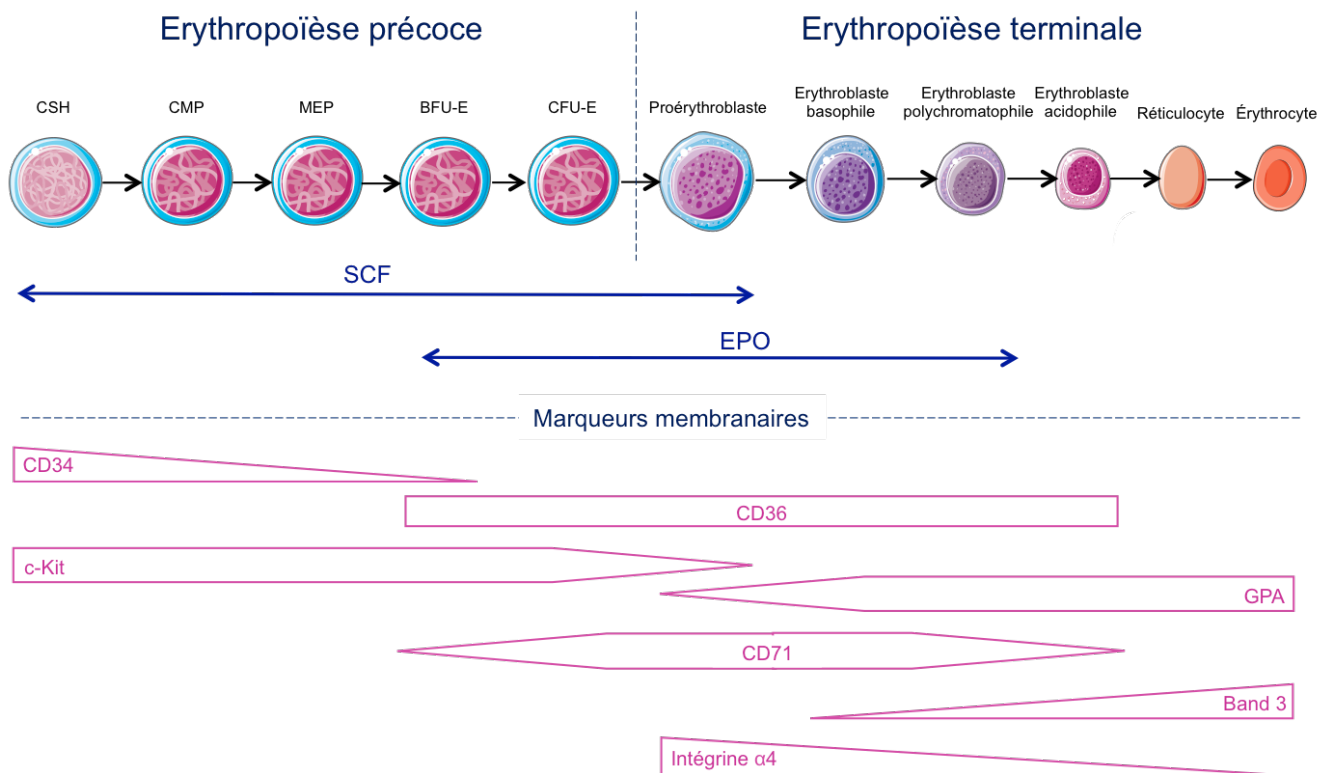


Figure 15 : Erythropoïèse humaine adulte.

L'érythropoïèse humaine adulte est un processus continu qui se déroule en deux phases : une phase précoce d'amplification des progéniteurs érythroïdes et une phase tardive de différenciation des précurseurs érythroïdes. L'érythropoïèse est régulée par deux principaux facteurs de croissance : le SCF et l'EPO. L'analyse par immunophénotypage permet de distinguer les différents stades des progéniteurs et précurseurs érythroïdes grâce à l'expression des marqueurs membranaires qui évolue au cours de l'érythropoïèse. CSH : cellule souche hématopoïétique, CMP : progéniteur commun myéloïde, MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire, BFU-E : Burst-Forming Unit-Erythroid, CFU-E : Colony Forming Unit-Erythroid.

1. L'érythropoïèse précoce

L'érythropoïèse précoce est la phase qui commence par l'engagement d'une CSH vers le lignage myéloïde, en générant successivement un progéniteur pluripotent (MPP), un progéniteur myéloïde commun (CMP) et un progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP). Ensuite, le MEP s'engage définitivement dans l'érythropoïèse en produisant le premier progéniteur spécifique de la lignée érythroïde, appelé « *Burst Forming Unit-Erythroid* » (BFU-E), qui se différenciera en *Colony Forming Unit-Erythroid* (CFU-E) (voir **figure 15**).

La prolifération et la différenciation des BFU-E sont sous l'influence du facteur de croissance *Stem Cell Factor* (SCF). Contrairement aux BFU-E qui expriment faiblement le

récepteur à l'érythropoïétine (EPO-R) à leur surface, les CFU-E sont hautement dépendantes de l'érythropoïétine (EPO) pour leur survie et leur différenciation (Iscove et al., 1974).

Les BFU-E et les CFU-E sont initialement définies par à leur potentiel à former des colonies érythroïdes en milieu semi-solide (méthylcellulose). Cette observation a d'abord permis de les identifier chez la souris (Gregory, 1976; Heath et al., 1976) puis chez l'humain (Gregory and Eaves, 1977). Chez l'Homme, en milieu méthylcellulose, les CFU-E produisent des petites colonies rondes et rouges composées d'érythroblastes (<100 cellules), après 7 jours de culture. Après 15 jours de culture en méthylcellulose, les BFU-E produisent quant à elles des colonies de grande taille.

En culture liquide ou sur frottis, les progéniteurs érythroïdes ne sont pas identifiables morphologiquement. De récentes études d'immunophénotypage cellulaire par cytométrie en flux permettent aujourd'hui de mieux distinguer ces progéniteurs, notamment grâce à l'analyse de différents marqueurs de surface. Ainsi, chez l'Homme, une BFU-E est caractérisée comme étant CD45⁺, CD235a⁻, IL3R⁻, CD34⁺, CD36⁻, CD71^{faible}, tandis que les CFU-E sont phénotypées CD45⁺, CD235a⁻, IL3R⁻, CD34⁻, CD36⁺, CD71^{fort} (Li et al., 2014). Cette analyse prend en compte des clusters de différenciation (CD) non spécifiques de la lignée érythroïde tels que CD45 pan leucocytaire et le CD34 exprimé à la surface des CSH et des progéniteurs érythroïdes. Dans cette étude figure également un marqueur spécifique de la maturation érythroïde, le CD235a correspondant à la glycophorine A (GPA).

2. L'érythropoïèse terminale : du proérythroblaste à l'érythroblaste acidophile

Le CFU-E s'engage dans la différenciation érythroïde terminale et donne naissance au premier précurseur érythroïde identifiable morphologiquement : le proérythroblaste (proE). Celui-ci va se différencier grâce à quatre divisions cellulaires successives qui s'accompagnent d'une réduction de taille et de changements morphologiques caractéristiques donnant : l'érythroblaste basophile précoce (baso-E I), l'érythroblaste basophile tardif (baso-E II), l'érythroblaste polychromatophile (polyE) et enfin l'érythroblaste acidophile (acido-E), dernier précurseur nucléé de la lignée érythroïde humaine. En effet, la maturation terminale érythroïde nécessite une étape d'expulsion du noyau (énucléation) de l'acido-E, générant ainsi

le réticulocyte qui sera libéré dans la circulation sanguine pour finir sa maturation en érythrocyte. L'ensemble des étapes de maturation des érythroblastes est assuré par des unités fonctionnelles appelées îlots érythroblastiques (voir **figure 16**). Le principal facteur permettant la survie et la prolifération des précurseurs érythroïdes est l'érythropoïétine (EPO).

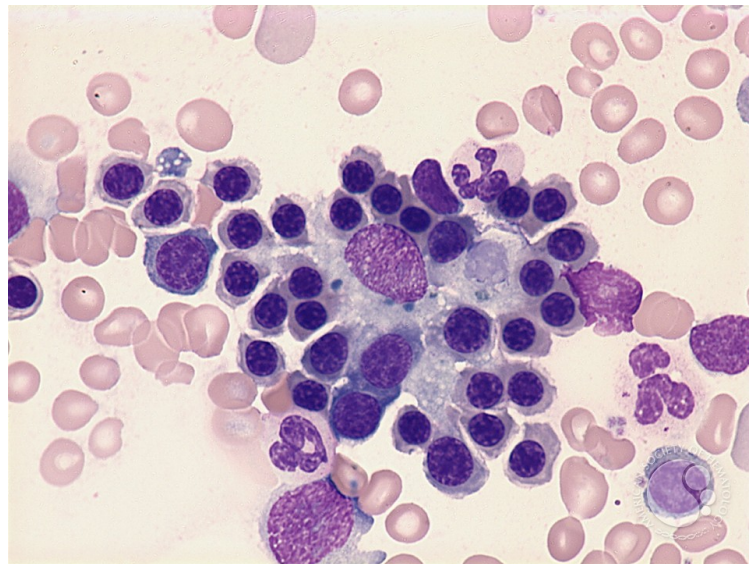


Figure 16 : Un îlot érythroblastique

Dans la moelle osseuse, l'îlot érythroblastique est constitué d'un macrophage central entouré d'érythroblastes à tous les stades de différenciation terminale. Le macrophage soutient et participe à la maturation terminale des érythroblastes (Photo de Peter Maslak, 2008).

a. Caractérisation morphologique et biochimique des érythroblastes

Au cours de l'érythropoïèse terminale, des modifications morphologiques et biochimiques permettent de décrire les stades de maturation érythroblastique. Les principaux changements observés sont la diminution progressive de la taille des érythroblastes (de 25 μm pour le proE à environ 8 μm pour le réticulocyte) et de leurs noyaux, la condensation de la chromatine, la disparition des nucléoles, et la perte de la basophilie du cytoplasme due à l'augmentation de la synthèse d'hémoglobine. Ainsi, contrairement aux progéniteurs érythroïdes, les précurseurs érythroïdes sont facilement identifiables à partir de frottis ou cytopspin, et colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG), un mélange de colorants acide (éosine) et basiques (bleu de méthylène et azur de méthylène). Au microscope optique, les pro-E se présentent comme des grosses cellules arrondies, avec un haut rapport nucléo-

cytoplasmique. Le cytoplasme des pro-E et des baso-E est basique, donc apparaît bleuté. A partir du poly-E, le début de la production d'hémoglobine entraîne une acidification progressive du cytoplasme donnant une teinte de plus en plus rosée, avec un noyau condensé. Enfin, les acido-E sont des petites cellules avec un cytoplasme rose renfermant une chromatine très condensée.

b. Caractérisation des érythroblastes par les marqueurs de surface

Outre ces changements morphologiques, les érythroblastes subissent une réorganisation de leur membrane durant leur maturation. La caractérisation de certains marqueurs de surface permet de distinguer les stades de maturation érythroïde de manière optimale, en cytométrie en flux. Le CD36, récepteur d'une large gamme de ligands dont les acides gras et le collagène, est exprimé dès le stade CFU-E puis disparaît à partir du stade acido-E. Le CD117 (ou c-KIT) est le récepteur au SCF. L'expression de c-KIT est maximale chez les progéniteurs érythroïdes qui sont dépendants du SCF pour leur survie et leur différenciation, puis s'éteint à partir du stade baso-E. A l'inverse, les pro-E acquièrent progressivement la glycophorine A (GPA) codée par le gène *GYP A*, constituant le marqueur spécifique de l'entrée en différenciation érythroïde terminale (Loken et al., 1987). Le récepteur à la transferrine CD71, permettant l'entrée du fer nécessaire à la synthèse de l'hème dans la cellule, voit son expression diminuer à partir du stade poly-E, pour disparaître de la membrane des réticulocytes. De récentes améliorations dans la distinction immunophénotypiques des précurseurs érythroblastiques ont été apportées par l'équipe de Mohandas Narla (Hu et al, 2013) (voir **figure 17**). Dans ces travaux, il a été montré une acquisition progressive de l'expression du transporteur membranaire échangeur d'anions Band 3 à partir du stade baso-E, tandis que celle de l'intégrine- $\alpha 4$ (CD49d) diminue progressivement jusqu'à la fin de la différenciation (voir **figure 16**). Ainsi, l'analyse de l'expression des marqueurs membranaires a permis d'établir des nouvelles stratégies pour l'isolement des sous-populations érythroblastiques. Par cytométrie en flux, on peut suivre avec précision la différenciation érythroïde et trier des populations pures de stades spécifiques de différenciation.

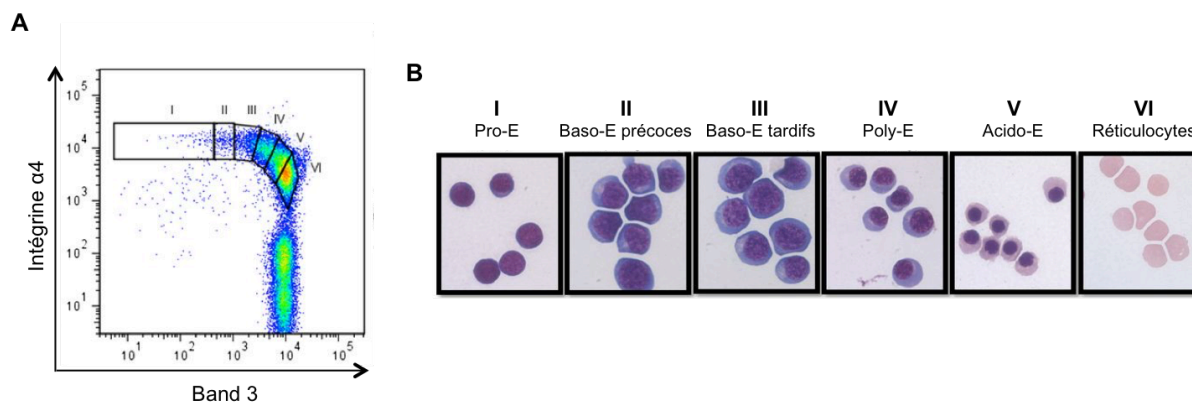


Figure 17 : Isolement et caractérisation des stades cellulaires de l'érythropoïèse terminale (d'après Hu et al., 2013).

(A) Des cellules CD45⁻ ont été isolées à partir de la moelle osseuse humaine. L'analyse par cytométrie en flux du double marquage membranaire intégrine $\alpha 4$ et band 3 sur une population de cellules GPA⁺ permet de discriminer 6 populations d'érythroblastes. (B) Images représentatives des 6 populations d'érythroblastes isolées par cytométrie en flux en (A) après coloration MGG.

c. Évolution de l'expression génique au cours de l'érythropoïèse terminale

– *Au niveau transcriptomique*

L'amélioration des techniques d'isolement des populations érythroblastiques par cytométrie en flux a rendu possible l'analyse spécifique des érythroblastes à chaque stade de différenciation. Ainsi en 2014, l'équipe de Mohandas Narla a réalisé des analyses transcriptomiques par séquençage de l'ARN à partir de diverses populations érythroblastiques purifiées à partir de sang de cordon ombilical (An et al., 2014). Ces analyses mettent en évidence des modifications drastiques du profil d'expression génique à chaque stade de différenciation (An et al., 2014). Les gènes différentiellement exprimés ont été analysés et classés en 6 groupes selon leur profil d'expression au cours de l'érythropoïèse. Deux groupes contiennent des gènes principalement impliqués dans le processus d'apoptose et de catabolisme cellulaire. Leur expression augmente progressivement au cours de l'érythropoïèse terminale. A l'inverse, deux groupes rassemblent des gènes dont l'expression est la plus élevée au stade pro-E puis décroît progressivement au cours de l'érythropoïèse terminale. Ces gènes sont impliqués dans la traduction protéine, la biogenèse des ribosomes mais également des gènes impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN, ainsi que dans le cycle cellulaire. Enfin, les deux derniers groupes renferment, par exemple, des gènes impliqués dans le contrôle de la mitose, et ont un pic d'expression au stade poly-E. Ces données

suggèrent que, malgré le caractère continu du processus biologique de l'érythropoïèse, chaque division à partir du pro-E aboutit à la formation d'un nouveau stade de différenciation fonctionnellement et morphologiquement distinct de la cellule mère.

– *Au niveau protéique*

En 2016, l'équipe de Patrick Mayeux a effectué l'analyse du protéome des cellules érythroïdes à chaque stade de différenciation. Cette étude a été réalisée à partir de progéniteurs hématopoïétiques humains CD34+ issus de sang de cordon ombilical, cultivés *in vitro*, puis analysés par spectrométrie de masse. La quantification protéique absolue est exprimée en nombre de cellules et a été obtenue grâce à une méthode de normalisation par le signal MS des peptides correspondant aux histones (Gautier et al., 2016). En tout, 6 130 protéines ont été quantifiées entre le stade BFU-E et le stade acido-E. Les données produites indiquent que le contenu protéique total des érythroblastes décroît au cours de la différenciation. En particulier, l'expression de la plupart des protéines diminue individuellement au cours de l'érythropoïèse, ce qui coïncide avec la diminution progressive de la taille des cellules observée lors de ce processus. Notamment, les protéines impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux tels que la maturation des ARNm, la traduction protéique, le métabolisme, la réplication et la réparation de l'ADN diminuent en nombre de copies par cellules au cours de l'érythropoïèse. L'expression protéique des régulateurs majeurs de l'érythropoïèse GATA1, KLF1 et TAL1 décroît également au cours de la différenciation érythroïde. À l'inverse, quelques protéines ont une expression significativement augmentée dans les stades matures par rapport aux stades immatures. Il s'agit notamment de protéines impliquées dans la différenciation érythroïde terminale tel que l'hémoglobine et la Band 3, qui sont des constituants majeurs des globules rouges.

d. *La modulation du cycle cellulaire*

Au cours de la différenciation érythroïde, les progéniteurs donnent des précurseurs et des cellules matures dont le potentiel prolifératif décline jusqu'à un arrêt en phase G0/G1. Les régulateurs positifs du cycle cellulaire sont alors réprimés, et les régulateurs positifs de la sortie de cycle ont une expression augmentée. Une coordination entre progression dans le cycle et sortie du cycle est donc nécessaire à la différenciation.

Les travaux de l'équipe de Merav Socolovsky ont confirmé, chez la souris, un contrôle de la différenciation érythroïde par le cycle cellulaire. En effet, l'entrée des érythroblastes dans la différenciation érythroïde terminale est liée à une synchronisation des cellules en phase S (Pop et al., 2010). Cette synchronisation est accompagnée par un enrichissement des gènes impliqués dans la transition G1/S tels que la cycline D2 et CDK6, et des gènes impliqués dans la progression de la phase S tel que la cycline E1 et la cycline A2. L'inhibition de la réplication de l'ADN indique que l'entrée en différenciation terminale est non seulement synchronisée avec la phase S mais dépend de celle-ci (Tusi et al., 2018). De plus, la synchronisation des cellules en phase S corrèle avec l'acquisition de la dépendance des cellules à l'EPO-R, et l'augmentation d'expression du récepteur de la transferrine TFRc (CD71) (Pop et al., 2010). Enfin, durant la différenciation érythroïde terminale, le nombre de cellules en phase S diminue progressivement en faveur d'une augmentation du nombre de cellules en phase G0/G1, ce qui est en accord avec le ralentissement de la prolifération cellulaire. Finalement, l'ensemble de ces travaux réalisés uniquement chez la souris, souligne un remodelage important du cycle cellulaire durant tout le processus de l'érythropoïèse.

3. La maturation du réticulocyte

Chez les mammifères, la fin de la différenciation érythroïde est marquée par l'expulsion du noyau de l'acido-E. Ce processus, appelé énucléation, aboutit à la formation du réticulocyte et du pyrénocyte. Le pyrénocyte correspond au noyau de l'acido-E entouré d'une membrane plasmique et d'une petite quantité de cytoplasme. Ce dernier est rapidement phagocyté par les macrophages médullaires de l'îlot érythroblastique, qui reconnaissent la phosphatidylsérine exposée à la surface des pyrénocytes, signalant l'apoptose cellulaire (Yoshida et al., 2005). Le réticulocyte, quant à lui, est riche en ARNm et contient encore des organelles comme les mitochondries, les ribosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Deux à trois jours sont nécessaires au réticulocyte immature pour migrer de la moelle osseuse vers la circulation sanguine et se transformer en érythrocyte mature. Cette maturation terminale est accompagnée de la dégradation des ARNm, l'expulsion de vésicules, l'élimination par autophagie des organelles tels que les ribosomes et les mitochondries, ainsi qu'un remodelage majeur de la membrane plasmique.

Les globules rouges représentent 80% des cellules totales du corps humain, ce qui en fait le type cellulaire le plus abondant (Sender et al., 2016). Ils sont de petite taille avec un diamètre de 6-8 μm . La protéine majeure des GR est l'hémoglobine, qui représente plus de 90 % des protéines totales et le tiers de la masse totale du GR. L'hémoglobine est une molécule qui capte l'oxygène au niveau des poumons et le transporte vers tous les tissus de l'organisme. La forme de disque biconcave des globules rouges crée une large surface pour l'échange des gaz et apporte une capacité de déformabilité essentielle pour s'adapter aux contraintes de la microcirculation sanguine. Toute anomalie compromettant cette propriété des GR à se déformer et donc passer dans les capillaires les plus fins, induit leur élimination prématurée par la rate.

C. La régulation de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus dynamique qui requiert une régulation fine pour contrôler la production quotidienne des 2.10^{11} globules rouges nécessaires au maintien des différentes fonctions organiques. Cette régulation requiert l'action orchestrée de mécanismes moléculaires spécifiques pour contrôler de manière stricte la prolifération cellulaire, prévenir l'apoptose des érythroblastes et coordonner l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la maturation terminale. Cette partie décrira les principaux mécanismes moléculaires contrôlant l'érythropoïèse, et abordera les facteurs de croissance, les facteurs de transcription, et les caspases.

1. Régulation par les cytokines et facteurs de croissance

Deux facteurs de croissance sont indispensables à la survie et la prolifération des érythroblastes, le *Stem Cell Factor* (SCF) et l'érythropoïétine (EPO). Le SCF contrôle la phase précoce de l'érythropoïèse, des CSH jusqu'aux pro-E, tandis que l'EPO régule davantage la maturation érythroïde terminale, des CFU-E aux poly-E.

a. Le SCF et son récepteur c-KIT

Le *Stem Cell Factor* (SCF) est une cytokine produite par les cellules stromales de la moelle osseuse. L'interaction du SCF avec son récepteur à tyrosine kinase c-KIT induit une

signalisation en faveur de la survie et prolifération des progéniteurs érythroïdes BFU-E et CFU-E.

Il existe deux isoformes du SCF. Celles-ci résultent d'un épissage alternatif de l'ARNm au niveau de l'exon 6, exon codant notamment pour un site de clivage protéolytique (Díaz et al., 2013). En absence d'épissage alternatif, la forme générée est soluble (sSCF) car elle contient le site protéolytique qui, suite au clivage, entraîne la perte du domaine transmembranaire de la protéine. La deuxième forme est transmembranaire (mSCF), car dépourvue du site de clivage codée par l'exon 6 perdu lors de l'épissage alternatif. Les souris déficientes pour le gène codant le SCF présentent une anémie macrocytaire sévère et meurent *in utero* ou dans la période périnatale. Un modèle de souris mutantes dépourvues de la forme transmembranaire du SCF mais exprimant la forme soluble présentent une anémie sévère (Kapur et al., 1999) suggérant un rôle prédominant de la forme transmembranaire dans le contrôle de l'érythropoïèse. L'explication peut reposer sur la cinétique d'activation de c-KIT. En effet, les deux isoformes sont capables d'activer le récepteur c-KIT. Cependant, il semble que la forme mSCF induise une activation plus longue et plus intense de c-KIT, comparé à la forme sSCF (Kapur et al., 1998; Miyazawa et al., 1995).

Le récepteur c-KIT fait partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase de type III (voir **figure 18**). Au cours de l'érythropoïèse, c-KIT est fortement exprimé à la surface des CSH, est maintenue dans les progéniteurs BFU-E et CFU-E, puis décline progressivement pour disparaître à partir des précurseurs baso-E. Outre la lignée érythroïde, c-KIT est également exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes, des mastocytes, des polynucléaires éosinophiles et les cellules Natural Killer (NK).

La fixation du SCF à c-KIT entraîne la dimérisation du récepteur. C-KIT subit un changement conformationnel, conduisant à l'autophosphorylation de ses résidus tyrosine présents dans le domaine intracellulaire, ce qui entraîne l'activation du récepteur. Les tyrosines phosphorylées sont ensuite reconnues par des protéines à domaine de liaison SH2 (pour *Src Homology domain 2*), permettant l'activation de voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT, la voie MAPK/ERK, et la voie mTORC1.

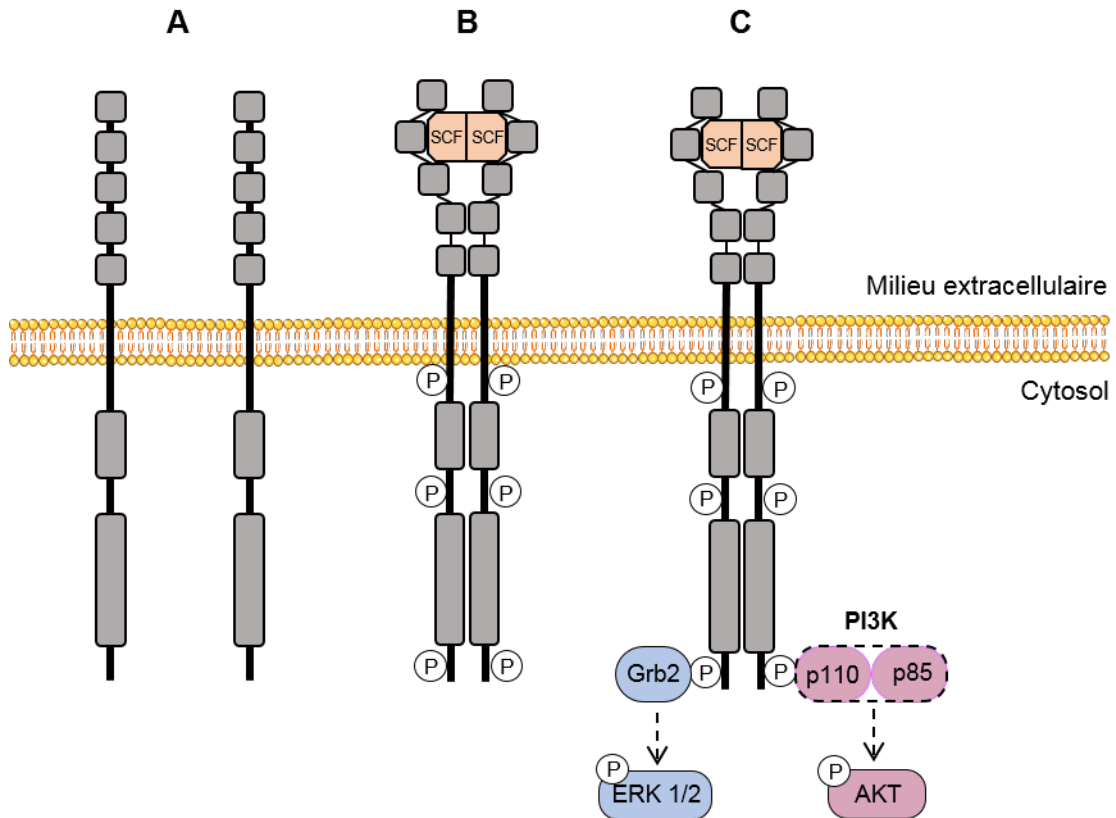


Figure 18 : Représentation schématique de l'activation du récepteur c-KIT par son ligand SCF et voies de signalisation associées.

(A) Le récepteur c-Kit est présent sous forme de monomères à la surface des cellules. (B) La liaison d'un dimère de SCF à deux monomères de c-KIT entraîne l'homodimérisation et l'autophosphorylation du récepteur au niveau de ses domaines intracellulaires. (C) Ainsi activé, le récepteur c-KIT induit, en aval, l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération de progéniteurs érythroïdes.

b. L'EPO et son récepteur EPO-R

L'érythropoïétine (EPO) est le facteur régulateur principal de l'érythropoïèse. Cette glycoprotéine est produite principalement par les cellules interstitielles du rein. Elle agit au niveau de la moelle osseuse pour promouvoir la prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes, et donc stimuler la production des globules rouges.

La production d'EPO est soumise à une régulation transcriptionnelle, en réponse à aux variations de la pression partielle tissulaire en dioxygène. En effet, le gène de l'EPO présente en sa partie 3' une région régulatrice de type HRE (*Hypoxia Response Element*) (Pugh et al., 1991). Cette région est reconnue par le facteur de transcription HIF (*Hypoxia Inducible*

Factor), composé des deux sous-unités HIF α et HIF β . En conditions de normoxie, HIF α est hydroxylée par une enzyme prolyl-hydroxylase (PHD), entraînant son ubiquitinylation par l'ubiquitine ligase E3 VHL (Von Hippel Lindau) et sa dégradation par le protéasome. En conditions hypoxiques (faible pression partielle en dioxygène), la sous-unité régulatrice HIF α normalement dégradée en normoxie, est stabilisée et transloquée dans le noyau où elle se lie à la sous-unité constitutive HIF β . Le dimère HIF α -HIF β interagit alors avec la région régulatrice HRE, activant la transcription de gènes cibles tels que celui de l'EPO.

Le récepteur de l'érythropoïétine, EPO-R, est exprimé à la surface des érythroblastes. Il est présent dès le stade BFU-E, son expression est maximale aux stades CFU-E et pro-E, puis il diminue progressivement au cours de la différenciation érythroïde terminale. Chez la souris, l'inactivation pour *Epo* ou *Epo-R* entraîne une apoptose massive des CFU-E, tandis que seuls les BFU-E prolifèrent (Wu et al., 1995a), démontrant l'importance de la signalisation EPO/EPOR pour la survie et la différenciation des CFU-E lors de l'érythropoïèse terminale.

L'EPO-R est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs de cytokines de type I. Ces récepteurs sont caractérisés par une absence d'activité enzymatique intrinsèque. La transduction d'un signal intracellulaire est cependant possible grâce à l'interaction constitutive de EPO-R avec les tyrosines kinases JAK2 (*Janus Kinases 2*) (Neubauer et al., 1998). Présent à la surface des cellules sous forme d'homodimère, la liaison de son ligand EPO induit un changement conformationnel de la partie intracellulaire, permettant le recrutement et la transphosphorylation des protéines JAK2. Ensuite, les kinases JAK2 activées phosphorylent les résidus tyrosine également présents dans le domaine intracellulaire de EPO-R. Il en résulte l'activation de voies de signalisation telles que STAT5, PI3K/AKT et MAPK/ERK (voir **figure 19**).

c. Voies de signalisation activées en aval des récepteurs c-KIT et EPO-R

– La voie PI3K-AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Protein Kinase B*) est commune aux récepteurs c-KIT et EPO-R. La kinase PI3K est constituée de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110. p85 possède un

domaine SH2 qui lui permet d'être recruté sur les récepteurs c-KIT et EPO-R activés, au niveau des tyrosines phosphorylées de leur domaine intracellulaire. De cette interaction s'ensuit l'activation de p110. Une fois actif, l'hétérodimère p85/p110 phosphoryle le composé lipidique membranaire PIP2 (Phosphatidyl-inositol-biphosphate) en PIP3 (Phosphatidyl-inositol-triphosphate). Ce dernier composé recrute alors la sérine/théonine kinase AKT *via* son domaine PH (*Pleckstrin Homology*), à proximité de la membrane plasmique où elle est phosphorylée et activée par PDK1 (*Phosphoinositide-dependant kinase 1*) sur le résidu thréonine 308 et par mTORC2 sur le résidu sérine 473. L'action de PI3K peut être reversée par PTEN (Phosphatase and tensin homologue), une phosphatase qui déphosphoryle PIP3 en PIP2, assurant ainsi un rétrocontrôle négatif de la voie PI3K/AKT (Yu and Cui, 2016).

Une fois activée, la kinase AKT régule diverses cibles impliquées dans la survie et la prolifération des progéniteurs et précurseurs érythroïdes. En effet, AKT exerce une fonction anti-apoptotique en phosphorylant des facteurs pro-apoptotiques tels que BAD et BIM, ce qui entraîne leur dégradation (Somerville et al., 2001). De plus, la phosphorylation du facteur de transcription FOXO3A par AKT empêche sa translocation dans le noyau et par conséquent empêche l'induction de l'expression de gènes pro-apoptotiques cibles tels que *FasL* et *Bim* (Brunet et al., 1999; Engström et al., 2003). D'autre part, AKT exerce aussi une fonction pro-proliférative par l'intermédiaire du substrat mTORC1 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*) qui peut être activé par deux mécanismes : soit directement par phosphorylation, soit indirectement par la phosphorylation et inactivation de TSC2 (*Tuberous Sclerosis complex 2*), régulateur négatif de l'activité catalytique de mTORC1. Le complexe mTORC1 contrôle de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des fonctions liées à la prolifération cellulaire telles que la traduction et la synthèse protéique, la biogenèse des ribosomes et la progression du cycle cellulaire.

– La voie MAPK/ERK

La voie de signalisation MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-related kinase*) est également activée en aval des récepteurs c-KIT et EPO-R (Linnekin et al., 1997; Miura et al., 1994). La protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), *via* son domaine SH2, lie les tyrosines phosphorylées des domaines intracellulaires des récepteurs activés. Grb2 activé recrute et forme un complexe avec la protéine Sos, un

facteur d'échange de guanine qui stimule la conversion de la protéine Ras ancrée à la membrane plasmique entre sa forme inactive liée au guanosine diphosphate (Ras-GDP) vers la forme active liée au guanosine triphosphate (Ras-GTP). Il s'ensuit une cascade de phosphorylation faisant intervenir une série de kinases. Ainsi, Ras activée induit la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Raf, qui a son tour phosphoryle les sérine/thréonine/tyrosine kinases MEK (MEK1 et MEK2). Enfin, les MEK phosphorylent et activent ERK 1 et ERK 2, également appelées les MAPK. Une fois activé, ERK1/2 peut subir une translocation nucléaire et activer directement certains facteurs de transcription tels que c-Fos, c-Myc et c-Jun. ERK1/2 possède également des cibles cytoplasmiques dont les p90RSK. Globalement, l'activation des protéines ERK1/2 résulte en la stimulation de la prolifération cellulaire en faveur des progéniteurs érythroïdes immatures, et l'inhibition de la différenciation érythroïde terminale (Sui et al., 1998).

– *La voie STAT*

La voie de signalisation STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*) est spécifiquement activée en aval du récepteur EPO-R. Les protéines STAT ont la double capacité de répondre à un signal extracellulaire et agir comme facteur de transcription. Présents à l'état latent dans le cytoplasme lorsqu'ils sont inactifs, on dénombre actuellement sept membres dans la famille STAT. Toutes les protéines STAT possèdent un domaine SH2, mais seulement STAT5A et STAT5B peuvent interagir avec les tyrosines phosphorylées du récepteur EPO-R activé *via* leur domaine SH2. STAT5A et STAT5B sont deux isoformes partageant 90% d'homologie et codées par des gènes distincts, qui s'associent rapidement en dimère suite à leur phosphorylation par la kinase JAK2, associée constitutivement au domaine intracytoplasmique de l'EPO-R activé. Ces dimères STAT5A-STAT5B migrent ensuite dans le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation des érythroblastes. En particulier, STAT5 régule des gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que la cycline D2, p27, Bcl6 et la cycline D2 (Fang et al., 2007). De plus, STAT5 exerce une action anti-apoptotique en inhibant l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que BIM et FOXO3A, et en activant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-xL (Socolovsky et al., 1999).

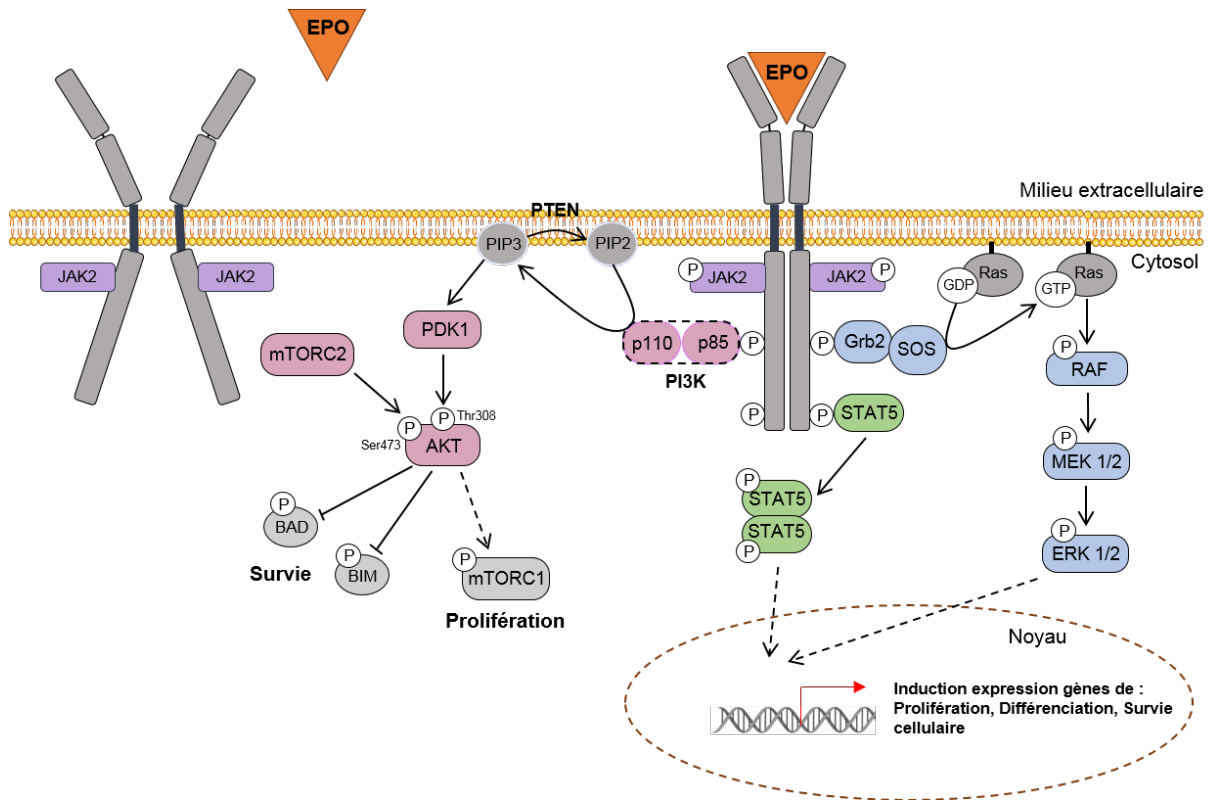


Figure 19 : Voies de signalisation activées en aval du récepteur EPO-R.

EPO-R est exprimé sous forme de dimère à la surface des cellules. La fixation d'une molécule d'EPO entraîne un changement de conformation de EPO-R et un rapprochement des deux kinases JAK2 associées au domaine intracellulaire du récepteur. Ces dernières s'activent par transphosphorylation puis phosphorylent les résidus tyrosine intracytoplasmiques du récepteur, conduisant à l'activation différentes voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération des progéniteurs et précurseurs érythroïdes.

d. Synergie entre les récepteurs c-KIT et EPO-R

Le SCF et l'EPO sont les deux cytokines majeures de l'érythropoïèse. Le SCF a un rôle majeur principalement dans la phase précoce de l'érythropoïèse en assurant la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes, et l'EPO est indispensable pour le maintien des CFU-E et pour la différenciation terminale des érythroblastes.

L'effet synergique entre ces deux récepteurs est décrit grâce des expériences de dénombrement de la formation des BFU-E et des CFU-E *in vitro* et *in vivo* lors de l'administration soit uniquement d'EPO, soit uniquement de SCF, ou une combinaison des deux facteurs. La présence de SCF seul ne suffit pas à la formation des BFU-E et des CFU-E et la présence d'EPO seule permet la formation de ces progéniteurs en faible quantité. En

revanche, la formation de BFU-E et de CFU-E est décuplée en présence des deux cytokines (pour revue, (Munugalavadla and Kapur, 2005)).

Au cours de la différenciation érythroïde, les récepteurs c-KIT et EPO-R sont conjointement présents à la surface des cellules aux stades CFU-E et pro-E. De plus, nous avons décrit dans le paragraphe C.1.c que certaines voies de signalisation ont la possibilité d'être activées en aval de l'activation de ces deux récepteurs, permettant un effet synergique. C'est notamment le cas de la voie MAPK/ERK, qui, activée par le SCF et par l'EPO, assure la survie et la prolifération des cellules érythroïdes (Sui et al., 1998).

Par ailleurs, il a été montré grâce à des travaux réalisés dans des lignées cellulaires, que chacun des récepteurs EPO-R ou c-KIT, lorsqu'ils sont activés par la fixation de leur ligand spécifique, pouvait activer l'autre récepteur. En effet, dans la lignée érythroleucémique UT-7 dépendante de l'EPO, l'ajout de l'EPO dans le milieu de culture entraîne la dimérisation et l'activation du récepteur c-KIT (Broudy et al., 1998). A l'inverse, la lignée érythroleucémique murine HCD57 normalement dépendante de l'EPO, subit une activation de son récepteur EPO-R en présence de SCF seul. Après activation de c-KIT par son ligand SCF, celui-ci est capable d'induire la phosphorylation des résidus tyrosine de la partie intracellulaire de l'EPO-R (Wu et al., 1995a). Cette même équipe a mené des expériences de co-immunoprécipitation et apporte une évidence de l'interaction physique de ces deux récepteurs (Wu et al., 1995b). En somme, l'ensemble de ces données est en faveur d'une coopération étroite entre les récepteurs EPO-R et c-KIT pour la survie et la prolifération des érythroblastes, même si la base de cette synergie est encore mal comprise.

2. Régulation au niveau transcriptionnel

Comme il a été décrit dans la partie précédente, la régulation de l'érythropoïèse par l'action des facteurs de croissance et les diverses voies de signalisation spécifiquement activées en aval jouent un rôle essentiel pour le maintien des populations érythroïdes et également pour favoriser leur expansion. Conjointement à cette régulation, un second niveau de contrôle est requis pour orienter l'engagement des progéniteurs multipotents vers la lignée érythroïde. Ce processus est finement régulé par l'action de facteurs de transcription qui établissent un programme de transcription restrictif au lignage érythroïde. Ces derniers

servent à la fois d'activateurs de l'expression de gènes érythroïdes mais aussi de répresseurs de l'expression de gènes multi-lignages associés aux progéniteurs multipotents et de gènes des autres lignages afin de diriger la différenciation érythroïde terminale. Le facteur de transcription clé de l'érythropoïèse est GATA-1, et ce dernier peut former des complexes avec divers partenaires pour réguler finement l'expression des gènes spécifiques érythroïdes.

a. Le facteur de transcription GATA-1

GATA-1 est l'un des six membres de la famille des facteurs de transcription GATA, nommés ainsi pour leur capacité à se lier sur l'ADN sur la séquence consensus 5' A/T GATA A/G 3'. Les facteurs GATA sont caractérisés par la présence de deux domaines en doigt de zinc : l'un est directement responsable de la liaison à l'ADN, et l'autre est nécessaire à la stabilité de cette interaction.

L'expression de GATA-1 est indispensable pour une érythropoïèse efficace. L'inactivation du gène *gata-1* chez la souris entraîne une létalité embryonnaire entre les jours 10.5 et 11.5 de développement (E10.5-E11.5) causée par une anémie sévère (Fujiwara et al., 1996). En particulier, il a été montré dans un modèle de cellules souches murines embryonnaires cultivées *in vitro* que la délétion du gène *gata-1* conduit à un arrêt de différenciation au stade pro-E en raison d'une apoptose massive de ce précurseur (Weiss et al., 1994). Ces études révèlent la fonction anti-apoptotique essentielle de GATA-1, notamment par l'activation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-xL (Gregory et al., 1999) pour promouvoir la survie des cellules en cours maturation érythroïde, en coopération avec l'EPO.

En plus de réguler la survie des précurseurs érythroïdes, GATA-1 promeut leur différenciation en régulant la transcription de gènes cibles spécifiques du lignage érythroïde. Ainsi, il active l'expression des gènes codant pour les globines (Martin and Orkin, 1990; Wall et al., 1988), et des gènes codant pour des enzymes de la synthèse de l'hème tels que Alas2 (5-Aminolévulinate Synthase 2) (Kramer et al., 2000) et PBG-D (Porphobilinogène Désaminase) (Chretien et al., 1988; Eleouet and Roméo, 1993). Il est intéressant de noter que l'hème semble effectuer une boucle de rétrocontrôle négative sur l'expression de GATA-1 (Doty et al., 2019). De plus, GATA-1 régule de nombreux gènes codant pour des protéines de la membrane érythrocytaire tels que EPO-R, GPA, et Band 3.

En outre, GATA-1 favorise l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques multipotents vers le lignage érythroïde en agissant comme un répresseur transcriptionnel de facteurs de l'hématopoïèse précoce et de facteurs spécifiques d'autres lignages. Par exemple, GATA-1 inhibe le facteur de transcription GATA-2 exprimé dans les CSH (Doty et al., 2019), et le facteur de transcription PU.1 impliqué dans la différenciation myéloïde (Chou et al., 2009). La régulation entre GATA-1 et GATA-2 est en réalité plus complexe puisqu'il existe un schéma d'expression bi-phasique entre ces deux facteurs de transcription au cours de l'érythropoïèse (voir **figure 20**). Au cours de l'érythropoïèse précoce, GATA-2 est fortement exprimé et active directement l'expression de GATA-1 pour orienter la différenciation érythroïde (Grass et al., 2003). GATA-1 est également capable d'activer sa propre expression, qui augmente au cours de la différenciation érythroïde et réprime l'expression de GATA-2 qui décroît dès l'engagement érythroïde des progéniteurs multipotents. Des études récentes d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent que 65% des sites de fixation à l'ADN de GATA-2 sont communes à GATA-1, confirmant un mécanisme de *switch* fonctionnel entre ces deux partenaires, indispensable pour assurer l'engagement érythroïde et induire le profil d'expression génique érythroïde spécifique par GATA-1 (Suzuki et al., 2013).

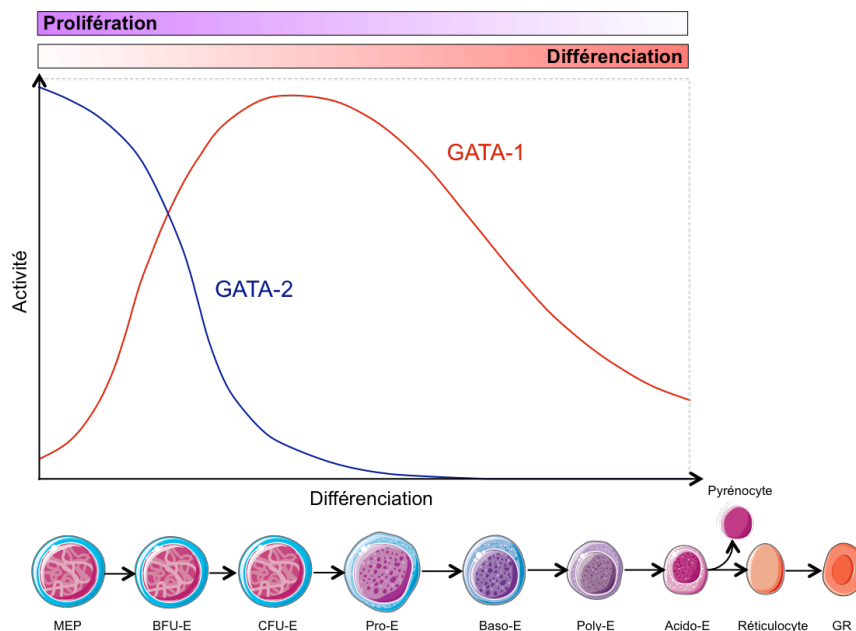


Figure 20 : Profils d'expression de GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse.

GATA-2 est exprimé majoritairement dans les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques incluant les MEP et les BFU-E puis son expression est réprimée par l'augmentation de l'activité de GATA-1 à partir du stade CFU-E. L'expression de GATA-1 est maximale au stade pro-E puis diminue progressivement au cours de la maturation des précurseurs érythroïdes. Des régulations complexes

entre ces deux facteurs aboutissent au switch d'expression progressif de GATA-2 par GATA-1 au cours de l'érythropoïèse.

Par ailleurs, plusieurs études indiquent une implication de GATA-1 dans l'arrêt de la prolifération cellulaire et la modulation du cycle cellulaire au cours de la maturation des précurseurs érythroïdes. Ainsi, il a été montré par ChIP que GATA-1 occupe le promoteur du mitogène *MYC in vivo*, réprimant directement son expression (Rylski et al., 2003). À son tour, l'inhibition de *MYC* entraîne l'induction de l'expression de gènes anti-prolifératifs tels que les inhibiteurs de Cdk (*cyclin-dependant kinase*) p18^{INK4C} et p27^{Kip1} et la répression de gènes prolifératifs tels que la Cdk6 et la cycline D2. De plus, il a été montré que GATA-1 inhibe directement l'expression de *c-KIT*, et plusieurs effecteurs en aval de l'axe de signalisation de c-KIT tels que Vav1 et Akt, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Munugalavadla and Kapur, 2005). Finalement, ces études mettent en évidence un rôle distinct de GATA-1 dans l'induction d'un programme antiprolifératif lié à la répression génique, et qui est découplé de sa capacité à activer les gènes des marqueurs érythroïdes pendant la maturation terminale.

b. Les partenaires de GATA-1

GATA-1 peut interagir avec différents partenaires qui sont des facteurs de transcription ou des cofacteurs (pour revue (Ferreira et al., 2005)). Ces complexes nucléaires ainsi formés jouent un rôle important dans l'érythropoïèse car ils modulent l'activité transcriptionnelle de GATA-1, selon leur composition. Ainsi, les gènes cibles de GATA-1 sont liés par différents complexes protéiques spécifiques de GATA-1, qui sont soit activateurs soit répresseurs de la transcription (Rodriguez et al., 2005).

Par exemple, dans les cellules érythroïdes, GATA-1 forme un complexe avec les facteurs de transcription TAL-1 et KLF1, et les deux protéines LMO2 et LDB1 qui ne se lient pas à l'ADN. Ce complexe est activateur de la transcription et se fixe sur des promoteurs contenant la séquence consensus E-box séparée par 9 nucléotides d'un site de fixation de GATA-1 (Wadman et al., 1997). L'invalidation de chacun de ces facteurs dans des modèles murins cause une anémie sévère et entraîne une mort durant le développement fœtal, due à une absence d'érythropoïèse primitive (pour revue (Cantor and Orkin, 2002)). Comme beaucoup de facteurs de transcription, il a été montré que la régulation de la transcription par GATA-1 s'effectuait par le biais de la formation de structures « looping », permettant de

rapprocher des régions co-régulatrices du génome. Notamment, LDB1 est décrit pour favoriser la formation de ces structures en boucle de chromatine, par la formation de dimères de LDB1 (Love et al., 2014).

En revanche, l'association de GATA-1 avec le facteur de transcription GFI1B inhibe l'expression des gènes érythroïdes par le recrutement du complexe NuRD ayant une activité histone désacétylases ou d'histone méthyltransférase, régulant négativement la transcription (Rodriguez et al., 2005). Le facteur de transcription GFI1B est essentiel pour la maturation des érythroblastes car il permet de réprimer l'expression de gènes d'érythropoïèse précoce tels que *GATA-2* et *c-KIT*. En effet, l'inactivation de *Gfi1b* dans un modèle murin entraîne un arrêt de la différenciation érythro-mégacaryocytaire, entraînant une mort *in utero* (Saleque et al., 2002). Finalement, l'existence de ces divers complexes multiprotéiques permet d'expliquer le caractère activateur et répresseur de GATA-1. Cependant, la compréhension de la complexité de ces interactions protéiques et leur rôle dans la régulation transcriptionnelle au cours de l'érythropoïèse semble encore incomplète.

3. Régulation de l'érythropoïèse par les caspases

La maturation érythroïde terminale est un processus qui est comparable par de nombreux aspects cellulaires avec l'apoptose, puisqu'ils partagent des changements morphologiques majeurs tels que la réduction de la taille du noyau associée à la condensation de la chromatine, et la disparition des nucléoles. En effet, la différenciation érythroïde implique l'activation transitoire des caspases, protéases effectrices du mécanisme d'apoptose. Cette activation s'effectue conjointement aux changements morphologiques des érythroblastes, et leur régulation permet d'aboutir soit à la différenciation des érythroblastes, soit à leur apoptose, constituant donc un contrôle fin de la production des globules rouges.

a. Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes

Au cours de la maturation érythroïde terminale, Zermati et al. ont mis en évidence une dépolarisation de la membrane mitochondriale qui aboutit à la libération cytosolique du cytochrome C, et la formation d'un complexe apoptosome avec la caspase 9 activée. La caspase 9 active ensuite les caspases 6 et 3 (Zermati et al., 2001). L'activation transitoire de la

caspase 3 est nécessaire pour la maturation des érythroblastes puisque son inhibition par le ZVAD (pan-inhibiteur synthétique des caspases) aboutit à un arrêt de la différenciation des érythroblastes au stade baso-E. Le rôle de la caspase 3 activée est de cliver un certain nombre de protéines cibles dont certaines sont impliquées dans les changements morphologiques observés au cours du processus d'apoptose ou de la différenciation érythroïde. En l'occurrence, c'est le cas pour la Lamine B et la protéine Acinus, dont le clivage entraîne respectivement la condensation du noyau et la condensation de la chromatine (voir **figure 21**). Cependant, à l'inverse du processus de l'apoptose, l'inhibiteur ICAD de l'endonucléase CAD n'est pas clivé, ainsi l'ADN des érythroblastes matures n'est pas dégradé en fin d'érythropoïèse. De plus, le facteur de transcription GATA-1 est également une cible de la caspase 3 mais n'est pas clivé. Le mécanisme de protection de GATA-1 vis à vis du clivage sera abordé dans le paragraphe suivant et est essentiel pour protéger les érythroblastes de l'apoptose et permettre leur différenciation terminale.

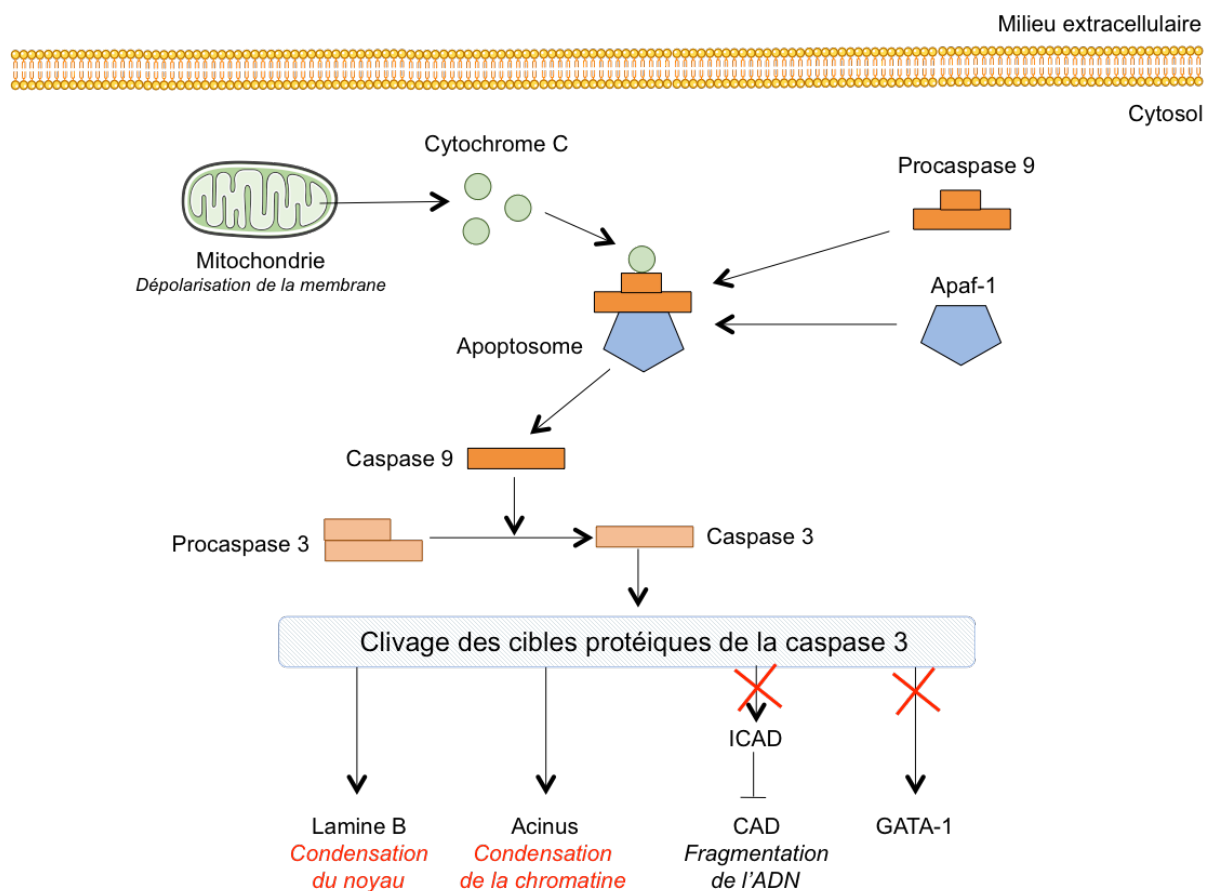


Figure 21 : Voie d'activation de la caspase 3 au cours de la différenciation érythroïde terminale.

La caspase 3 est activée de façon transitoire au cours de l'érythropoïèse, au moment où les changements morphologiques des érythroblastes apparaissent. Cette activation se fait par voie

mitochondriale et aboutit au clivage de plusieurs substrats protéiques cibles de la caspase 3. Le clivage de la Lamine B et de la protéine Acinus est responsable de la condensation du noyau et de la chromatine, et participe donc aux changements morphologiques nécessaires à la différenciation érythroïde terminale. Cependant, à l'inverse du processus d'apoptose cellulaire, la protéine ICAD inhibitrice de l'endonucléase CAD ainsi que le facteur de transcription GATA-1 ne sont pas clivés durant la différenciation érythroïde terminale.

b. Rôle des caspases dans la régulation négative de l'érythropoïèse

Pour limiter une production trop importante de globules rouges, l'érythropoïèse doit être régulée de façon négative. Cette régulation négative s'effectue d'une part par la réduction de la production d'EPO par les cellules rénales ; et d'autre part par un mécanisme paracrine impliquant les récepteurs de mort cellulaire au niveau de l'îlot érythroblastique.

Comme décrit dans le paragraphe I.C.1.c. de l'introduction, la fixation de l'EPO à son récepteur EPO-R permet la survie des progéniteurs érythroïdes notamment grâce à l'expression de Bcl-xL. En effet, ce facteur anti-apoptotique a d'une part son expression induite par l'activation de la voie STAT5 et par GATA-1 et d'autre part l'inhibition par phosphorylation de son partenaire pro-apoptotique BAD par l'activation de la voie PI3K/AKT. Par conséquent, la diminution du taux d'EPO circulant est associée à un défaut d'expression de Bcl-xL, conduisant à l'activation des caspases par la voie mitochondriale, puis l'apoptose suite au clivage des protéines nécessaires à la structure et à l'intégrité du noyau et de la chromatine des érythroblastes.

La régulation négative de l'érythropoïèse s'effectue par ailleurs au sein de l'îlot érythroblastique, où les érythroblastes de tous stades de différenciation interagissent entre eux. Il a été montré que les érythroblastes immatures expriment fortement le récepteur de mort Fas qui interagit directement avec son ligand FasL situé à la surface des érythroblastes matures (poly-E et acido-E) (De Maria et al., 1999). Cette interaction déclenche la cascade d'activation des caspases, aboutissant à l'activation de la caspase 3 et au clivage subséquent du facteur de transcription GATA-1, ce qui entraîne la mort des érythroblastes matures. Plus récemment, l'équipe d'Olivier Hermine a mis en évidence le rôle de la protéine chaperone HSP70 dans le mécanisme du clivage de GATA-1 (voir **figure 22**). En effet, en présence d'EPO, HSP70 est localisé dans le noyau et interagit directement avec GATA-1, ce qui le protège du clivage par la caspase 3. GATA-1 est ainsi préservé et assure l'induction de différenciation terminale et la survie des érythroblastes (Ribeil et al., 2007). Cependant,

lorsque le taux d'EPO est diminué, le clivage de GATA-1 par la caspase 3 s'explique par la délocalisation de HSP70 du noyau, qui ne peut plus assurer son rôle protecteur envers GATA-1.

Finalement, la production d'érythroblastes matures dans la moelle osseuse peut exercer un rétrocontrôle négatif de l'érythropoïèse en induisant l'apoptose des précurseurs érythroïdes. Il existe donc une balance finement régulée entre l'apoptose des érythroblastes et leur différenciation terminale afin de contrôler la production des globules rouges.

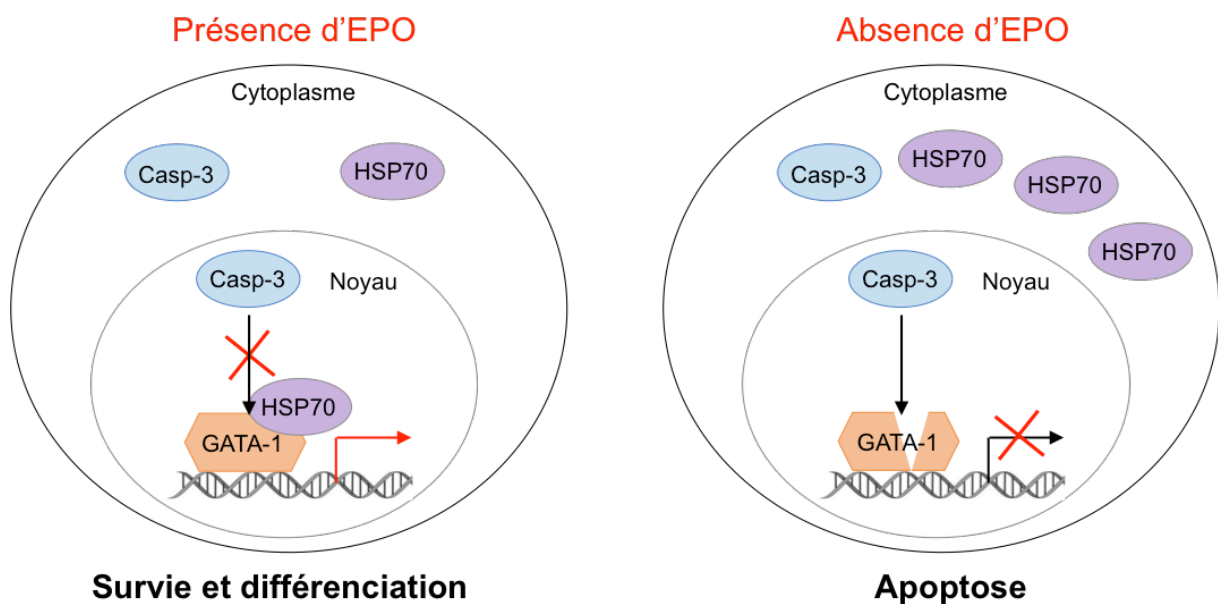


Figure 22 : La protéine chaperone HSP70 protège GATA-1 du clivage par les caspases au cours de l'érythropoïèse.

En présence d'EPO, la protéine chaperone HSP70 est localisée dans le noyau des érythroblastes et protège ainsi le facteur de transcription GATA-1 de son clivage par la caspase 3. L'intégrité de GATA-1 permet d'assurer la différenciation et la survie des érythroblastes. En absence d'EPO, HSP70 est relocalisée dans le cytosol, rendant GATA-1 sensible au clivage par la caspase 3 et l'induction de l'apoptose des érythroblastes.

III. Le ribosome en pathologies

A. Les ribosomopathies

La biogenèse des ribosomes est un processus extrêmement complexe qui fait intervenir une multitude de facteurs protéiques, tous ayant un rôle essentiel. L'altération d'un de ces composants peut entraîner un défaut du processus de biogenèse des ribosomes, et être à l'origine de diverses maladies humaines appelées ribosomopathies.

Les ribosomopathies regroupent un ensemble de pathologies congénitales ou acquises, causées par une inhibition de biogenèse ou de fonction des ribosomes (pour revue, (Danilova and Gazda, 2015; Narla and Ebert, 2010)) (voir **tableau 1**). Elles sont dues à des altérations d'origine génétique qui peuvent concerner des gènes codant les RPs ou des gènes codant les facteurs du processus de biogenèse, ce qui inclut la synthèse, la maturation, le transport et l'assemblage des composants ribosomiques. Ces pathologies sont associées à des phénotypes cliniques spécifiques et différents tissus cellulaires peuvent être affectés. Les caractéristiques cliniques principales comprennent des atteintes de la moelle osseuse et des anomalies du développement osseux. De plus, les patients atteints de ribosomopathies ont un risque augmenté de développer un cancer.

Pour la suite, deux ribosomopathies seront particulièrement exposées. Les deux ont en commun qu'elles présentent une anémie comme phénotype clinique principal. Il s'agit de l'anémie de Blackfan-Diamond et du syndrome 5q-.

Pathologie	Gènes impliqués	Fonction moléculaire affectée	Manifestation clinique
<i>Altération d'un gène codant une RP</i>			
Anémie de Blackfan Diamond (ABD)	<i>RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS29, RPL5, RPL11, RPL15, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35</i>	Maturation des ARNr	Anémie macrocytaire, aplasie médullaire, anomalies cranio-faciales, des membres et de l'appareil uro-génital
Syndrome 5q-	<i>RPS14</i> (Parmi les ~ 40 gènes de la région commune de délétion (CDR))	Maturation des ARNr	Anémie macrocytaire, micromégacaryocytes hypobulés, thrombocytose
<i>Altération d'un gène codant un facteur de la biogenèse des ribosomes</i>			
Dyskératose Congénitale (DC)	<i>DKC1</i>	Modification des ARNr	Cytopénies, aplasie médullaire, hyperpigmentation de la peau, dystrophie des ongles
Syndrome de Shwachman-Diamond (SSD)	<i>SBDS</i>	Maturation et export grande sous-unité ribosomique	Aplasia médullaire, retard de croissance, insuffisance pancréatique, anomalies squelettiques
Chondrodysplasie métaphysaire	<i>RMRP</i>	Maturation de l'ARNr 5.8S	Anémie, retard de croissance, hypoplasie des cheveux, immunodéficience

Tableau 3 : Exemples de ribosomopathies et leurs caractéristiques moléculaires et cliniques.

1. L'anémie de Blackfan-Diamond

L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) fait partie des ribosomopathies les plus étudiées, décrite en 1938 (Diamond and Blackfan, 1938). L'ABD est une pathologie congénitale qui est caractérisée par une anémie macrocytaire associée à une diminution ou une absence de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse. Près de la moitié des patients atteints d'ABD peuvent également présenter des anomalies de croissance dont des malformations osseuses au niveau du crâne et des membres supérieurs, ainsi que des atteintes cardiaques et urogénitales. L'incidence de cette pathologie est d'environ 4 à 5 cas pour un million de naissances. La majorité des patients sont diagnostiqués durant leur première année de vie et ont une évolution clinique imprévisible émaillée de complications. En particulier, les patients atteints d'ABD ont un risque augmenté de développer des cancers, notamment des ostéosarcomes et des leucémies myéloïdes aiguës (Clinton and Gazda, 1993).

En 1999, a été décrite pour la première fois la mutation hétérozygote du gène codant la protéine ribosomique RPS19 (Draptchinskaia et al., 1999). Depuis, de nombreuses mutations ont été identifiées au sein d'autres gènes codant des RP, de la petite ou de la grande sous-unité, incluant RPS7, RPS10, RPS17, RPS24, RPS26, RPS27A, RPS29, RPL5, RPL11, RPL15, RPL26, RPL27, RPL31 et RPL35A (Cmejla et al., 2007; Farrar et al., 2008; Gazda et al., 2006; Mirabello et al., 2014). Les mutations avec perte de fonction hétérozygote de RPs sont retrouvées chez environ 50% des patients, dont les plus fréquentes concernent les gènes *RPS19* (25%), *RPL5* (7%), *RPL11* (5%). À ce jour, environ 77 mutations différentes, majoritairement monoalléliques, ont été identifiées au sein du gène *RPS19*, résultant en une perte totale d'expression ou bien l'expression d'une protéine tronquée (Campagnoli et al., 2008; Da Costa et al., 2003; Proust et al., 2003). Ainsi, l'haploinsuffisance d'une RP et la diminution de la biogenèse des ribosomes qui en résulte semblent être à l'origine de la physiopathologie de la maladie.

Tous les patients atteints d'ABD présentent des déficiences de la moelle osseuse, et les malformations physiques retrouvées chez environ la moitié des patients ne sont pas clairement corrélées avec la nature de la mutation. Cependant, les mutations des gènes *RPL5* et *RPL11* semblent être plus souvent associées à des malformations physiques, particulièrement les pouces à trois phalanges pour 70% des cas, par rapport aux mutations du gène *RPS19* (46%) (Gazda et al., 2008). Ces observations montrent que la nature de la mutation semble être associée à un phénotype clinique spécifique.

La physiopathologie de l'ABD est très probablement liée à un défaut de biogenèse ou de fonction des ribosomes. Jusqu'à présent, la quasi-totalité des mutations identifiées chez les patients atteints d'ABD sont situées sur des gènes codant des RPs de la petite ou de la grande sous-unité. Des études portant sur les mutations des gènes *RPS19* et *RPS24* de la petite sous-unité ribosomique, montrent un défaut de maturation de l'ARNr 18S et un défaut d'assemblage et de production de la particule 40S, entraînant une diminution du nombre de ribosomes matures 80S (Choesmel et al., 2007, 2008). De la même manière, les mutations des gènes *RPL5*, *RPL11* et *RPL35A* affectent la formation de la particule 60S et le nombre de ribosomes matures 80S contenus dans la cellule est diminué (Farrar et al., 2008; Gazda et al., 2008).

Plus récemment, des études se sont focalisées sur les conséquences de l'haploinsuffisance de RP et l'inhibition de la biogenèse des ribosomes sur la traduction protéique globale. En particulier, l'haploinsuffisance du gène *RPS19* ou du gène *RPL11* entraîne une diminution d'expression de certaines protéines, sans modifier le niveau d'expression de leur transcrite (Horos et al., 2012; Pereboom et al., 2014). Ces transcrits dont la traduction est affectée possèdent soit une séquence IRES, soit une séquence 5'UTR plus longue que la moyenne. Ces observations suggèrent une défaillance qualitative de l'initiation de la traduction lors de l'haploinsuffisance de *RPS19* ou *RPL11*, mais le mécanisme reste inconnu. En 2014, l'équipe de Vijay Sankaran a montré une diminution de l'expression du facteur de transcription érythroïde majeur GATA-1 au niveau protéique, mais pas au niveau du transcrite, chez les patients ABD avec mutation d'une RP. Cette diminution de GATA-1 pourrait ne pas être constante dans tous les cultures ex-vivo de cellules érythroïdes primaires de patients porteurs d'ABD (O'Brien et al., 2017). En conséquence, l'expression des gènes qui sont des cibles transcriptionnelles de GATA-1 est diminuée, confirmant la perte d'activité de GATA-1. Comparativement à la globalité des transcrits de la cellule, le caractère hautement structuré de la région 5'UTR du transcrite GATA-1 a été associé à son défaut de traduction (Ludwig et al., 2014). Une diminution du niveau protéique de Gata1 a également été révélé dans un modèle de poisson zèbre muté pour *rpl11* (Bibikova et al., 2014). Enfin, une étude récente soutient le mécanisme de défaut de traduction de GATA-1 à la suite d'un déséquilibre de production des sous-unités ribosomiques (Gilles et al., 2017). La perte d'expression de GATA-1 pourrait apporter une explication quant à la spécificité de l'atteinte érythroïde par la pathologie. Pour appuyer cette hypothèse, l'augmentation du niveau protéique de GATA-1 dans les cellules de patients DBA ou dans les cellules primaires hématopoïétiques avec une diminution d'expression de RPL11 ou RPL5, restaure partiellement la production des globules rouges (Ludwig et al., 2014). En outre, un cas familial de mutation du gène *GATA-1* a été identifié et entraîne un phénotype classé comme une DBA (Sankaran et al., 2012a). Ces patients n'ont pas de malformation physique mais ont un phénotype érythroïde anémique similaire aux patients atteints d'ABD avec mutation d'un gène codant une RP. Plus récemment, des travaux menés sur modèles cellulaires d'ABD montrent que l'expression réduite de *RPS19*, *RPS24*, *RPL5*, ou *RPL11*, par stratégie shARN, conduit à une diminution de la quantité de ribosomes disponibles (Khajuria et al., 2018). La réduction du contenu cellulaire en ribosomes provoque des changements de la traduction protéique globale, qui affecte particulièrement un sous-ensemble d'ARNm, dont celui de GATA-1 (Khajuria et al., 2018). L'ensemble de ces données montre que GATA-1, bien que

n'étant pas la cible unique de dérégulation de la traduction chez les patients atteints d'ABD, a une implication importante dans l'atteinte spécifique de la lignée érythroïde de cette pathologie.

2. Le syndrome 5q-

Le syndrome 5q- est un sous-type de syndrome myélodysplasique (SMD). Les syndromes myélodysplasiques regroupent des maladies clonales acquises de la cellule souche et des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes. Ces hémopathies myéloïdes sont caractérisées par une moelle osseuse riche et une ou plusieurs cytopénies périphériques, reflétant une hématopoïèse inefficace. Il existe plusieurs classes de SMD, qui sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en fonction du nombre de cytopénies et de dysplasies, de l'éventuelle présence d'un excès de blastes et d'anomalies cytogénétiques. Tous ces critères sont pris en compte pour l'attribution d'un score pronostique, dont l'IPSS (*International Prognosis Scoring System*), permettant d'estimer la survie moyenne des patients et d'évaluer le risque d'évolution leucémique.

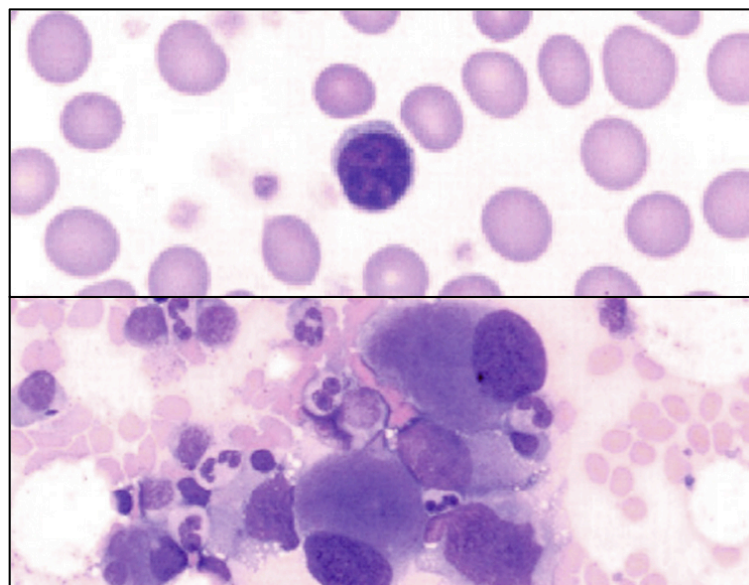


Figure 23 : Cytologie caractéristique d'un patient atteint du syndrome 5q-.

Un frottis de sang périphérique montre que l'anémie des patients atteints du syndrome 5q- est généralement macrocytaire, c'est-à-dire que le volume des érythrocytes est en moyenne plus élevé que la normale. Le nombre de plaquettes est quant à lui normal ou élevé (haut). De plus, ce syndrome est caractérisé par la présence de mégacaryocytes monolobés et hypolobés dans la moelle osseuse (bas). Ces images sont issues d'une observation au microscope optique de prélèvements de patients atteints du syndrome 5q-, après une coloration MGG. (James Vardiman, Blood 2003 101:3346)

Le syndrome 5q- représente 15% des cas de SMD, et est classé parmi les SMD de faible risque. L'évolution leucémique est évaluée à 10% des cas. Le syndrome 5q- est principalement caractérisé par une anémie macrocytaire, parfois accompagnée d'une thrombocytose. En cytologie, la présence de mégacaryocytes dysplasiques monolobés est caractéristique de ce syndrome (voir **figure 23**). Décrit pour la première fois en 1974, ce syndrome est défini par une délétion interstitielle du bras long du chromosome 5 (Van den Berghe et al., 1974). La région délétée du chromosome 5 est variable mais Boulwood et al. ont délimité une région commune de délétion (CDR) à partir de l'analyse cytogénétique de 16 patients 5q-. Cette région est d'une taille approximative de 1,5 mégabases, et comprend 40 gènes, dont le gène codant une protéine ribosomique de la petite sous-unité, *RPS14* (Boulwood et al., 2002). En 2008, une étude de criblage fonctionnel a été réalisée dans des cellules CD34+ normales, dans lesquelles l'expression des 40 gènes de la CDR a été individuellement inhibée par stratégie shARN (*short hairpin RNA*). Seule l'inhibition de l'expression de *RPS14* reproduit le phénotype érythroïde du syndrome 5q- avec un défaut prédominant de la lignée érythroïde par rapport à la lignée mégacaryocytaire (Ebert et al., 2008). La diminution de l'expression du transcrite RPS14 a été confirmée dans des cellules de patients 5q-, conséquence la délétion d'un des deux allèles (Pellagatti et al., 2008). Par ailleurs, dans un modèle murin, la délétion 5q reproduit les défauts caractéristiques de l'anémie macrocytaire *in vivo* (Barlow et al., 2010). Enfin, la surexpression du gène *RPS14* dans des cellules de patients 5q- permet de restaurer une érythropoïèse normale, confirmant l'implication de ce gène dans la physiopathologie de la maladie.

Le gène *RPS14* code pour un composant de la petite sous-unité ribosomique 40S. La protéine RPS14 est impliquée dans les étapes précoces de la biogenèse des ribosomes, lors de l'initiation de la maturation de l'ARNr 18S. En effet, il a été montré que la réduction de l'expression du gène *RPS14* empêche la production de l'ARNr 18S mature et par conséquent la formation de la sous-unité ribosomique 40S. De plus, chez les patients 5q-, l'expression réduite du gène *RPS14* induit l'augmentation du ratio pré-ARNr 30S/ARNr 18S, témoignant d'un défaut de maturation de la sous-unité ribosomique 40S (Ebert et al., 2008).

Finalement, de façon similaire à l'anémie de Blackfan-Diamond, le syndrome 5q- est responsable d'une insuffisance médullaire avec anémie macrocytaire. De plus, les patients atteints par ces deux pathologies présentent une prédisposition à certains cancers, dont la leucémie myéloïde aiguë (LAM). L'altération de la biogenèse des ribosomes induite par la

mutation d'une RP (ABD), ou suite à la délétion monoallélique de *RPS14* (5q-) contribueraient donc aux défauts de l'érythropoïèse observés chez les patients. En outre, des défauts de la biogenèse des ribosomes ont été observés dans des syndromes myélodysplasiques, autre que le 5q-. Une étude réalisée en 2012 dans des cellules CD34+ de patients SMD non 5q- a montré une augmentation de la méthylation du promoteur l'ADNr et une diminution de la synthèse de l'ARNr (Raval et al., 2012). Ces données suggèrent que l'altération de la biogenèse des ribosomes pourrait être à la base du dysfonctionnement de l'hématopoïèse observé chez les patients atteints de SMD.

B. Les modèles physiopathologiques des ribosomopathies

1. L'implication de la protéine p53 dans la physiopathologie des ribosomopathies

a. Généralités sur la protéine p53

Découvert pour la première fois en 1979 (DeLeo et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979), *TP53* est le gène clé de la suppression tumorale (Baker et al., 1989; Finlay et al., 1989). Ce gène code pour la protéine p53, facteur de transcription intensivement étudié pour son implication dans le développement des cancers. En effet, l'altération de la fonction de p53 est décrite dans plus de la moitié des cancers humains, ce qui en fait l'altération la plus fréquemment observée (Bérout and Soussi, 1998). Surnommé « gardien du génome » (Lane, 1992), p53 est activé en réponse à des facteurs de stress cellulaires, et assure un rôle central dans la régulation de processus cellulaires fondamentaux tels que la croissance, la prolifération, le cycle cellulaire, ou encore la mort cellulaire programmée.

Chez l'Homme, le gène *TP53* est situé sur le chromosome 17. La protéine p53, nommée ainsi en raison de son poids moléculaire de 53 kDa, comprend 393 acides aminés. P53 est actif sous forme d'homotétramère. Chaque monomère de p53 est constitué de quatre domaines fonctionnels différents (voir **figure 24**). Le domaine N-terminal comprend deux domaines adjacents de transactivation, TAD1 et TAD2, qui sont cruciaux pour permettre la

liaison de p53 avec ses cofacteurs, en particulier MDM2 et CBP/p300. Le domaine riche en proline (PRD pour *Proline-rich domain*) aurait plutôt un rôle structural et participerait à la régulation de la stabilisation de la protéine. Le domaine central (DBD pour *DNA-binding domain*) est responsable de la liaison de p53 sur des éléments de séquence spécifiques présent sur l'ADN. Enfin, la région C-terminale englobe des séquences de localisation nucléaire (NLS pour *Nuclear localisation sequence*), un domaine de tétramérisation et un domaine de régulation.

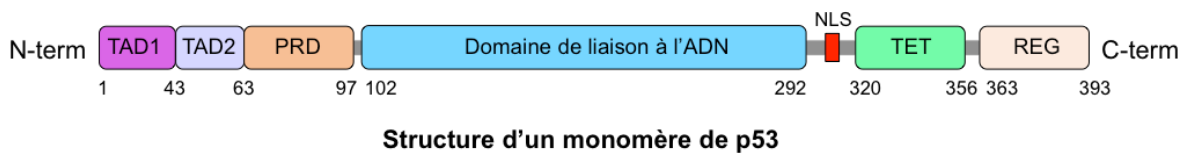


Figure 24 : Domaines structuraux et fonctionnels d'un monomère de la protéine p53.

La protéine p53 est active sous forme d'homotétramère. Chaque monomère est composé de deux domaines de transactivation TAD1 et TAD2 et d'un domaine riche en prolines (PRD) en N-terminal. La partie centrale constitue le domaine de liaison à l'ADN. Enfin, la partie C-terminale contient un domaine de tétramérisation (TET) ainsi qu'un domaine de régulation (REG). NLS : signal de localisation nucléaire

La protéine p53 intègre différents signaux de stress cellulaires qui incluant les dommages à l'ADN, l'hypoxie, l'expression oncogène, la carence en nutriments ou encore le dysfonctionnement des ribosomes (pour revue, (Brady and Attardi, 2010; Kasthuber and Lowe, 2017)) (voir **figure 25**). Ces signaux sont relayés par une grande variété de facteurs protéiques capables d'induire des modifications post-traductionnelles sur les acides aminés de la protéine p53, dont des phosphorylations, méthylations, acétylations, ubiquitinations, ou sumoylations. Il en résulte une activation fonctionnelle de la protéine p53 qui peut agir comme un activateur et un répresseur transcriptionnel d'un très grand nombre de gènes cibles. Les profils de modifications post-traductionnelles de p53 sont variés et peuvent moduler l'affinité de p53 pour certains de ses gènes cibles. Chaque modification post-traductionnelle est associée à l'induction d'un programme transcriptionnel spécifique. Toutefois, les réponses induites par certaines modifications post-traductionnelles peuvent se retrouver redondantes. Par exemple, le gène *CDKN1A* (p21), cible directe de p53, est régulée par la modification post-traductionnelle de p53 à plusieurs sites différents, incluant la phosphorylation à la sérine 15. De la même manière, une seule kinase peut induire des modifications post-

traductionnelles de p53 à plusieurs sites, c'est par exemple le cas de CHK2, qui peut phosphoryler les résidus thréonine 18 et sérine 20.

En conclusion, la régulation des gènes cibles de p53 est complexe et dépend de plusieurs paramètres. En effet, comme précisé plus haut, l'induction d'un programme transcriptionnel par p53 dépend des modifications post-traductionnelles de p53 mais également d'une combinaison de celles-ci (Gu and Zhu, 2012). Par ailleurs, les réponses à l'activation de p53 peuvent être influencées par le contexte cellulaire. Enfin, p53 peut former des complexes avec différents cofacteurs, tel que HIPK2, ce qui module son affinité pour les promoteurs de ses gènes cibles et, de ce fait, régule leur expression. La combinaison de tous ces paramètres, souvent imagée comme le « code barre » de p53, dicte la réponse p53 dans un contexte donné (Murray-Zmijewski et al., 2008).

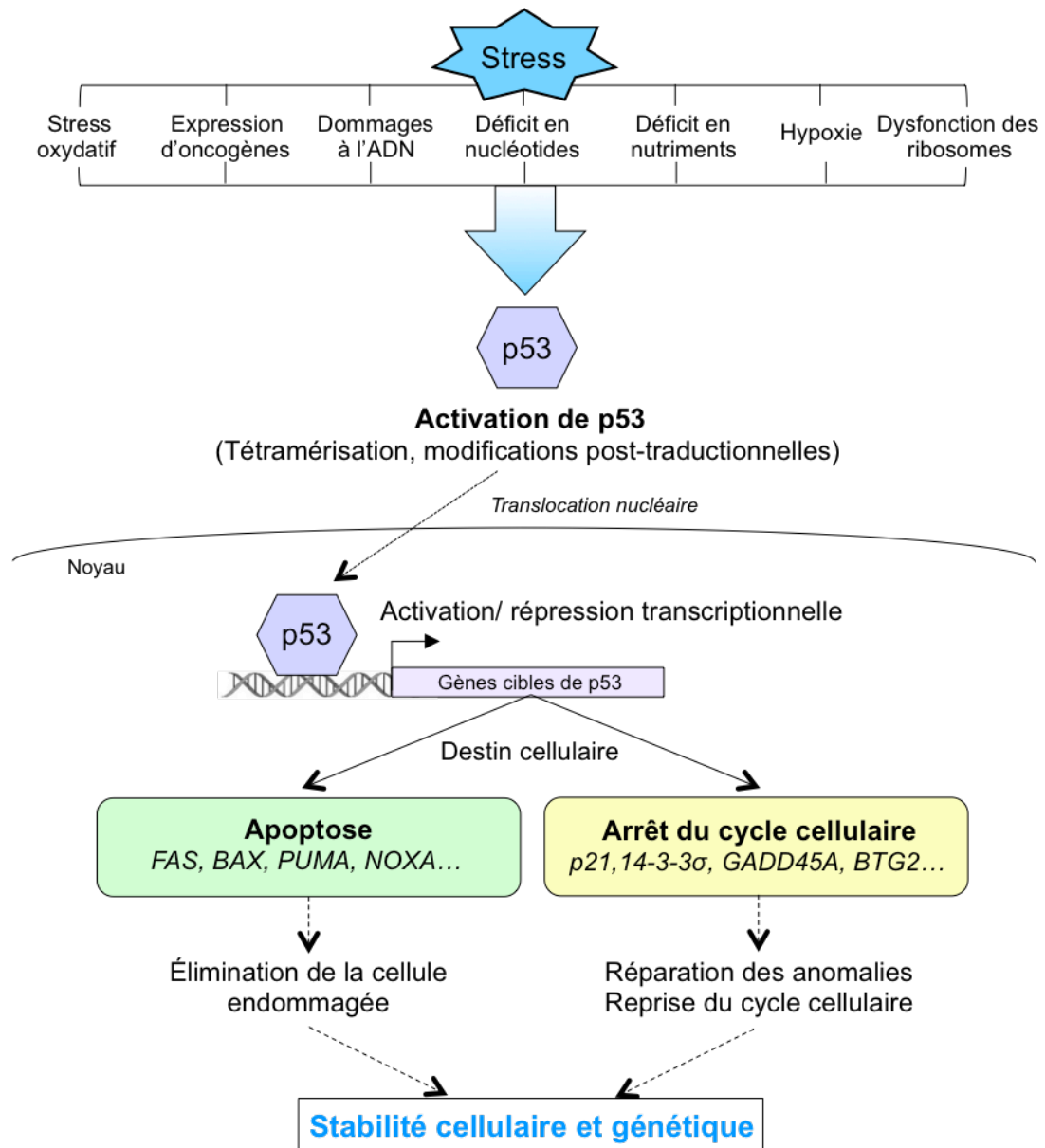


Figure 25 : Mécanisme général de l'activation de p53 en réponse à divers signaux de stress et conséquences cellulaires.

En réponse à une variété de signaux de stress cellulaires, p53 est activé par l'ajout de modifications post-traductionnelles et par l'augmentation de sa stabilité *via* l'inhibition de MDM2. Le tétramère de p53 activé est importé dans le noyau pour réguler la transcription de ses nombreux gènes cibles, ces derniers étant impliqués dans des processus cellulaires très variés. Le programme transcriptionnel induit par p53 est dépendant de la nature et de l'intensité du stress cellulaire à l'origine de son activation. Ainsi, p53 est à un carrefour décisionnel pour le devenir de la cellule. Si les dommages cellulaires sont trop sévères, la cellule sera éliminée par l'induction du processus d'apoptose. En revanche, dans le cas où la réparation des anomalies cellulaires est possible, le cycle cellulaire est arrêté afin d'effectuer ces réparations. De ce fait, p53 est un gardien de l'intégrité du génome et son activation permet de limiter la progression de cellules anormales qui pourraient devenir tumorales.

En conditions normales, la protéine p53 est exprimée faiblement et possède une demi-vie courte, compte-tenu du mécanisme de rétrocontrôle de son expression par l'E3 ubiquitine

ligase MDM2, qui sera détaillé dans la prochaine partie. Toutefois, en réponse aux signaux de stress, l'activation de p53 et de ses gènes cibles peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose (Oren, 2003). Ainsi, lorsqu'une cellule subit une altération qui la prédispose à devenir tumorale, p53 est activé et, selon la gravité des dommages et la nature du stress, oriente le destin de la cellule. En réponse à un stress soutenu ou sévère, p53 induit un programme d'apoptose irréversible afin d'éliminer les cellules affectées et empêcher leur prolifération potentiellement tumorale. Ce programme transcriptionnel peut inclure l'activation de gènes pro-apoptotiques, tels que *FAS*, *BAX*, *NOXA*, *PUMA* (Riley et al., 2008; Zilfou and Lowe, 2009). Dans le cas d'un stress modéré, p53 répond en induisant un arrêt du cycle cellulaire par l'induction de l'expression du gène *CDKN1A* (*p21*), entre autre, et des gènes de la réparation de l'ADN, afin de limiter la propagation des mutations oncogènes (Riley et al., 2008). La protéine p53 semble donc être au centre d'un carrefour décisionnel important à la suite de divers types de stress cellulaires.

b. Le rôle de la protéine p53 dans la régulation de la biogenèse des ribosomes

La protéine p53 régule donc une variété de fonctions cellulaires fondamentales liées au contrôle de la prolifération cellulaire. p53 serait également impliqué dans la régulation de la biogenèse des ribosomes (Golomb et al., 2014; Kasteri et al., 2018). Les mécanismes de cette régulation s'opèrent à la fois par le biais de l'activité transcriptionnelle de p53, et aussi par liaison directe de ce dernier avec certains facteurs de la biogenèse des ribosomes et de la machinerie traductionnelle (voir **figure 26**). En effet, il a été montré que p53 pouvait réprimer l'activité des ARN pol I et III. D'une part, p53 peut interférer avec la formation du complexe d'initiation de la transcription de l'ARN pol I, en interagissant directement avec le complexe SL1 (Budde and Grummt, 1999; Zhai and Comai, 2000). De ce fait, la transcription de l'ADNr est restreinte par p53. D'autre part, par sa liaison directe avec le facteur TFIIB, p53 prévient le recrutement de l'ARN pol III sur l'ADN. Ainsi, p53 réprime l'activité de l'ARN pol III impliquée dans la synthèse de l'ADNr 5S et des ARNt (Cairns and White, 1998; Chesnokov et al., 1996).

En plus de réguler la transcription de l'ADNr, une étude plus récente a montré que p53 pouvait aussi réguler la maturation des précurseurs ARNr. La fibrillarine (FBL), protéine enzymatique nucléaire impliquée dans la maturation et la méthylation des précurseurs ARNr, est une cible transcriptionnelle directe de p53 (Marcel et al., 2013). Par sa liaison directe au

promoteur de *FBL*, p53 réprime la transcription de ce gène. Cette répression semble importante puisqu'une surexpression aberrante de FBL est liée à une modification du profil de méthylation des ARNr, et à la production de ribosomes hétérogènes hyperméthylés. Ces ribosomes hyperméthylés sont associés à une baisse de la fidélité de la traduction, et à une augmentation de l'initiation de la traduction IRES-dépendante. Ces modifications peuvent entraîner l'expression incontrôlée d'oncogènes possédant une séquence IRES, tel que *IGF1R*, ce qui contribue au processus de tumorigenèse. Par la régulation de FBL et des snoRNP qui lui sont associés, p53 semble donc contribuer à la qualité de la composition des ribosomes produits et à l'activité traductionnelle résultante (Marcel et al., 2013). Enfin, une augmentation d'expression des snoARN à boîte C/D et de la fibrillarine responsable d'une augmentation de la 2'-O-méthylation des ARNr est associée à la transformation leucémique, et à une fréquence élevée des cellules souches leucémiques (Zhou et al., 2017).

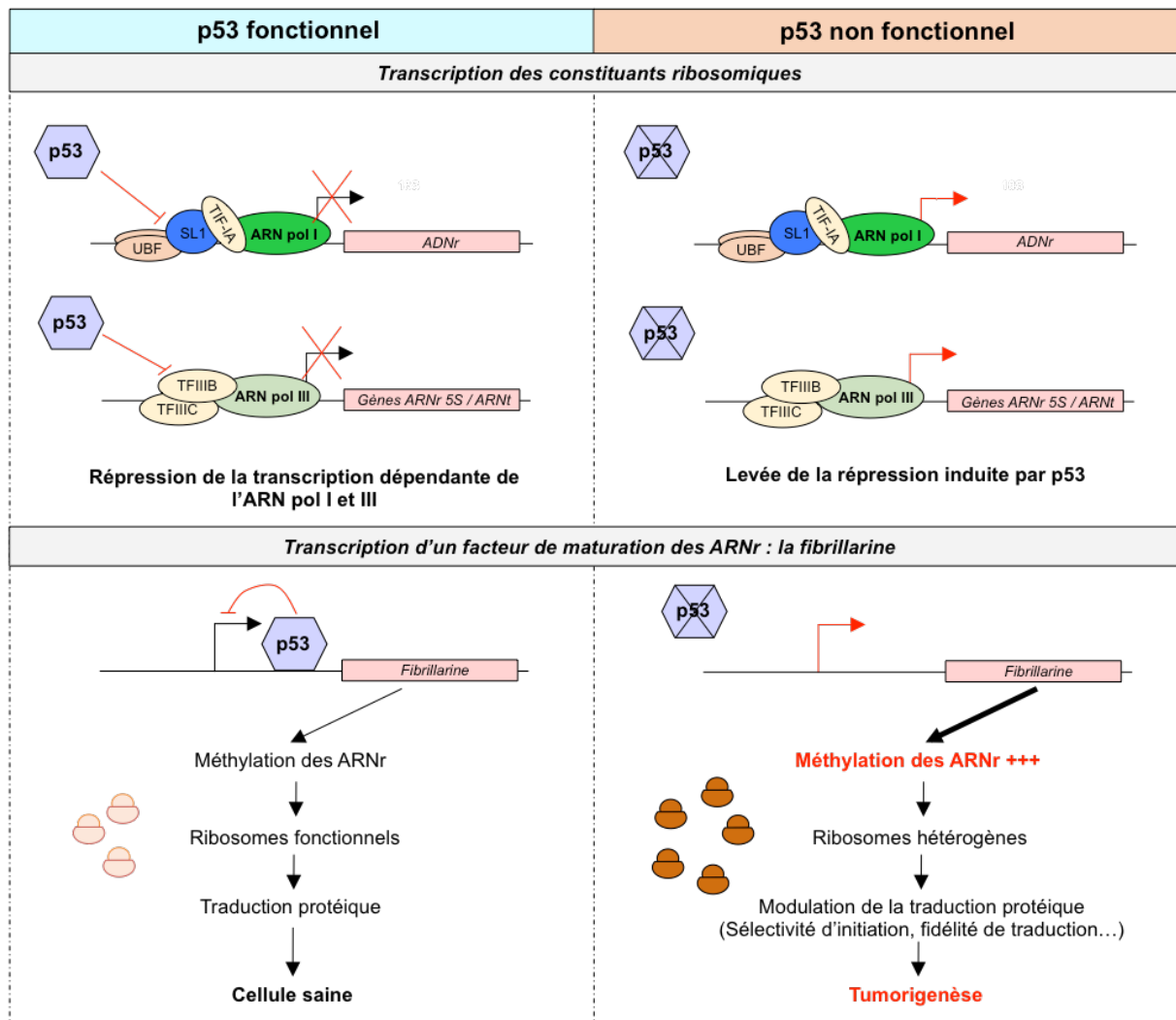


Figure 26 : Le rôle de p53 dans la régulation de la biogenèse des ribosomes

La protéine p53 régule la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux. En conditions physiologiques, p53 module d'une part l'activité des ARN polymérase I et III (Budde and Grummt, 1999; Zhai and Comai, 2000). En se fixant directement au complexe SL1 et au facteur TFIIIB, p53 interfère à la formation des complexes d'initiation de la transcription spécifiques des ARN pol I et III, respectivement (gauche, haut). Lorsque la protéine p53 n'est pas fonctionnelle, une levée de la répression transcriptionnelle dépendante de ces deux polymérase s'opère (droite, haut). À un autre niveau, p53 est un répresseur transcriptionnel du gène de la fibrillarine (FBL). Le contrôle de l'expression de FBL est important puisqu'il conditionne le profil adéquat de méthylation des ARNr nécessaire pour la production de ribosomes fonctionnels (gauche, bas). L'inactivation fonctionnelle de p53 mène à une expression non contrôlée de FBL, entraînant à son tour une hyperméthylation des ARNr. Les ribosomes hyperméthylés ainsi formés ont une dynamique de traduction modulée, ce qui semble contribuer à la tumorigénèse (droite, bas) (Marcel et al., 2013).

c. Le stress ribosomique et l'activation de p53

– *Le stress ribosomique*

Le stress ribosomique, également appelé stress nucléolaire, est la conséquence d'un défaut de la biogenèse des ribosomes. Ce dernier peut être causé par la perturbation de la synthèse ou de la maturation des ARNr, de l'assemblage des ribosomes, ou par l'existence d'un déséquilibre stoechiométrique entre les composants ribosomiques (Liu et al., 2016). Différentes classes de stimuli intra- et extracellulaires peuvent déclencher un stress ribosomique : 1) les agents chimiques qui perturbent la production des ARNr ou affectent la production des RPs, c'est par exemple le cas de l'actinomycine D, 2) la carence en nutriments, particulièrement la privation en sérum ou en glucose, ainsi que l'état hypoxique, 3) l'altération génétique congénitale, acquise ou issue de manipulation expérimentale, d'un gène impliqué dans la biogenèse des ribosomes, comme par exemple les gènes codant les RPs ou des facteurs de la maturation des ARNr (pour revue, (Zhou et al., 2015)).

De manière générale, lors d'un stress ribosomique, la perturbation de la biogenèse des ribosomes conduit à une accumulation anormale de RPs libres, qui ne sont pas incorporées aux ribosomes. L'augmentation des RPs libres, à leur tour, résulte généralement en la stabilisation de la protéine p53. En effet, des études récentes provenant de modèles variés indiquent que p53 est activé et/ou stabilisé à la suite d'un dysfonctionnement de la biogenèse des ribosomes. Le mécanisme général de l'activation de la protéine p53 fait intervenir la protéine MDM2, principal régulateur de p53.

– *La régulation de p53 par MDM2*

L'activation de la protéine p53 peut menacer la viabilité des cellules, et il existe par conséquent des mécanismes permettant de contrôler le niveau d'expression de p53. En conditions normales, la protéine p53 est maintenue à un niveau faible grâce à d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif continu impliquant plusieurs E3 ubiquitines ligases, dont la principale est MDM2 (*Mouse double minute 2*), normalement appelée HDM2 chez l'Homme (*Human double minute 2*) (Brooks and Gu, 2006) (voir **figure 27A**). MDM2 reconnaît et lie p53 au niveau de son domaine de transactivation (TAD1) situé en N-terminal, et induit son

ubiquitination. Les résidus lysine de la région C-terminale de p53 sont les sites majeurs de l'ubiquitination de p53 par MDM2 (Rodriguez et al., 2000). La polyubiquitination de p53 empêche sa stabilisation et conduit à sa dégradation par le protéasome. De plus, MDM2 inhibe la fonction transactivatrice de la transcription de p53 en empêchant le recrutement des composants de la machinerie transcriptionnelle. Il est intéressant de noter que MDM2 est une cible transcriptionnelle directe de p53. Ainsi, MDM2 et p53 sont les acteurs d'une boucle de rétrocontrôle, dans laquelle p53 peut induire la transcription de son propre régulateur négatif MDM2 (Wu et al., 1993). À la suite de la stabilisation de p53, l'augmentation de l'expression de MDM2 est essentielle pour restaurer un taux homéostatique de la protéine p53, en faveur de la survie des cellules.

– La voie RP-MDM2-p53

Lors d'un stress ribosomique, il y a une modification de la dynamique d'interaction entre p53 et MDM2, qui peut s'opérer par plusieurs mécanismes. D'une part, certaines RPs libres non incorporées dans les ribosomes sont capables d'interagir avec MDM2 dans le nucléoplasme (voir **figure 27B**). Par cette liaison, elles empêchent la formation du complexe MDM2-p53 et induisent la stabilisation de la protéine p53. RPL11 et RPL5 furent les premières protéines ribosomiques découvertes pour leur capacité à interagir avec MDM2. En 2003, deux équipes ont montré que l'induction d'un stress ribosomique par le traitement des cellules avec de faibles doses d'actinomycine D, inhibant majoritairement l'activité de l'ARN pol I, entraîne une augmentation de la liaison RPL11 à MDM2 (Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003). Par conséquent, RPL11 inhibe la formation du complexe MDM2-p53, ce qui mène à la stabilisation de p53. L'année suivante, une autre équipe a mis en évidence l'existence d'une interaction entre RPL5 et MDM2, conduisant également à la stabilisation de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Dai et al., 2007). Par ailleurs, l'invalidation de la protéine ribosomique RPS6 entraîne une augmentation de la traduction des ARNm 5'TOP, ce qui aboutit à l'augmentation de la quantité de RPL11, responsable de l'activation de p53 (Fumagalli et al., 2009). Des travaux réalisés dans des fibroblastes primaires humains montrent que la déplétion de l'expression de *RPL11* et *RPL5* empêche la stabilisation de la protéine p53 (Teng et al., 2013). Les protéines RPL11 et RPL5 semblent donc exercer un rôle essentiel dans la régulation de p53 suite à un défaut de la biogenèse des ribosomes. Toutefois, les RPs libres sont normalement rapidement dégradées par le protéasome en cas d'inhibition

de la biogenèse des ribosomes suite au traitement par l'actinomycine D. Il a été montré dans ce contexte que RPL11 et RPL5 s'accumulent dans le nucléoplasme et profitent d'une protection mutuelle contre la dégradation par le protéasome (Bursac et al., 2012). Plus récemment, une association entre RPL11 et RPL5 a été mise en évidence au sein d'un complexe ribonucléoprotéique avec l'ARNr 5S, appelé 5S-RNP (Sloan et al., 2013). L'invalidation individuelle de chacun de ces trois composants abolit la liaison des deux autres avec MDM2, ce qui montre leur mutuelle dépendance pour la formation du complexe 5S-RNP (Donati et al., 2013). Lorsque la biogenèse des ribosomes est altérée, le complexe 5S-RNP est dévié du processus d'assemblage de la sous-unité 60S en faveur d'une association avec MDM2 et de la stabilisation de p53 résultante (Donati et al., 2013). Le complexe 5S-RNP est donc un acteur critique du mécanisme de stabilisation de la protéine p53 suite à un défaut de la biogenèse des ribosomes.

Une récente étude a rapporté l'effet de la déplétion de chacune des 80 RPs humaines sur la structure du nucléole et l'activation de p53. Ces travaux montrent que la déplétion de la majorité des RPs n'a pas d'impact sur le maintien de la structure nucléolaire et dans le contrôle du taux de p53. Les RPs dont l'inhibition de l'expression entraîne une disruption du nucléole appartiennent quasiment toutes à la grande sous-unité ribosomique 60S. Parmi celles-ci, la déplétion de *RPL11* et *RPL5* est particulière puisqu'elle conduit aux défauts structuraux du nucléole les plus sévères, sans induire la stabilisation de p53. De ce fait, les protéines RPL5 et RPL11 apparaissent comme les plus importants contributeurs de l'intégrité de la structure nucléolaire (Nicolas et al., 2016). Par ailleurs, ces travaux ont identifié 21 RPs dont l'inhibition entraîne une augmentation de la protéine p53 sans affecter la structure nucléolaire (Nicolas et al., 2016). Ceci est en accord avec une observation précédente selon laquelle l'inhibition de *RPS6*, *RPL7A*, *RPS7* ou *RPL23* n'entraîne pas de perturbation de la structure du nucléole, mais induit l'activation de p53 (Fumagalli et al., 2009, 2012). Il semble donc que la perturbation du nucléole ne soit pas un prérequis à l'activation d'un stress ribosomique conduisant à l'activation de p53.

Ces dernières années, de nombreuses évidences tendent vers la notion qu'une multitude de protéines ribosomiques sont impliquées dans des mécanismes de régulation de l'axe MDM2-p53 conduisant à la stabilisation de p53 (pour revues, (Wang et al., 2015; Xu et al., 2016)). D'une part, plusieurs RPs sont remarquables pour leur capacité à interagir directement avec MDM2. Cela a été notamment rapporté pour les protéines ribosomiques

RPS3, RPS7, RPS14, RPS15, RPS20, RPS25, RPS26, RPS27, RPS27L, RPS27A, RPL6, RPL23, RPL26, et RPL37. Par leur liaison à MDM2, ce groupe de RPs empêche la formation du complexe MDM2-p53, ce qui conduit à l'inhibition de l'ubiquitination de p53 ainsi que la stabilisation de ce dernier (Xu et al., 2016). D'autre part, certaines RPs agissent comme des activateurs indirects de p53. C'est le cas par exemple de RPS9, RPS19, RPS23, RPL7A, RPL24, RPL30, et RPS6 dont le mécanisme a déjà été évoqué précédemment. Ces protéines ne lient pas directement MDM2 mais favorisent l'interaction de MDM2 à RPL11 et RPL5 pour aboutir à l'activation de p53. L'inhibition de l'expression de chacune de ces RPs contribue à atténuer l'activation de p53. Finalement, ces récentes découvertes suggèrent l'existence d'une voie de réponse au stress ribosomique impliquant un mécanisme général RP-MDM2-p53. Cet axe RP-MDM2-p53 est sujet à des régulations complexes permettant de s'adapter à la nature du stress et induire une réponse physiologique appropriée dépendante de l'activation de p53. En ce sens, la voie RP-MDM2 apparaît comme un réseau de surveillance de l'intégrité de la biogenèse des ribosomes (Wang et al., 2015).

Par ailleurs, des données soulignent la complexité de la régulation réciproque entre p53, MDM2, et les protéines ribosomiques. En effet, il a été rapporté la protéine RPS3 pouvait lier p53 et MDM2. La liaison de RPS3 à p53 protège ce dernier de l'ubiquitination induite par MDM2, *in vitro* (Yadavilli et al., 2009). Un autre exemple concerne la protéine RPL26. D'une part, RPL26 est capable de lier l'ARNm de p53 pour augmenter sa traduction, et d'autre part MDM2 peut interagir avec RPL26 ce qui promeut son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ces deux mécanismes contribuent à maintenir une faible expression de p53 en conditions physiologiques. En réponse à un stress génotoxique, l'effet inhibiteur de MDM2 sur RPL26 et ce qui conduit à une augmentation de la synthèse protéique de p53 (Ofir-Rosenfeld et al., 2008).

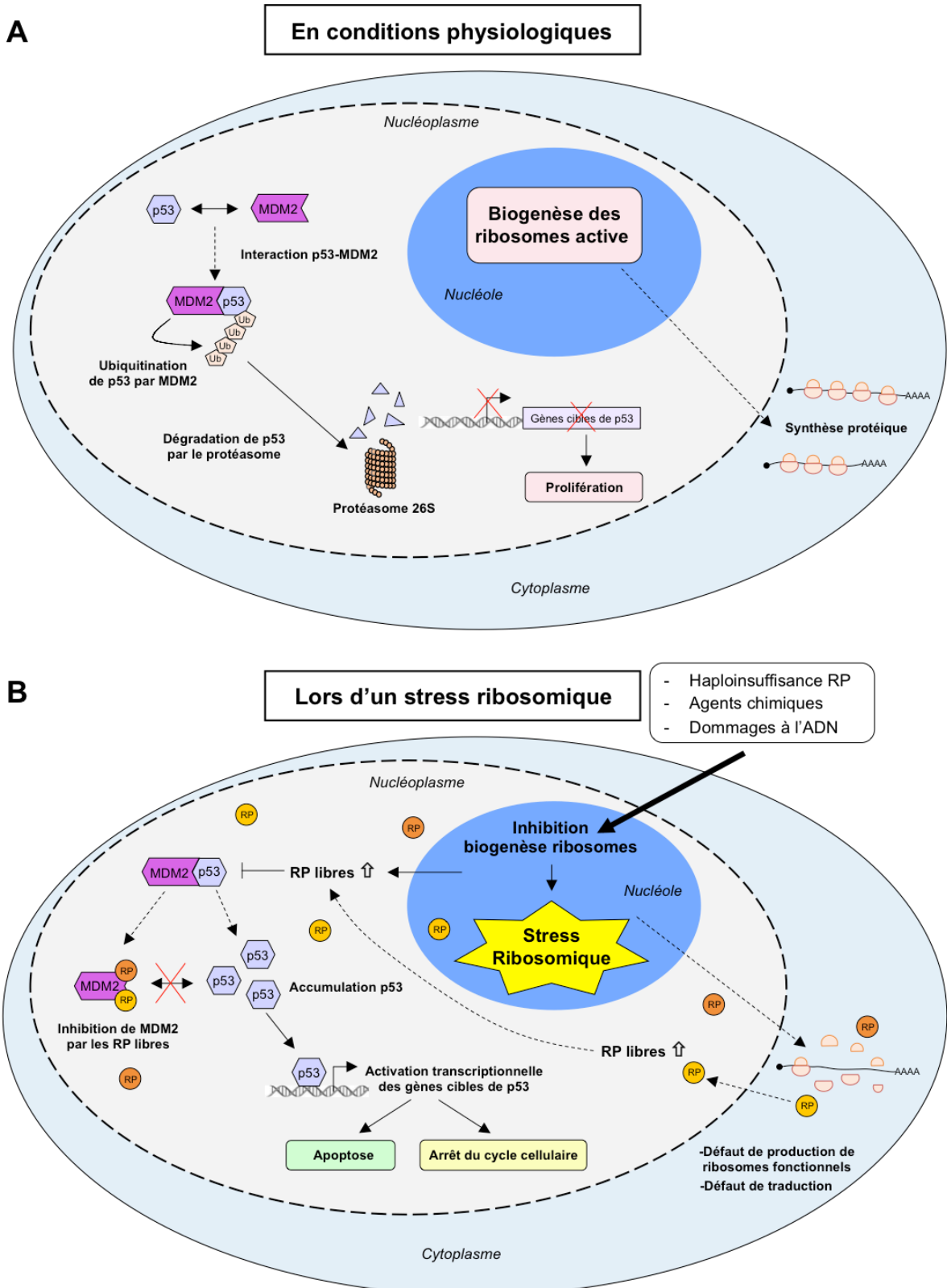


Figure 27 : L'axe de régulation RP-MDM2-p53 en réponse à un stress ribosomique.

En conditions physiologiques, la protéine p53 n'est que très faiblement exprimée en raison de l'activité continue de son régulateur négatif, MDM2. MDM2 est une E3 ubiquitine ligase qui interagit avec p53 dans le nucléoplasme. L'ubiquitination de p53 par MDM2 entraîne sa dégradation par le protéasome 26S. Le stress ribosomique est la conséquence de l'inhibition d'au moins une des étapes de la biogenèse des ribosomes. Cette altération peut avoir plusieurs origines, incluant la mutation d'un

gène codant une RP ou le traitement des cellules par des agents chimiques. À la suite d'un stress ribosomique, l'équilibre des composants ribosomiques peut être menacé en faveur d'une augmentation de la quantité de RP libres, non incorporées aux ribosomes. Certaines de ces RPs libres sont rapportées pour leur capacité à lier MDM2. La formation des complexes RP-MDM2 interfère avec la liaison de MDM2 à p53. En conséquence, la protéine p53 s'accumule et active la transcription de ses gènes cibles afin d'induire l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. D'après (Fumagalli et al., 2009).

– L'activation de p53 indépendamment des RPs

Par ailleurs, un stress ribosomique peut conduire à l'activation de p53 par des mécanismes indépendants des protéines ribosomiques. À l'instar des RPs, MDM2 possède de nombreux partenaires protéiques capables d'interagir avec lui (James et al., 2014). Parmi les plus connus, la protéine p14ARF interfère avec la formation du complexe MDM2-p53, agissant ainsi comme un activateur et stabilisateur de p53. En conditions normales, p14ARF est majoritairement séquestré dans le nucléole à la suite de la formation d'un complexe avec la protéine nucléolaire NPM1. Il est également intéressant de noter que p14ARF est un répresseur de la biogenèse des ribosomes. Par sa liaison avec NPM1 dans le nucléole, p14ARF inhibe la maturation des précurseurs ARNr. De plus, il a été montré que p14ARF réprime la transcription de l'ADNr en se liant au promoteur de l'ADNr et inhibant la phosphorylation activatrice de UBF, le cofacteur de l'ARN pol I (Ayrault et al., 2006). Des travaux suggèrent qu'à la suite d'un stress génotoxique, l'expression de ARF est augmentée et le complexe p14ARF-NPM1 se dissocie. En conséquence, ces deux facteurs sont libérés dans le nucléoplasme où p14ARF peut interagir avec MDM2, conduisant à la dissociation du complexe MDM2-p53 (Kruse and Gu, 2009).

Il existe d'autres mécanismes régulant le complexe MDM2-p53 que ceux détaillés ci-dessus mais qui sont moins documentés. En effet, MDM2 et p53 peuvent directement subir des modifications post-traductionnelles induites par différents types de stress (Riley and Lozano, 2012). Par exemple, à la suite d'un stress génotoxique, il a été rapporté que la kinase ATM pouvait induire la phosphorylation MDM2 sur le résidu sérine 395, inhibant l'export de p53 vers le cytoplasme, ce qui favoriserait la stabilisation de ce dernier (Maya et al., 2001).

En définitive, il existe de nombreuses voies conduisant à l'activation ou la stabilisation de p53 en réponse à une altération de la biogenèse des ribosomes. Il n'est pas exclu que certaines de ces voies soient concomitantes et agissent en parallèle pour induire l'activité de

p53. De plus, la contribution de chacun de ces mécanismes peut varier en fonction du type cellulaire et de la nature de l'altération à l'origine du défaut de la biogenèse des ribosomes.

d. Activation de la voie de signalisation p53 dans les modèles de ribosomopathie

L'étude des ribosomopathies telles que l'ABD ou le syndrome 5q- nécessite le développement de modèles animaux et cellulaires *in vivo* et *in vitro* pour contrer les difficultés d'isolement et de culture des cellules de patients. Il existe des modèles de souris et de poisson-zèbre présentant une haploinsuffisance du gène *RPS19* ou une haploinsuffisance du gène *RPS14*, mais ces derniers échouent à mimer tous les aspects des pathologies humaines. Des modèles de lignées cellulaires ainsi que de cellules primaires humaines invalidés pour les gènes *RPS19* et *RPS14* ont également été développés.

Dans ces modèles de ribosomopathies, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation p53 est en partie responsable du phénotype d'atteinte hématopoïétique. En effet, des modèles d'inactivation partielle, par stratégie *shARN*, des gènes codant pour les protéines ribosomiques *RPS19* ou *RPS14* conduisent à une accumulation de la protéine p53 spécifiquement dans les progéniteurs primaires de lignée érythroïde, contrairement aux progéniteurs primaires myéloïdes (Dutt et al., 2011). Cette accumulation de p53 est associée à l'augmentation de la transcription de ses gènes cibles, dont le gène *p21* (ou *CDKN1A*), et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 des progéniteurs érythroïdes (Dutt et al., 2011). Ces résultats sont confirmés dans plusieurs modèles animaux. En effet, chez le poisson-zèbre, l'inactivation de la protéine *RPS19* (Danilova et al., 2008) ou de la protéine *RPS14* (Ear et al., 2016) entraîne une érythropoïèse inefficace dépendante de l'activation de p53. De plus, le développement d'un modèle murin partiellement invalidé pour la protéine *RPS14* dans les CSH, est caractérisé par une apoptose massive des précurseurs érythroïdes. L'anémie sévère ainsi observée chez ces souris *in vivo* est dépendante de l'activation de la protéine p53 (Schneider et al., 2016). Par ailleurs, l'activation de p53 a également été confirmée dans des CSH primaires issues de patients d'ABD présentant une mutation du gène *RPL11* ou du gène *RPS19* (Moniz et al., 2012). La différenciation érythroïde de ces cellules de patients a été suivie *in vitro*, et les résultats mettent en évidence une diminution de la prolifération des progéniteurs érythroïdes et l'apoptose des précurseurs érythroïdes. Il est intéressant de noter que ces caractéristiques sont beaucoup plus marquées chez les patients présentant une

mutation du gène *RPL11* par rapport à la mutation du gène *RPS19* (Moniz et al., 2012). Ces deux phénotypes ont été reproduits suite à l'inactivation partielle de *RPS19* ou *RPL11* dans cellules primaires érythroïdes issues de sang de cordon ombilical, par stratégie shARN. De façon remarquable, l'inhibition de p53 concomitante à des contextes d'haploinsuffisance de *RPS19* ou *RPS14* permet d'améliorer le phénotype érythroïde (Barlow et al., 2010; Caceres et al., 2013; Danilova et al., 2008).

Finalement, l'ensemble de ces modèles convergent vers l'implication de la voie de signalisation p53 dans la physiopathologie des ribosomopathies de l'ABD et du syndrome 5q-. L'activation de cette voie semble être un déterminant majeur du défaut de l'érythropoïèse observé dans ces ribosomopathies. En effet, les conséquences de l'activation aberrante de p53 sont l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des précurseurs érythroïdes. Cependant, les mécanismes en amont de l'activation de p53 dans ces modèles ne sont pas encore bien déterminés, et les conséquences cellulaires semblent être différentes en fonction de l'atteinte génétique et du niveau d'activation de p53.

2. La régulation du cycle cellulaire indépendamment de p53

L'activation de p53 joue donc un rôle majeur l'induction d'un l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un stress ribosomique. Cependant, plusieurs travaux indiquent que l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'inhibition de la biogenèse des ribosomes peut également être observé dans des modèles cellulaires invalidés pour p53 (Donati et al., 2011). Ces données suggèrent que des mécanismes indépendants de p53 peuvent aussi contrôler le cycle cellulaire en fonction du niveau de la biogenèse des ribosomes.

a. La régulation de E2F-1 par MDM2

Le facteur de transcription E2F-1 régule l'expression des gènes impliqués dans l'entrée et la progression des cellules en phase S. À l'instar de p53, MDM2 est capable d'interagir avec des facteurs protéiques variés, dont E2F-1 fait partie (voir **figure 28**). Cependant, contrairement à p53, la liaison de MDM2 à E2F-1 stabilise ce dernier par la prévention de son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Zhang et al., 2005).

Lors d'un stress ribosomique, les RPs libres en excès forment des complexes avec MDM2, ce qui diminue la disponibilité de MDM2 pour E2F-1. En conséquence, E2F-1 n'est plus protégé de l'ubiquitination et son niveau protéique est réduit (Donati et al., 2011). Ainsi, la réduction de l'expression de E2F-1 entraîne une diminution de l'expression de ses gènes cibles nécessaires à la progression du cycle cellulaire.

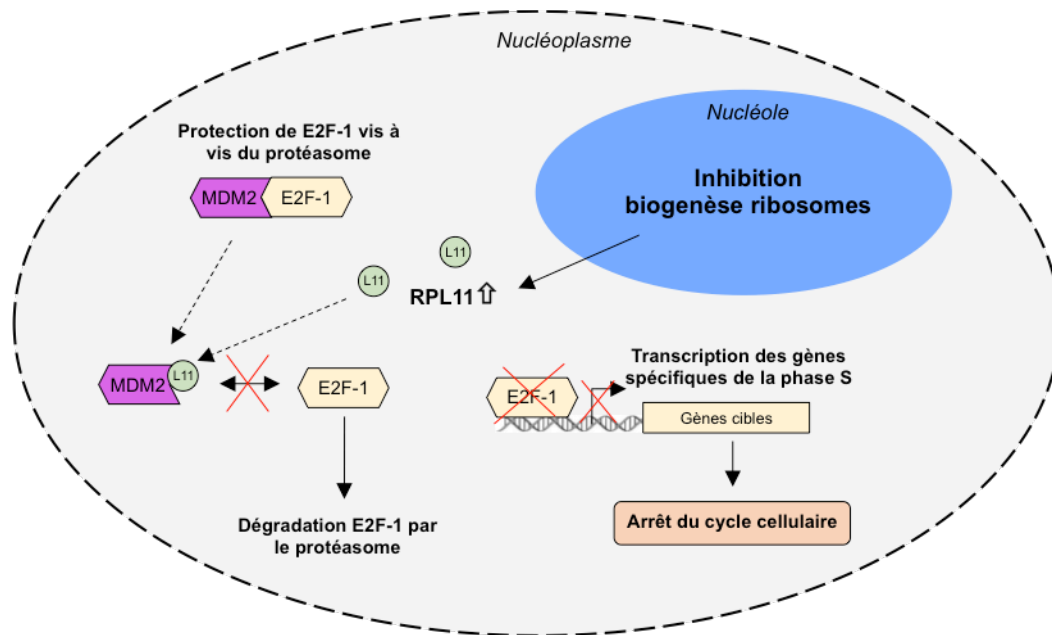


Figure 28 : Mécanisme de régulation du cycle cellulaire indépendant de p53.

MDM2 possède une diversité de partenaires protéiques, dont E2F-1. À l'inverse de p53, la liaison de MDM2 au facteur de transcription E2F-1 protège ce dernier de la dégradation par le protéasome. De ce fait, l'augmentation de la quantité de RP libres, dont RPL11, suite à l'inhibition de la biogenèse des ribosomes, interfère à la formation du complexe MDM2-E2F-1. Ainsi, E2F-1 perd sa protection et est dégradé. La réduction d'expression de E2F-1 est enfin responsable d'un arrêt de la progression du cycle cellulaire.

b. La régulation de *c-Myc* par les RPs

Le facteur de transcription *c-Myc* est un activateur global de la synthèse protéique et de la biogenèse des ribosomes, puisqu'il contrôle à la fois les ARN polymérase I, II et III. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de certaines RPs dans la régulation de *c-Myc*. Par exemple, il a été montré que la protéine ribosomique RPL11 était capable de lier la protéine *c-Myc* à son extrémité 3'UTR. Cette liaison empêche le recrutement de TRAPP, le co-activateur transcriptionnel de *c-Myc*, au niveau des régions promotrices des gènes cibles de ce dernier (Dai et al., 2007, 2010). Ainsi, la transcription des gènes cibles de *c-Myc*, incluant E2F-2, est réduite, ce qui contribue à l'arrêt du cycle cellulaire. D'autre part, il semblerait que

RPS14 puisse contrôler c-Myc par un mécanisme similaire. La déplétion de *RPS14* entraîne une augmentation du niveau de c-Myc ainsi que de ces gènes cibles, confirmant la relation de régulation entre ces deux facteurs (Zhou et al., 2013). Ces travaux suggèrent que les RPs libres sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire médiée par *c-Myc* à la suite d'un stress ribosomique.

Pour conclure sur cette partie, les mécanismes de réponse à un stress ribosomique sont complexes et variés mais impliquent majoritairement l'activation de la protéine p53 afin d'induire l'arrêt du cycle ou l'apoptose. Des modèles pathologiques d'un défaut de la biogenèse des ribosomes ont servi de support à la validation de ces mécanismes. Toutefois, une modulation de la biogenèse des ribosomes peut également survenir dans des conditions physiologiques, en particulier lors de la réduction de taille des cellules, et dans ce cas les conséquences moléculaires ne sont pas connues. Cette exploration a fait l'objet de mes travaux de thèse.

Résultats

Partie I : Cinétique de la biogenèse des ribosomes et régulation de la différenciation érythroïde normale

I. Problématique

La différenciation érythroïde terminale normale est caractérisée par une diminution de la taille des cellules et une diminution progressive de la traduction protéique. Au regard de la littérature et des travaux portant sur le rôle de la biogenèse des ribosomes sur la croissance des organismes de la levure à l'Homme (pour revue, (Lempiäinen and Shore, 2009)), un rôle régulateur de la différenciation érythroïde par la biogenèse du ribosome peut être proposé. En ce sens, la concordance entre la réduction de taille des érythroblastes, la cinétique de biogenèse des ribosomes et la concentration cellulaire en ribosomes mérite d'être précisée au cours de l'érythropoïèse normale. Cette étude doit être considérée comme une porte d'entrée à une meilleure compréhension de l'érythropoïèse inefficace des ribosomopathies.

Au cours de ces travaux de thèse, j'ai abordé les questions suivantes :

- Quelle est l'évolution de la biogenèse du ribosome au cours de la maturation érythroblastes normaux ?

- Les ribosomes conservent-ils une homogénéité de composition au cours de la différenciation érythroïde ou subissent-ils une spécialisation ? Une spécialisation des ribosomes a été démontrée au cours du développement embryonnaire (Kondrashov et al., 2011) ou dans le développement musculaire (Chaillou et al., 2015).

- Selon les travaux de Gautier et al, dans l'équipe, la quantité absolue de protéines ribosomiques diminue au cours de l'érythropoïèse terminale. S'agit-il d'un arrêt de la biosynthèse, et/ou d'une dégradation protéique ?

- Quel serait le mécanisme d'un arrêt de biosynthèse des ribosomes et, en particulier, ce mécanisme implique-t-il la transcription dépendante de l'ARN polymérase I dans le nucléole ?

- Si un stress ribosomique physiologique intervient au cours de la maturation terminale des érythroblastes, a-t-il pour conséquence, comme l'haploinsuffisance d'un gène ribosomique, une activation de p53 et quel en serait le mécanisme ?

II. Objectifs

Les objectifs des travaux de thèse ont été, d'une part, de caractériser la cinétique de biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse normale. L'approche expérimentale en protéomique a comporté une analyse dynamique du taux de renouvellement de chaque RP par Pulse Silac et une quantification absolue des RP normalisée par rapport à l'expression des histones. Ces travaux ont permis d'établir que le renouvellement des protéines ribosomiques s'arrête au stade des érythroblastes basophiles tardifs, ou baso 2.

D'autre part, la modélisation d'un arrêt précoce de la biogenèse des ribosomes dans les érythroblastes normaux fut entreprise afin de rechercher un rôle des ribosomes dans la régulation de la différenciation érythroïde terminale. Pour cela, j'ai inhibé sélectivement l'ARN polymérase I par le CX-5461 (Drygin et al., 2011). Cette molécule est étudiée extensivement dans des modèles de lymphome ou de leucémie aiguë myéloïde (Bywater et al., 2012; Hein et al., 2017). Dans ces modèles cellulaires pathologiques, la transcription de l'ARN ribosomique est accrue, et l'inhibition de ce processus par le CX-5461 les rend particulièrement sensibles à l'apoptose.

Enfin, le dernier objectif consistait à l'exploration des causes et conséquences de l'arrêt de biogenèse induit par CX-5461 et notamment l'implication de la protéine p53, en comparaison avec la différenciation des érythroblastes induite par l'érythropoïétine.

III. Résultats :

Ribosome biogenesis regulates erythroid terminal differentiation

Salomé Le Goff,^{1,2} Ismael Boussaid,^{1,2} Celia Floquet,^{1,2} Anna Raimbault,^{1,2} Isabelle Hatin,³ Boris Guyot,⁴ Charlotte Andrieu-Soler,⁵ Diane d'Allard,^{1,2} Marie-Françoise O'Donohue,⁶ Marjorie Leduc,^{1,7} François Guillonneau,^{1,7} Emilie-Fleur Gautier,^{1,7} Elisabeth Cramer-Bordé,¹ François Morlé,⁴ Olivier Hermine,^{2,8} Naomi Taylor,⁵ Narla Mohandas,⁹ Pierre-Emmanuel Gleizes,⁶ Eric Soler,⁵ Patrick Mayeux,^{1,2,7} Michaela Fontenay^{1,2,10}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 8104, Institut Cochin, 75014 Paris, France.

² Université de Paris - Faculté de Santé, 75006 Paris, France.

³ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Centre de l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

⁴ CNRS UMR 5534 Centre de Génétique et Physiologie moléculaire et cellulaire, Université Lyon 1, 69100 Lyon, France.

⁵ Institut de Génétique Moléculaire Montpellier, IGMM, CNRS, Université de Montpellier, 34000 Montpellier, France.

⁶ CNRS UMR 5099, Laboratoire de biologie moléculaire des eucaryotes, Université Toulouse III Paul Sabatier, 31400 Toulouse, France.

⁷ Plateforme de protéomique 3P5, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France.

⁸ INSERM U1163, CNRS ERL8654, Imagine Institute, 75015 Paris, France.

⁹ Red Cell Physiology Laboratory, New York Blood Center, 10065 New York, NY, USA.

¹⁰ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'Hématologie Biologique, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, 75014 Paris, France.

Introduction

Erythropoiesis originates from the commitment of hematopoietic stem cells (HSC) to erythroid progenitors. The terminal differentiation starts with the appearance of immature precursors *ie.* proerythroblasts (proE) that divide to give rise to early basophilic erythroblasts (baso 1), then to late basophilic erythroblasts (baso 2). The next two rapid divisions phase produce mature precursors *ie.* polychromatic (polyE) and orthochromatic erythroblasts (orthoE) with a dramatic reduction in cell size and surface marker changes at each step (Dolznic et al., 2004; Lodish et al., 2010; Hu et al., 2013). The transition between proliferation and differentiation depends on the evolutionary capacities of cells to respond to cytokines and growth factors. Stem cell factor (SCF) sustains renewal of progenitors and immature precursors while the extinction of SCF receptor, c-Kit, from basoE is required for differentiation upon erythropoietin (EPO). Morphological changes are mediated by transcriptome reprogramming (Hattangadi et al., 2005; Kerényi et al., 2010; An et al., 2014) mainly involving the transcriptional activation or repression of GATA1 target genes (Welch et al., 2004; Munugalavala et al., 2005).

Ribosome biogenesis is a complex process leading to the formation of 40S and 60S mature ribosome subunits. In eukaryote nucleolus, rDNA is transcribed by RNA polymerase I into a 45S precursor and subsequently mature rRNAs *via* a series of endonucleolytic and exonucleolytic reactions. Assembly of 18S rRNA and 33 ribosomal protein (RP) of the small subunit (RPS) constitutes the pre-40S while 28S, 5.8S, 5S rRNAs and 47 RP of the large subunit (RPL) form the pre-60S, both being exported to the cytoplasm where ribosome assembly occurs (Fromont-Racine et al., 2003; Henras et al., 2015). In normal reticulocytes, the cellular ribosome concentration has been predicted to lead the effects of mRNA amount and translation initiation rate on protein synthesis (Lodish, 1974). In macrocytic anemias, like

congenital Diamond–Blackfan anemia (DBA) or acquired 5q- syndrome which are caused by point mutations or deletions in RP genes, ribosome pools are diminished in erythroid cells and this accounts for a pathological translation selectivity (Draptchinskaia et al., 1999; Cmejla et al., 2008; Gazda et al., 2008; Ebert et al., 2008; Khajuria et al., 2018). In these situations, impairment of ribosome biogenesis causes p53 stabilization and activation driving erythroid cell cycle arrest and apoptosis of erythroblasts (Moniz et al., 2012; Dutt et al., 2011). This implicates a causal link between ribosome biogenesis and erythroid cell differentiation.

In the present study we investigated the kinetic of ribosome biogenesis in normal human and murine erythroid cell maturation and documented that ribosome biogenesis collapses beyond late basophilic erythroblast stage. Importantly, premature inhibition of ribosome biogenesis by RNA polymerase I inhibitor CX-5461 led to accelerated differentiation. Evidence for rDNA damage response and p53 activation in mature erythroblasts enables to establish an important role for ribosome biogenesis in the control of erythroid differentiation.

Material and methods

Human and murine erythroblasts culture

Human CD34⁺ progenitors were purified from cytopheresis or cord blood units on MidiMacs system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and cultured in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM; Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 15% serum substitute (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), interleukin (IL)-3 (1UI/mL) and 1µM dexamethasone. Then, cells were cultured with 100ng/mL SCF, 10 ng/mL IL-6 and 1 UI/mL IL-3 for 7 days, SCF and EPO for 4 days, and thereafter with EPO. In some experiments, erythroblasts were incubated with 50 nM CX-5461, or 1 µM ATR inhibitor (VE-

821) (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Extensively Self-Renewing Erythroblasts (ESREs) were obtained from mice fetal livers and cultured at 2×10^6 cells/mL in a gelatin-coated 24-well plate in StemPro34 with nutrient supplement (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 2UI/mL rEPO (Roche, Basel, Switzerland), 100 ng/mL mouse rSCF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 40ng/mL human insulin-like growth factor-1 (Peprotech), and 2 μ M dexamethasone as described (England et al., 2011). Erythroid differentiation was induced in IMDM containing 5% FCS, 10% Knock-OutTM serum replacement (Life Technologies), 10% protein-free hybridoma medium, 2UI/mL rEPO, 100 ng/mL SCF and 150 μ M 1-thioglycerol. Erythroid differentiation was assessed by the cytological examination of May-Grünwald-Giemsa-stained cytopins.

RT-qPCR and microarrays

RNA was extracted using the QIAamp RNA Blood kit (Qiagen), treated with DNase I, and retrotranscribed into cDNA. qPCR was performed using SYBR Green I master mix on LC480 (Roche). Primer sequences are provided in **Table S1**. Results were expressed as normalized relative quantity (NRQ) to reference genes *B2M*, *UBC* and *ACTB*. Gene expression of human erythroblasts treated or not with CX-5461 was determined using HTA 2.0 microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). RMA normalization was realized on CEL raw files using R and the Entrezgene cdf file V19 (Brainarray) for annotation of HTA2.0 array. Normalized data were then subjected to statistical tests using Partek Genomics suite. Non-supervised clustering (principal component analysis and hierarchical clustering) were performed to identify eventual outlier samples. Differentially expressed genes were investigated by applying Anova 2-ways test to the normalized matrix. A geneset with expression ratio treatment/control > 1.2 was used for supervised analyses.

Flow cytometry

Human erythroblasts were identified using fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled CD71, phycoerythrin (PE) or PE-Cyanine (PC)7-coupled glycophorin A (GlyA), PC5-coupled CD117, allophycocyanin (APC)-coupled CD49d antibodies (Beckman Coulter, Miami, FL). PC7-GlyA (Beckman Coulter) and PE-Band3 antibodies (International Blood Group Reference Laboratory, Bristol, UK) were used for cell sorting. For murine cells, we used APC-CD117 and PE-CD71. Apoptosis was measured using PE-coupled annexin V (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Cell size was quantified using the forward scatter (FSC). Data were generated on a Canto II or LSRFortessa apparatus (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo (TreeStar, Ashland, OR) or Kaluza software (Beckman Coulter).

Fluorescence in situ hybridization

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized in 70% ethanol. Hybridization was performed at 37°C for ≥ 5 h in 10% formamide, $2.1 \times$ SSC, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tRNA, 10% dextran sulfate, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, 10 mM ribonucleoside vanadyl complexes, and 0.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ of 5'ETS probe conjugated to Alexa 647 (5'AGACGAGAACGCCTGACACGCACGGCAC3') (O'Donohue et al., 2010). Images were obtained using a confocal fluorescence microscope (Spinning Disk, Leica) and analyzed with Image J.

Ribosomal subunit profiles and rRNA quantification

Erythroblasts (10^7) were harvested and mechanically disrupted in 50mM Tris-HCl [pH7.5], 50mM NaCl containing 1mM dithiothreitol (DTT). For ribosome purification, lysates were loaded onto 11.4 mL of 15 to 50% linear sucrose gradient and centrifuged at 39,000 rpm in a Beckman SW41Ti rotor at 4°C for 3h. Gradient analyses were performed at $A_{260\text{nm}}$ with an absorbance detector (Teledyne Isco, Lincoln, NE). RNA was quantified at $OD_{260\text{nm}}$ on a

Nanodrop apparatus (Thermo Fischer Scientific) and results were expressed as OD_{260nm} value *per* million cells.

Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and riboproteomics

Metabolic labeling of erythroblasts was carried out in IMDM minus L-lysine and L-arginine supplemented with 0.2 mg/mL ¹³C₆ L-arginine-HCl, 0.2 mg/mL ¹³C₆, ¹⁵N₂ L-Lysine-2HCl (Pierce, Rockford, IL), 80 µg/mL proline and 15% BIT during 24h for human primary erythroblasts and 14h for murine ESRE. In some experiments, cells were pre-incubated with 50 nM CX-5461 for 24h before the pulse. Ribosomes were pelleted by ultracentrifugation, and denatured in 50 mM triethylammonium bicarbonate containing 0.5% Rapigest SF (Waters, Milford, MA) and 5 mM DTT for 30 min at 60°C. Then, 10 mM chloroacetamid were added to alkylate thiols for 30 min at room temperature in the dark. Digestions were performed at 37°C with endoproteinase rLys-C (V1671, Promega) for 2h and overnight with trypsin (V5280, Promega). After acidic Rapigest hydrolysis, peptides were desalted, dried, solubilized in 2% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and separated on a C18 reverse phase resin with a 1-hour gradient starting in 100% of solution A containing 0.1% formic acid in H₂O and ending in 40% of solution B containing 80% acetonitrile, 0.085% formic acid in H₂O. Mass spectrometry was performed using an Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) system coupled to a hybrid LTQ Velos-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Data were analyzed using Maxquant version 1.3 with Uniprot-Swissprot database (release 2015-02). False discovery rate (FDR) was kept below 1% on peptides and proteins. SILAC heavy/light (H/L) ratios corresponding to newly synthesized to pre-existing protein were calculated for each RP.

Absolute quantification of ribosomal and erythroid-specific proteins

Label-free protein quantification was performed as described (Gautier et al., 2016). Mass spectrometry data were processed by MaxQuant version 1.5.2.8 (Cox et al., 2014) using human sequences from the Uniprot-Swiss-prot database with a false discovery rate below 1% for both peptides and proteins. Results from MaxQuant were imported into Perseus software (version 1.5.1.6). Protein copy numbers per cell were then calculated using the Protein ruler plugin of Perseus by standardization to the total histone MS signal (Wisniewski et al., 2014). Results are expressed as median copy number of 4 independent experiments.

Immunofluorescent labelling

Immunofluorescence labelling was performed with p53, NPM1, fibrillarin, UBF, DDX21 antibodies (**Table S2**). Briefly, cells were fixed for 20 min in 2% paraformaldehyde, permeabilized for 5min with 0.5% Triton X100 in PBS (pH 7.4), and saturated for 30min in saline sodium citrate solution containing 3% BSA, 0.1% Tween-20. Then, cells were incubated with specific primary antibodies for 1h at room temperature, and after wash, with a secondary fluorochrome-coupled antibody for 45 min. Cells were dehydrated in ethanol and dried. Nuclei were stained with diaminido phenyl indol (DAPI; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI). Slides were sealed in Fluoromount-G medium (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Images were obtained on a Leica DMI6000 inverted microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with spinning disk (Yokogawa, Tokyo, JP) and analyzed with Image J or 3D Imaris (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, UK).

Transmission electron microscopy

Cells were fixed for 1h in 3% glutaraldehyde with 0.1 M phosphate buffer (pH7.2), rinsed 3 times, post-fixed for 1.5h with 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol, and

impregnated with epoxy resin. After polymerization, 80- to 90-nm sections were prepared using a Reichert Ultracut S ultramicrotome, stained with 2% uranyl acetate plus Reynold's lead citrate, and visualized under a JEOL1011 transmission electron microscope (JEOL, Inc., Peabody, MA) with a GATAN Erlangshen CCD camera (Gatan, Inc., Pleasanton, CA).

ChIP-sequencing

130.10⁶ cells of human primary erythroblasts treated with 50nM CX-5461 or with control (Na₂HPO₄) were cross-linked for 10 min with 1% formaldehyde (Thermo Fisher Scientific) in 10 mL of medium, at room temperature. Fixation was stopped by addition of 125 mM Glycin (Sigma-Aldrich), for 5 min. Cells were washed twice with cold PBS (8 min, 1300 rpm). Cell lysis was performed in 10 mM Tris pH8, 10 mM NaCl, 0.2 % Nonidet P40 and protease inhibitors, 10 min at 4°C. After centrifugation for 5 min at 1800 rpm, chromatin were re-suspended in 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA and protease inhibitors at a final concentration of 2.10⁷ cells per mL. Chromatin was sheared by cold sonication (12 cycles of 30s ON and 30s OFF pulses) to obtain an average fragment size of 200 bp. For quality control, an aliquot of sheared chromatin was de-crosslinked, de-proteinized and migrated on 1 % agarose gel. Cellular debris was removed by centrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C). Supernatant were collected in non-stick tubes and 1:10 diluted in ChIP dilution buffer containing protease inhibitors and magnetic protein A rabbit beads. An aliquot of 50 µL was conserved as input. Samples were incubated 30 min at 4°C for pre-cleaning. Beads were then removed and chromatin was incubated with 10 µg of rabbit anti-p53 polyclonal antibody or rabbit normal IgG at 4°C. After over-night incubation, beads previously saturated with blocking solution (10 mg/mL salmon sperm DNA, 25% fish skin gelatin in H₂O) were added to immunoprecipitates during 1h at 4°C, and then successively washed out twice at 4°C with 1 mL of each following buffer: low salt immune complex wash buffer and high salt

immune complex wash buffer (3 min), LiCl and TE buffer (5 min). Immunoprecipitated DNA was eluted twice with 250 μ L of elution buffer (0.1 M NaHCO₃ and 1% SDS in H₂O) during 15 min at room temperature. Samples and input were decrosslinked and de-proteinized by adding 20 μ L of 5 M NaCl (4h, 950 rpm, 65°C) then by adding 10 μ L of 0.5 M EDTA, 20 μ L 1 M Tris-HCl at pH6.5 and 4 μ L of 10 mg/mL proteinase K (1h at 45°C). DNA was purified with 550 μ L of phenol–chloroform–isoamylalcohol and centrifuged (15 min, 13000 rpm, 4°C). The aqueous phase was recovered in non-stick tubes and mixed with 1.5 μ L glycogen (20 mg/mL) and 440 μ L ice-cold isopropanol over-night at 20°C for DNA precipitation. Then, DNA was recovered (15 min, 1300 rpm) and washed with 500 μ L of 70% ethanol. DNA pellet was finally re-suspended in 40 μ L H₂O for high throughput sequencing on Illumina platform.

Short hairpin (sh)RNA and cell transduction

pH1-shRNAp53 cloned in pRRL-PGK-GFP lentiviral vector and control sh scramble (SCR) were kindly provided by Dr I Plo (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) and used for transduction, as previously described (Ali et al., 2013). Briefly, CD34⁺ cells were cultured for 7 days and infected two times with 2 μ l of lentiviral supernatant with an interval of 12h (day 0). Forty-eight hours after the second infection, GFP expression analyzed by flow cytometry was > 95%. Cells were maintained in the presence of SCF and EPO during the induction of erythroid differentiation.

Western blot

Cells were lysed in 0.2% Nonidet P-40, 20 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, sodium orthovanadate, protease inhibitors and DTT. Immunoblotting was performed using specific antibodies followed by secondary antibodies conjugated to

horseradish peroxidase (**Table S2**). Chemiluminescence was detected using a CCD camera (LAS-3000, Fujifilm, Minato, Tokyo, JP) and quantified with MultiGauge V3.0 Fujifilm software.

Statistical analysis

For quantitative variables, values were expressed as means and standard error of the mean (SEM) and compared using the Student t-test. Correlations were tested using the Pearson test. *P*-values < 0.05 were considered significant (Prism 8.0, GraphPad, San Diego, CA).

Results

Variations in cellular ribosome content during human and murine erythroid differentiation

The fate of ribosome biogenesis was investigated during *in vitro* erythroblast differentiation. Primary human erythroblasts were expanded from the CD34⁺ progenitors isolated from cord blood as previously described (Frisan et al., 2012). Cells proliferated until day 19-21 while their size started to decrease from d13 concomitantly with the appearance of mature polychromatic (polyE) and orthochromatic erythroblasts (orthoE) (**Fig. 1A and Fig. 1B**). *In vitro* differentiation of murine erythroblasts was obtained by expanding extensively self-renewing erythroblasts (ESRE) deriving from murine fetal liver. ESRE entered terminal differentiation by removing dexamethasone from the culture medium (day 0). Within 3 days, the number of cells increased by up to 9-fold, cell size decreased from day 2, and the cells finally adopted the morphology of orthoE and expressed *hbb-b1* gene encoding β -globin (**Sup. Figs. 1A-C**). We first evaluated the cellular ribosome content in human and murine differentiating erythroblasts by measuring the quantities of RNA in the purified ribosomal fraction which is mainly composed of 28S and 18S rRNA. At day 16, RNA quantities

significantly decreased when mature erythroblasts accumulated and immature erythroblasts disappeared (**Fig. 1C and 1B**). The rRNA amount was positively correlated to the percentage of immature erythroblasts (Spearman's test; $r = 1$; $P < 0.0001$). In murine ESRE, rRNA quantities dropped off at day 2 after induction of maturation (**Sup Fig. 1D**). We measured the quantities of rRNA precursor 45S in human erythroblasts by RT-qPCR and found that it was significantly decreased at day 16 concomitantly with the increase of β -globin mRNA (*HBB*; **Fig. 1D**). Consistently, 45S rRNA revealed by FISH was no longer detected in the nucleus of orthoE at d19 suggesting that ribosome biogenesis stopped beyond the baso2 stage (**Fig. 1E**).

We then analyzed the expression level of ribosomal proteins in published proteomic and transcriptomic expression data obtained in human primary erythroblasts (Gautier et al., 2016; An et al., 2014). Absolute quantification of RPs using deep proteomics normalized to histone clearly indicated that the mean copy number per cell of RPS or RPL underwent a 3-fold decrease in baso2 compared to proE/baso1 and a 10-fold decrease in orthoE compared to proE/baso1 while the expression of the corresponding transcripts remained stable until baso2 and a 30% reduction between baso2 and polyE (**Fig. 1F and Fig. 1G**). The expression level of transcripts and proteins were not correlated in proliferating proE and baso1 while they were positively correlated ($p < 0.05$) at the stages of baso2, polyE and orthochromatic erythroblasts (**Fig. 1H**). Altogether, these results indicate that the ribosome content is lower in mature erythroblasts compared to immature erythroblasts.

Dynamic changes of ribosome biogenesis during human erythroblast differentiation

To investigate whether the changes in ribosome content are governed by variations in ribosome biogenesis, we next measured the dynamics of RP renewal using the pulsed SILAC method at different days of culture. After metabolic labeling with heavy arginine and lysine for 24h in human erythroblasts and 14h in murine ESREs, ribosomes were purified on sucrose

cushions and trypsin-digested peptides were analyzed by mass spectrometry (**Fig. 2A**). Only RPs identified with more than two peptides and more than 15% of sequence coverage were used for the quantification (**Sup. Fig 2A**). Pulsed SILAC allowed the quantification of 34 and 33 RPS and 43 and 46 RPL in human and murine cells, respectively (**Tables S3-4**). We assessed the proportion of RP renewal as the ratio of newly synthesized heavy (H) RP to the sum of heavy plus pre-existing light (L) RP $[(H/H+L)*100]$ in human erythroblasts. RP renewal was maximal (54%) at day 10 when 90% of erythroblasts were immature, started to decrease at day 16 and collapsed down to 11% at day 19 when the culture contained more than 70% of mature erythroblasts (**Fig. 2B**). RP renewal was very well correlated with the proportion of proE (Spearman's test; $r = 0.894$; $P = 0.038$). In murine ESRE, the proportion of RP renewal started to decrease at day 1 and sharply collapsed after 2 and 3 days post-induction of terminal differentiation (**Sup Fig. 2B**).

Individually, the renewal of each RPL or RPS decreased during the differentiation with the exception of few RPs like RPL24 and RPL10, which were more actively renewed than the others (**Fig. 2C**). To get a clearer picture of this observation, we quantified the rate of incorporation of each newly synthesized RP in the ribosome by normalizing the H/L ratio to the median of H/L ratios of all RPs in a given subunit. Representative heatmaps of human RPs demonstrate that the rate could be different depending on the protein, and, indeed, few proteins like RPL24, RPL10 and RPS30, RACK1 kept a high rate of renewal and incorporation into the ribosome along the differentiation (**Fig. 2D**). This property was conserved in murine ESRE (**Sup Fig. 2D**). Based on the order the RP incorporate into the ribosome according to the literature, our results suggest that the proteins with high rate of renewal could shuttle between the ribosome and the cytoplasm (**Table S5**).

The drop of ribosome quantities was concomitant to the decrease of SCF receptor, c-Kit/CD117 expression in human erythroblast cultures from day 16 and murine ESRE cultures

at day 2 (**Fig. 2E and Sup Fig. 2C**). We then hypothesized that the quantitative variations of ribosome biogenesis could be under the extrinsic control of SCF. To investigate this point, SILAC was performed in human immature erythroblasts (proE and baso1) incubated with EPO 1UI/mL, SCF 100ng/mL, or both cytokines. In these cells, the proportion of RP renewal was 50% with SCF and EPO but reduced by half when each cytokine was added separately, demonstrating a significant additive effect of SCF and EPO (Student t-test; $P < 0.01$). Ribosome renewal was less than 20% in the presence of masitinib (2 μ M), a potent inhibitor of c-Kit tyrosine kinase (**Fig. 2F**). We then compared ribosome renewal in sorted GlyA^{low/neg}/Band3⁻ and GlyA^{high}/Band3^{+neg} cells (**Fig. 2G**). Ribosome renewal was reduced in mature GlyA^{high}/Band3⁻ cells compared to immature GlyA^{low/neg}/Band3^{+neg} (**Fig. 2H**). This shows that SCF and EPO drive optimal ribosome biogenesis in immature erythroblasts.

Altogether, our results imply that the decrease of ribosome amount in mature erythroblasts is caused by the arrest of biogenesis during both human and murine erythroid differentiation.

Inhibition of ribosome biogenesis forces terminal differentiation of erythroblasts

Because proE disappearance coincided with the collapse of ribosome biogenesis, we wondered whether the inhibition of ribosome biogenesis was required for entering terminal erythroid cell maturation. To explore this hypothesis, we prematurely inhibited ribosome biogenesis in immature proE/baso1 erythroblasts using CX-5461, a specific RNA polymerase I inhibitor that prevents rDNA transcription (Bywater et al., 2012). CX-5461 (50 nM) decreased the expression of 45S rRNA precursor (**Fig. 3A**), the expression of RP mRNA was not affected (**Sup. Fig. 3A**). A 30% reduction of the incorporation of newly synthesized RP in the ribosome was observed after a 24h pulse for SILAC (**Fig. 3B**) and the renewal of RPs was specifically affected compared to non RP proteins (**Fig. 3C**). However, the ribosome profiling

was mostly unchanged after 48h of treatment (**Fig. 3D**) and consistently, the ratio of mean copy numbers per cell of each RP normalized to histone signal remained stable after 48h and even after 96h of treatment by CX-5461 (**Fig. 3E, Sup. Fig.3B**). Importantly, the amount of RP in the free ribonucleoprotein (RNP) complexes fraction expressed as a ratio of H+L intensities in CX-5461-treated conditions relative to untreated conditions, did not increase suggesting that the extinction of ribosome biogenesis was balanced and did not lead to an accumulation of free RPs (**Sup. Fig. 3C**).

Cell proliferation was significantly decreased in CX-5461-treated cells after 3 days while apoptosis affected more than 10% of cells after 4 days (**Fig. 3F and Fig. 3G**). Erythroid precursors prematurely achieved their final differentiation by increasing GlyA expression (Student t-test $P < 0.001$), after 2 days of CX-5461 treatment (**Fig. 3H; Sup. Fig. 4A**). More precisely, the percentage of GlyA^{low}/CD49d^{pos}/Band3^{neg} cells significantly decreased to the benefit of GlyA^{low}/CD49d^{pos}/Band3^{low} (baso1) at day 1, the proportion of GlyA^{low}/CD49d^{pos}/Band3^{pos} (baso2) was significantly increased at days 2 and 3 and GlyA^{hi}/CD49d^{low}/Band3^{pos} (polyE) and GlyA^{hi}/CD49d^{neg}/Band3^{pos} (orthoE) were significantly increased at day 4 (**Sup. Fig. 4B-C**). Cytological examination confirmed these findings demonstrating an increased percentage of polyE and orthoE in CX-6451-treated cultures compared to untreated conditions (**Fig. 3I-3J**). A quantitative analysis of the whole proteome comparing CX-5461-treated versus untreated erythroblasts revealed the significant increase of several erythroid markers including HBZ, HEMGN, ITGB3, HBA1 or HBG1 (**Fig. 3K**). While GATA1 mRNA and protein expression remained stable, a gene set enrichment analysis (GSEA) of transcriptomic data demonstrated a significant up-regulation of the GATA1 target geneset after 2 days of CX-5461 treatment (**Table S6; Fig. 3L-N**). Our findings show that decreasing ribosome biogenesis speeds up the terminal erythroid differentiation and exerts a transcriptional control of erythroid genes.

CX-5461 activates a p53-dependent transcriptional program

To investigate the mechanism by which ribosome biogenesis arrest may account for erythroid cell maturation, we determined the pathways affected in case of premature arrest of RP renewal by CX-5461 by a comparative analysis of the whole transcriptome in the two conditions. The most significantly up- and down-regulated Gene Ontology terms with a fold-change $< \text{ or } > |1.2|$ are shown in **Fig. 4A**. Interestingly, signal transduction by p53 (GO:0072331) and DNA damage response (GO:0006974) were among the most up-regulated pathways after a 48h-treatment by CX-5461. The GSEA revealed that p53 pathway genes were significantly upregulated (NES 2.39; $P=0$; **Fig. 4B**; **Table S7**). By Western blot, we showed that p53 phosphorylation on serine 15 was only faintly detected in proE/baso 1 erythroblasts and increased in baso2/polyE after a-48h incubation with CX-5461, although the total p53 protein was not stabilized in these conditions. Consistently, the p53 target p21, a cell cycle inhibitor, was up-regulated in response to CX-5461 further demonstrating that p53 was activated upon CX-5461 treatment (**Fig. 4C**). To identify the direct targets of p53, we performed an immunoprecipitation of p53 on the chromatin (ChIP-seq) in primary immature erythroblasts treated or not for 48h with 50 nM CX-5461. In the absence of CX-5461, 1026 significant binding sites for p53 were identified and 263 additional targets are recruited after CX-5461 treatment, meaning that p53 was present on the chromatin of differentiating erythroblasts even in the absence of CX-5461 (**Fig. 4D**). Then, we considered the p53 target genes detected by ChIP-seq in CX-5461-treated erythroblasts which expression was up-regulated or down-regulated with a fold-change of 1.2 in the transcriptome of CX-5461-treated erythroblasts. We identified 70 up-regulated genes involved in p53 signaling, cellular response to DNA damage, signal transduction in response to DNA damage, negative regulation of cell death and cell cycle arrest (**Fig. 4E and Fig. 4F**). We then selected a set of 25 p53 target genes representative of 3 GO terms and we confirmed each of these genes was

upregulated after CX-5461 treatment in at least 3 among 4 independent experiments (**Fig. 4G**). Then we quantified the transcript expression level of 6 of these genes at two time points of erythroid cell maturation in the presence or absence of CX-5461 by RT-qPCR. This analysis revealed that CX-5461 induced the up-regulation of *BTG2* (*B cell translocation gene antiproliferative factor 2*), *p21/CDKN1A*, *PLK2*, *CPEB4* (*cytoplasmic polyadenylation element binding factor 4*), *GADD45A* and *MDM2* at least at one time point. *P21/CDKN1A*, *BTG2* and *CPEB4*, known also as direct targets of GATA1 were spontaneously up-regulated when the differentiation progressed (**Fig. 4H**). These data show that canonical p53 pathways, except apoptosis were activated and several GATA1 transcriptional targets known as potent drivers of erythroid differentiation were direct targets of p53 and may direct the erythroid response to p53 activation.

Inhibition of p53 by shRNA prevents erythroid differentiation

To investigate whether p53 is involved in the progression to final erythroid maturation steps, we first followed the expression and cellular localization of p53 during erythroid differentiation in cultured human primary erythroblasts by immunofluorescence. p53 is expressed in the nucleus of erythroblasts at different stages of maturation and the nuclear amount of p53 increased at day 13 (**Fig. 5A, upper panel**). By Western blot, p53 expression remained stable (**Fig. 5A, bottom panel**). As shown in **Fig. 5B**, p53 was transiently phosphorylated on serine 15 between day 13 (baso2) and day 15 (polyE). The expression of its substrate BTG2 overlapped that of phospho-p53 while p21/Cdkn1A expression was increasing since earlier stages suggesting an alternative regulatory mechanism of p21 activation may exist. The expression of phospho-p53, BTG2 and p21 was turned off at day 17 (**Fig. 5B**). Then we transduced primary CD34⁺ progenitors with a lentiviral vector encoding a shRNA to *TP53* and cultured them in erythroid conditions. As previously reported (Ali et al.,

2013), this *shRNA* efficiently reduced p53 expression and abrogated the possibility to detect a phosphorylated form of p53. Accordingly, the expression level of p21 was reduced (**Fig. 5C**). p53 transcriptional targets, analyzed by RT-qPCR were all significantly downregulated (**Fig. 5D**). Finally, the capacity to erythroid differentiation of *shTP53* and *shSCR*-erythroblasts in culture was compared. GlyA acquisition remained very low even after 4 days of treatment by CX-5461 (**Fig. 5E**) and the cytological examination showed that the erythroid differentiation was almost completely blocked at the stage of baso1 erythroblasts (**Fig. 5F and Fig. 5G**).

Altogether, these results suggest that p53 is necessary for the entry of basophilic erythroblasts into the late steps of erythroid maturation.

CX-5461 recapitulates the nucleolar disruption of differentiating erythroblasts

In vitro differentiation of erythroblasts is characterized by a nuclear condensation with increased quantities of heterochromatin and a disruption of the nucleolus. In cultured erythroblasts, transmission electron microscopy (TEM) showed that active nucleoli were present in 100% of proE and 82% of basoE. In some basoE, segregated or ring-shaped nucleoli corresponded to hallmarks of inactivation. Ring-shaped nucleoli and micronucleoli were observed in 31% and 69% polyE. Nucleoli were most frequently invisible in orthoE because of extensive chromatin condensation (**Fig. 6A; Table S8**). In human bone marrows collected by sternal aspiration, TEM imaging of primary erythroid cells demonstrated that the nucleolus underwent these dramatic structural rearrangements (**Sup. Fig. 5A**). Active nucleoli are composed of three compartments *ie.* fibrillar center (FC) labeled by upstream binding transcription factor (UBF), dense fibrillar component (DFC) labeled by fibrillarin (FBL) and granular component (GC) labeled by nucleophosmin (NPM1) (**Sup. Fig. 5B; Table S6**). The border between FC and DFC is the site of rRNA transcription and early rRNA processing while pre-ribosomes maturation takes place in the GC (Hernandez-Verdun et al., 2006).

Fibrillary centers are known to change in volume and number during erythropoiesis (Zatsepina et al., 1988). Immunofluorescence detection of NPM1, UBF and FBL showed a reduction of signal intensities in polyE compared to immature erythroblasts and an extinction of FBL and UBF in orthoE corresponding to the exclusion of FC and DFC while NPM1 remained detectable but with significant surface reduction (**Sup. Fig. 5B**). The nucleolus is mostly inactive in polyE consistent with the arrest of ribosome biogenesis. A 48h-treatment with CX-5461, which inhibits the binding of RNA pol I to rDNA promoters significantly reduced the proportion of active nucleoli and increased the proportion of ring-shaped and micronucleoli in erythroblasts, consistently with the induction of a nucleolar disruption mimicking that of differentiated erythroblasts (**Fig. 6A** and **Sup. Fig. 5C**). These morphological changes induced by CX-5461 resemble those induced when RNA polymerase I transcription was inhibited at the level of elongation by actinomycin D (5nM for 4h).

Evidence of rDNA damage and ATR-CHK1-p53 pathway activation

Based on our observations, p53 is unlikely activated through the inhibition by free RPs of its ubiquitin ligase MDM2 given that, the quantities of RP remained constant and balanced in CX-5461-treated or untreated erythroblasts during differentiation, the quantities of free RP did not increase in CX-5461-treated cells and p53 protein expression was stable (**Fig. 1F**, **Sup. Fig. 3C**, **Fig. 4C**, **Fig. 5A**). Considering that differentiating erythroblasts underwent a nucleolar stress, we hypothesized that the activation of p53 was triggered by rDNA damage.

The nucleolar DEAD-box RNA helicases DDX21 is involved in the control of ribosome biogenesis through the regulation of rRNA synthesis and processing and the control of RP gene transcription in the nucleoplasm (Calo et al., 2015). Mutations or genetic/pharmacological targeting in components of the Pol I transcriptional machinery induces DDX21 eviction from rDNA and Pol II target promoters and delocalization to the

nucleoplasm (Calo et al., 2018). Therefore, we performed immunofluorescence experiments that revealed a delocalization of DDX21 from day 13 (corresponding to SCF removal). DDX21 also relocated from the nucleolus to the nucleoplasm upon CX-5461 treatment (**Fig. 6B**). This clearly indicates that DDX21 relocation could be a hallmark of rDNA damage-induced by Pol I transcriptional stress. We also noticed that there was a temporal relationship between p53 activation and DDX21 relocation. We then wondered whether p53 activation was consecutive to rDNA damage and investigated the state of activation of Ataxia telangiectasia and Rad3 (ATR) - checkpoint kinase 1 (CHK1) pathway by Western blot. CHK1 started to be phosphorylated at day 13 in basophilic erythroblasts (**Fig. 6C**). We then used a specific ATR inhibitor, VE-821 (Jossé et al., 2014), and treated erythroblasts in the presence or absence of CX-5461. ATRi inhibited the phosphorylation of CHK1 Ser345 and p53 Ser15 both in CX-5461-treated and untreated erythroblasts suggesting that this pathway is responsible for p53 activation in this context (**Fig. 6D**). By contrast to CX-5461, ATRi abrogated the normal erythroid differentiation driven par EPO and maintained a normal rate of proliferation without any sign of apoptosis (**Fig. 6E-G**). Our results show that an ATR-CHK1-p53 pathway is activated when ribosome biogenesis collapses and suggest that an rDNA damage may be responsible for this activation.

Discussion

In the present work, we show that (1) ribosome biogenesis arrest is required for the transition between baso2 and polychromatophilic erythroblasts (2) p53 activation is concomitant to ribosome biogenesis arrest and drives the transcription of erythroid genes; (3) a nucleolar stress causing rDNA damage accounts for ATR-CHK1-p53 pathway activation and terminal erythroid differentiation.

Our findings provide a detailed characterization of the dynamics of ribosome biogenesis during human and murine erythropoiesis and new insights into the mechanism driving ribosome biogenesis arrest. We show that rRNA synthesis and RP renewal in the ribosome collapsed in polyE resulting in the reduction of absolute copy number of all RPs which was concomitant to both cell size decrease, proliferation arrest and erythroid differentiation. Ribosome biogenesis was turned off before the last cell division suggesting that a decreased pool of ribosomes was sufficient for this last division to occur. Furthermore, in the absence of RP neosynthesis, the pool of pre-existing ribosomes was divided between daughter cells consistently with a strict half reduction of RP copy number per cell between polyE and orthoE (**Fig. 1E**). Our results show that rDNA transcription, a rate-limiting factor for ribosome biogenesis, was abrogated with a complete disappearance of 45S precursor in polyE. Previous systematic analyses of gene expression variations during terminal erythroid differentiation consistently showed transcription arrest of fibrillarin and UBF genes that is thought to account for the extinction of nucleolus activity and the decrease of rDNA transcription (An et al., 2014). These changes are also concomitant with the loss of Myc, Spi-1/PU.1 and Fli-1, known as direct transcriptional activators of most of the genes involved in ribosome biogenesis (Barna et al., 2008; Juban et al., 2009). By contrast, RP gene transcription by RNA pol II seemed still active in late erythroblasts (**Fig. 1F**). Therefore, using the RNA Pol I inhibitor CX-5461 to induce premature ribosome biogenesis arrest without changes in RP gene transcription in erythroblasts was appropriate (**Sup Fig. 3B**).

Interestingly, the expression and signaling of c-Kit was critical for optimal ribosomal protein renewal. Here, we documented that concomitant activation of c-Kit and EPO receptor drives a high level of ribosome biogenesis, suggesting that the maintenance of cell proliferation by SCF is in part dependent on the stimulation of ribosome biosynthesis. Indeed, c-Kit and EPO-R additively activate the mTORC1 pathway (**Sup Fig. 6**) that induces cell growth and

ribosome biogenesis by regulating the transcription of RiBi by RNA Pol II, 45S and 5S by RNA Pol I and Pol III, respectively (Lempiäinen & Shore, 2009; Tsang et al., 2010). In addition, mTORC1 exerts the translational control of mRNAs encoding most of the proteins involved in the translation machinery such as elongation factors and RPs which are characterized by an oligopyrimidine tract at the 5' end (5' TOP) known to facilitate their translation (Thoreen et al., 2012). Recent published work demonstrated that translation is selective at the expense of GATA1 in conditions of low ribosome availability generated by the haploinsufficiency of one RP gene mimicking Diamond-Blackfan anemia (Ludwig et al., 2014; Khajuria et al., 2018). In this context, 5'TOP mRNAs were enriched among the transcripts with a reduced translation efficiency, suggesting that selective translation further contributes to impaired ribosome biogenesis (Khajuria et al., 2018). Here, in the presence of CX-5461 the absolute quantities of ribosome remained stable in relation to the proliferation arrest. In the absence of CX-5461, the differentiation upon EPO-R stimulation alone without c-Kit minors mTOR activation and may subsequently reduce 5'TOP mRNA translation in mature erythroblasts leading, to a half reduction of RPs at protein level between SCF-dependent and SCF-independent phases of the erythroid differentiation. However, we could not exclude RPs being post-translationally degraded in the cytosol given that a role for the UBE2O ubiquitinating enzyme in ribosomal protein ubiquitination leading to their proteasomal degradation without interfering with RP synthesis in erythroid cells has been demonstrated (Nguyen et al., 2017). The drop of rDNA transcription and RP neosynthesis converge to abruptly interrupt ribosome biogenesis in maturing erythroblasts during the late EPO-dependent and SCF-independent phase of erythropoiesis.

In normal erythropoiesis, protein translation has been proposed as a key regulator of erythroblast differentiation. Overexpression of the mRNA cap-binding eIF4E, which activates translation initiation, suppresses the erythroblast differentiation (Blázquez-Domingo et al.,

2005). Several evidences support a role for ribosome biogenesis in the control of hematopoietic and erythropoietic development. In murine hematopoietic stem cell (HSC), deletion of the developmental factor *Notchless* affects ribosome biogenesis and causes HSC exhaustion (LeBouteiller et al., 2013). In addition, the transcription factor RUNX1 which binds the rDNA repeats and is enriched on the promoters of genes encoding RPs regulates ribosome biogenesis in hematopoietic stem and progenitor cells and its deletion reduces rRNA and RP mRNA levels leading to reduced cell size and growth rate (Cai et al., 2015). Deficiency in the Polycomb group protein *Bmi1* inhibits RP gene transcription and ribosome synthesis in early erythroid progenitors and impairs further erythroid development (Gao et al., 2015). Here, we showed that decreasing ribosome biogenesis by RNA Pol I inhibition by CX-5461 induces an erythroid transcriptional program suggesting that not only protein translation but ribosome biogenesis *per se* controls erythroid differentiation. Among the genesets up-regulated, a p53 transcriptional signature was activated. In our erythroid context and with the concentration used, CX-5461 activated p53 without inducing the stabilization of the protein and apoptosis. Notably, up-regulated target genes were specifically involved in cell cycle arrest, DNA repair and negative regulation of cell death. This is in sharp contrast with the context of RP haploinsufficiency in which, p53 is both stabilized and activated leading to the strong induction of cell cycle arrest and apoptosis, while p53 knockdown rescues erythroid differentiation and apoptosis (Danilova et al., 2008; Barlow et al., 2010; Dutt et al., 2011; Moniz et al., 2012; Jaako et al., 2015). Notably, the p53 pathways activated during and required for normal erythroid differentiation are limited, excluding the commitment to apoptosis. Similarly, the non-apoptotic functions of caspases are crucial for terminal erythroid differentiation (Zermati et al., 2001; Ribeil et al., 2007). Here, the pro-apoptotic effectors PUMA and NOXA, which are usually transcribed following p53 transcriptional activation domain (TAD)1 activation in response to DNA damage were not induced suggesting that

apoptotic response to DNA damage was not activated (Brady et al., 2011). Our ChIP-seq analysis shows that p53 targets depending on the activation of both TAD1/2 and only some targets depending on TAD1 like p21/CDKN1A were up-regulated. Interestingly, we identified GATA1 transcriptional targets *BTG2*, *p21/CDKN1A* and *CPEB4* among the direct targets of p53 identified by ChIP-seq (Welch et al., 2004; Papetti et al., 2010; Hu et al., 2014). Previous work has suggested that GATA1 and p53 undergo a reciprocal inhibitory interaction involving the zinc finger domains of GATA1 and both TAD 1 and 2 of p53 (Trainor et al., 2009). Therefore, we could not exclude that the erythroid transcriptional program could be remodeled by the result of p53 and GATA1 activation and their interaction.

The mechanism of p53 activation in the context of normal erythroid differentiation could be totally different from that reported in the context of RP haploinsufficiency, in which only 50% of RPs are used for ribosome assembly due to unbalanced production by the lack of a half quantity of one of them. Therefore, free RPs remain in the nucleus and cytosol and several of them RPL11, RPL5, RPS6... have been shown to bind and inhibit the p53 ubiquitin ligase MDM2 (Fumagalli et al., 2009). Here, in normal or CX-treated erythroblasts, the reduced pool of RP remained well balanced without accumulation of free RPs. Therefore, we speculate that p53 activation results from an alternative mechanism. The evolution of nucleolus morphology during normal erythroid differentiation gives rise to the possibility of a nucleolar stress consistent with disappearance of the border between the fibrillar center and the dense fibrillar component and abrogation of rDNA transcription leading to rDNA damage. In ribosomopathies like Treacher Collins syndrome (TCS), caused by heterozygous mutations in RNA Pol I complex either TCOF1 or POLR1D and POLR1C subunits, Diamond-Blackfan anemia and Schwachman-Diamond syndrome, rDNA damage has been demonstrated by the evidence of DDX21 helicase relocalization from the nucleolus to the nucleoplasm (Calo et al., 2018). Furthermore, loss of *ddx21* in zebrafish is responsible for anemia. Here, rDNA damage

was initiated at the transition between baso1 and baso2 when erythroid cells became insensitive to SCF. Expression of rDNA endonuclease in U2OS cells causes γ H2AX-labeled nuclear foci when DDX21 is delocalized (Calo et al., 2018) and CX-5461 treatment of ovarian cancer cell lines also provokes γ H2AX-labeled foci around the nucleolus (Sanij et al., 2019) suggesting that DNA double strand breaks (DSB) could occur. By contrast, in immortalized human fibroblasts, CX-5461 could induce an unusual chromatin structure in which rDNA repeats are devoid of RNA Pol I leading to activation of ATM signaling despite the absence of DSB (Quin et al., 2016). Whether the rDNA chromatin devoid of DDX21 undergoes DSB or single strand DNA exposure in differentiating erythroblasts remains to be determined. Loss of RNA pol I complex on the chromatin appeared determinant for ATR or ATM activation as actinomycin D which does not affect RNA Pol I recruitment to rDNA promoters but rather inhibits RNA Pol I transcription elongation, does not induce ATM or ATR activation. Regardless, we show that the ATR-CHK1-p53 pathway was activated, even in the absence of CX-5461 in differentiating erythroblasts and this activation is required for differentiation. Inhibition of ATR or DNA damage induction by UV may sensitize CX-5461 treated cells to apoptosis (Qin et al., 2016) suggesting activation of ATR pathway is required for cell survival. In the erythroid context, we conclude that ATR pathway activation could be necessary for negative regulation of apoptosis and positive regulation of differentiation.

In summary, the role of ribosome biogenesis in erythroid development we documented is supported by the recognition of erythroid defects in ribosomopathies like DBA or 5q-syndrome. We show here that the timing of ribosome biogenesis extinction is crucial. In ribosomopathies in which ribosome availability is altered by unbalanced production, the threshold of ribosome biogenesis down-regulation could be prematurely reached thus preventing a normal expansion of erythroid progenitors. Furthermore, the reduction of ribosome availability in normal differentiating erythroblasts which have been predicted to

drive protein synthesis according to mRNA characteristics of initiation rate also guides the induction of a limited non-apoptotic p53-dependent transcriptional program.

References

Ali A, Bluteau O, Messaoudi K, Palazzo A, Boukour S, Lordier L, Lecluse Y, Rameau P, Kraus-Berthier L, Jacquet-Bescond A, Lelièvre H, Depil S, Dessen P, Solary E, Raslova H, Vainchenker W, Plo I, Debili N. Thrombocytopenia induced by the histone deacetylase inhibitor abexinostat involves p53-dependent and independent mechanisms. *Cell Death and Disease* 2013; 4 : e738

An X, Schulz VP, Li J, Wu K, Liu J, Xue F, Hu J, Mohandas N, Gallagher PG. Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2014;123(22):3466–3477.

Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, Holmes LR, Lorenzo-Abalde S, Lane AL, Jolin HE, Pannell R, Middleton AJ, Wong SH, Warren AJ, Wainscoat JS, Boulwood J, McKenzie AN. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q-syndrome. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):59-66.

Barna M, Pusic A, Zollo O, Zollo O, Costa M, Kondrashov N, Rego E, Rao PH, Ruggero D. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature*. 2008;456(7224):971–975.

Blázquez-Domingo M, Grech G, von Lindern M. Translation initiation factor 4E inhibits differentiation of erythroid progenitors. *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;25(19):8496-8506.

Brady CA, Jiang D, Mello SS, Johnson TM, Jarvis LA, Kozak MM, Kenzelmann Broz D, Basak S, Park EJ, McLaughlin ME, Karnezis AN, Attardi LD. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*. 2011 May 13;145(4):571-583.

Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, Wall M, Cluse L, Drygin D, Anderes K, Huser N, Proffitt C, Bliesath J, Haddach M, Schwaebe MK, Ryckman DM, Rice WG, Schmitt C, Lowe SW, Johnstone RW, Pearson RB, McArthur GA, Hannan RD. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*. 2012;22(1):51–65.

Cai X, Gao L, Teng L, Ge J, Oo ZM, Kumar AR, Gilliland DG, Mason PJ, Tan K, Speck NA. Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*. 2015 Aug 6;17(2):165-177.

Calo E, Flynn RA, Martin L, Spitale RC, Chang HY, Wysocka J. RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):249-253.

Calo E, Gu B, Bowen ME, Aryan F, Zalc A, Liang J, Flynn RA, Swigut T, Chang HY, Attardi LD, Wysocka J. Tissue-selective effects of nucleolar stress and rDNA damage in developmental disorders. *Nature*. 2018 Feb 1;554(7690):112-117.

Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. (2007). Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* 28, 1178–1182.

Cox J, Matic I, Hilger M, et al. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* 2009;4(5):698–705.

Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):5228-5237.

Dolznic H, Grebien F, Sauer T, Beug H, Müllner EW. Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nat. Cell Biol.* 2004;6(9):899–905.

Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 1999; 21, 169–175.

Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, Wilson FH, Currie T, Khanna-Gupta A, Berliner N, Kutok JL, Ebert BL. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011;117(9):2567–2576.

Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335–339.

England SJ, McGrath KE, Frame JM, Palis J. Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus. *Blood*. 2011;117(9):2708–2717.

Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, Pierre-Eugène C, Sternberg A, Arlet JB, Floquet C, Gyan E, Kosmider O, Dreyfus F, Gabet AS, Courtois G, Vyas P, Ribeil JA, Zermati Y, Lacombe C, Mayeux P, Solary E, Garrido C, Hermine O, Fontenay M. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1532-1542.

Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. 2003;313:17–42.

Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, Natt F, Schwemberger S, Hall J, Babcock GF, Bernardi R, Pandolfi PP, Thomas G. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol.* 2009 Apr;11(4):501-508.

Gao R, Chen S, Kobayashi M, Yu H, Zhang Y, Wan Y, Young SK, Soltis A, Yu M, Vemula S, Fraenkel E, Cantor A, Antipin Y, Xu Y, Yoder MC, Wek RC, Ellis SR, Kapur R, Zhu X,

- Liu Y. Bmi1 promotes erythroid development through regulating ribosome biogenesis. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2015;33(3):925–938.
- Gautier EF, Ducamp S, Leduc M, Salnot V, Guillonneau F, Dussiot M, Hale J, Giarratana MC, Raimbault A, Douay L, Lacombe C, Mohandas N, Verdier F, Zermati Y, Mayeux P. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* 2016 Aug 2;16(5):1470-1484.
- Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choemmel V, O'Donohue MF, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Zaucha JM, Glader B, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* 2008; 83(6):769-780.
- Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood.* 2011;118(24):6258–6268.
- Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015 Mar-Apr;6(2):225-242.
- Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem. Cell Biol.* 2006;126(2):135–148.
- Hu J, Liu J, Xue F, Halverson G, Reid M, Guo A, Chen L, Raza A, Galili N, Jaffray J, Lane J, Chasis JA, Taylor N, Mohandas N, An X. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood.* 2013;121(16):3246–3253.
- Hu W, Yuan B, Lodish HF. Cpeb4-mediated translational regulatory circuitry controls terminal erythroid differentiation. *Dev Cell.* 2014 Sep 29;30(6):660-672.
- Jaako P, Debnath S, Olsson K, Zhang Y, Flygare J, Lindström MS, Bryder D, Karlsson S. Disruption of the 5S RNP-Mdm2 interaction significantly improves the erythroid defect in a mouse model for Diamond-Blackfan anemia. *Leukemia* 2015; 29: 2221-2229.
- Jossé R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, Barnes CS, Jones J, Charlton P, Pollard JR, Morris J, Doroshov JH, Pommier Y. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* 2014 Dec 1;74(23):6968-6979.
- Juban G, Giraud G, Guyot B, Belin S, Diaz JJ, Starck J, Guillouf C, Moreau-Gachelin F, Morlé F. Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis in Friend erythroleukemic cells. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(10):2852–2864.
- Kerenyi MA, Orkin SH. Networking erythropoiesis. *J. Exp. Med.* 2010;207(12):2537–2541.

Khajuria RK, Munschauer M, Ulirsch JC, Fiorini C, Ludwig LS, McFarland SK, Abdulhay NJ, Specht H, Keshishian H, Mani DR, Jovanovic M, Ellis SR, Fulco CP, Engreitz JM, Schütz S, Lian J, Gripp KW, Weinberg OK, Pinkus GS, Gehrke L, Regev A, Lander ES, Gazda HT, Lee WY, Panse VG, Carr SA, Sankaran VG. Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):90-103.e19.

Le Bouteiller M, Souilhol C, Beck-Cormier S, Stedman A, Burlen-Defranoux O, Vandormael-Pournin S, Bernex F, Cumano A, Cohen-Tannoudji M. Notchless-dependent ribosome synthesis is required for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2013 Oct 21;210(11):2351-2369.

Lempiäinen H, Shore D. Growth control and ribosome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2009;21(6):855–863.

Lodish H, Flygare J, Chou S. From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life*. 2010;62(7):492–496.

Lodish HF. Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis. *Nature*. 1974 Oct 4;251(5474):385-388.

Ludwig LS, Gazda HT, Eng JC, Eichhorn SW, Thiru P, Ghazvinian R, George TI, Gotlib JR, Beggs AH, Sieff CA, Lodish HF, Lander ES, Sankaran VG. Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 2014; 20:748 – 753

Moniz H, Gastou M, Leblanc T, et al. Primary hematopoietic cells from DBA patients with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell Death Dis*. 2012;3:e356.

Munugalavadla V, Dore LC, Tan BL, Hong L, Vishnu M, Weiss MJ, Kapur R. Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol. Cell. Biol*. 2005;25(15):6747–6759.

Nguyen AT, Prado MA, Schmidt PJ, Sendamarai AK, Wilson-Grady JT, Min M, Campagna DR, Tian G, Shi Y, Dederer V, Kawan M, Kuehnle N, Paulo JA, Yao Y, Weiss MJ, Justice MJ, Gygi SP, Fleming MD, Finley D. UBE2O remodels the proteome during terminal erythroid differentiation. *Science*. 2017 Aug 4;357(6350) pii: eaan021.

O'Donohue M-F, Choemel V, Faubladiet M, Fichant G, Gleizes P-E. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J. Cell Biol*. 2010;190(5):853–866.

Papetti M, Wontakal SN, Stopka T, Skoultschi AI. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*. 2010 May 15;9(10):1972-1980.

Quin J, Chan KT, Devlin JR, Cameron DP, Diesch J, Cullinane C, Ahern J, Khot A, Hein N, George AJ, Hannan KM, Poortinga G, Sheppard KE, Khanna KK, Johnstone RW, Drygin D, McArthur GA, Pearson RB, Sanij E, Hannan RD. Inhibition of RNA polymerase I transcription initiation by CX-5461 activates non-canonical ATM/ATR signaling. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31):49800-49818.

Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sørensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):102-105.

Sanij E, Hannan KM, Yan S, Xuan J, Ahern JE, Chan KT, Son J, Kondrashova O, Lieschke E, Wakefield MJ, Trigos AS, Frank D, Ellis S, Cullinane C, Kang J, Poortinga G, Nag P, Khanna KK, Mileshkin L, McArthur GA, Soong J, Berns EMJJ, Hannan RD, Scott CL, Sheppard KE, Pearson RB Inhibition of RNA Polymerase I Transcription Activates Targeted DNA Damage Response and Enhances the Efficacy of PARP Inhibitors in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *BioRxiv* posted online Apr. 29, 2019; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/621623>.

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 2012;485(7396):109–113.

Trainor CD, Mas C, Archambault P, Di Lello P, Omichinski JG. GATA-1 associates with and inhibits p53. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):165-73.

Tsang CK, Liu H, Zheng XFS. mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle Georget. Tex.* 2010;9(5):953–957.

Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, Blobel GA, Chodosh LA, Weiss MJ. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*. 2004;104(10):3136–3147.

Wiśniewski JR, Hein MY, Cox J, Mann M. A "proteomic ruler" for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Dec;13(12):3497-506.

Zatsepina OV, Chelidze PV, Chentsov YS. Changes in the number and volume of fibrillar centres with the inactivation of nucleoli at erythropoiesis. *J Cell Sci*. 1988 Nov;91 (Pt 3):439-448.

Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*. 2001 Jan 15;193(2):247-254.

Acknowledgments

We would like to thank Pr L Da Costa, Dr F Verdier for helpful discussions, A Baudin-Baillieu and S Hermann-Le Denmat for their assistance concerning ribosome profiles; Institut Cochin platforms: K Bailly and M Andrieu from the Institut Cochin CYBIO facility; B. Durel, T Guilbert and P. Bourdoncle Cellular Imaging IMAG'IC facility; B Loriod from the

TAGC platform in Marseille; M Salma, bioinformatician from Dr E Soler's lab at IGMM; JM Massé and A Schmitt from electron microscopy facility; F Dumont Genomic's facilities. We also thank P Facek, E Quiot and A Pajot for technical assistance.

Funding: SLG was received a PhD grant of the LabEx GR-Ex. IB received a PhD grant Ardhoc from the region Ile de France. CF was supported by a fellowship from the Fondation de France and from Agence Nationale pour la Recherche (ANR Blanc 2013), AR was supported by a PhD fellowship from the Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer. This work was supported by a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) – Institut Thématique Multi-organismes (ITMO) – Immunologie Hématologie Pneumologie (IHP).

Author contributions

FM, PEG, PM, MF designed the study, SLG, IB, CF, AR, BG, IH, DD, M-FOD, CA-S, E-FG, ML performed the experiments, SLG, IB, CF, AR, BG, FM, P-EG, M-F O'D, FG, PM, EC-B, OH analyzed the data, MF wrote the manuscript, all authors critically reviewed the manuscript.

Figure legends

Figure 1: Evolution of ribosome content during normal erythroid differentiation.

Human primary erythroblasts were derived from CD34⁺ progenitors and expanded in culture during 19 days. **(A)** Amplification curve and cell size. Human erythroblasts proliferation was expressed as the cumulative number of cells at each indicated time (closed symbols). Cell size was measured using the forward-scattered light (FSC) expressed as mean fluorescence intensity (MFI; open symbols). Means \pm standard error of the mean (SEM) of 4 experiments. **(B)** Proportion of immature (ProE and baso1) and mature (baso2, polyE and orthoE) erythroblasts by cytological examination of May-Grünwald-Giemsa-stained cytopins. Mean \pm SEM of 3 independent experiments. **(C)** RNA quantification in ribosome fractions. Quantities of RNA in purified ribosomes of human erythroblasts were measured at OD 260 nm. Mean \pm SEM of 6 experiments. **(D)** Quantification of pre-rRNA 45S and β -globin (HBB) transcripts by RT-qPCR. Transcripts amounts were normalized to *B2M* and *UBC* transcript amounts and normalized relative quantities (NRQ) were calculated. Means NRQ \pm SEM of 3 experiments. **(E)** Fluorescence in situ hybridization for pre-rRNA 45S in human erythroblasts at indicated times of culture. Images were obtained on a Leica DMI6000 inverted microscope with spinning disk and analyzed with Image J. **(F)** Absolute quantification of RPs by mass spectrometry. Data published by Gautier et al. 2016. Median copy number of 4 independent experiments. **(G)** Expression of RPs coding RNAs in reads per exon kilobase per million (RPKM) values. Data published by An et al. 2014. Mean RPKM of 3 independent experiments. Student t-tests for *P*-values. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001. **(H)** Scatterplot representing pairwise comparisons of protein and RNA expression of RPs at each stage of differentiation (left panel). Pearson correlations between pairwise comparisons

using median expression of replicates from all RPs values for each differentiation stage (right panel). *P*-values <0.05 are significant.

Figure 2: Kinetics of ribosome renewal during normal erythroid differentiation.

(A) Schematic experimental design of stable isotope labeling by aminoacids (SILAC). Human erythroblasts were metabolically labeled for 24h and ribosomes were purified by differential centrifugation and analyzed by LC-MS/MS. (B) Kinetic of ribosomal proteins (RP) renewal. In each experiment, the renewal percentage of each RP is calculated as: $(H/H+L)*100$. Ribosome renewal is defined as the median of RP renewal percentage. Results are shown as mean \pm SEM of 4 experiments. (C) Concomitant decrease of RPL and RPS renewal during erythroid differentiation. The percent renewal $(H/H+L)*100$ of each protein was plotted in two-dimension scatterplots to compare the value at each timepoint to the reference value at day 7. Results are representative of 4 independent experiments. (D) Comparison of the rate of renewal of each RP at different timepoints of the human erythroid differentiation. H/L ratio was normalized to the median of H/L ratios of all RPs of the same subunit and transformed to log₂ values. RPs in red are those with the highest rate of renewal in the ribosome. Heatmaps representative of 4 independent experiments. (E) Expression of SCF receptor (CD117) and GlyA by flow cytometry analysis during human erythroblast differentiation. (F) Ribosome renewal by pulse SILAC in human erythroblasts at day 10 (proE/Baso1). Cells were cytokine-starved for 4h before incubation in SILAC medium with 10 UI/mL EPO, 100 ng/mL SCF or EPO+SCF in the presence or absence of 2 μ M c-Kit inhibitor masitinib for 24h. Median RP renewal was determined. Results are shown as means \pm SEM of 3 independent experiments. Student t-test for *P*-values; ** <0.01. (G) Cytology of sorted human proE (GlyA^{low}/Band3⁻) and basoE (GlyA^{high}/Band3^{+/-}) after May-Grünwald-Giemsa staining. Microphotographs at magnitude 100X. (H) Ribosome renewal by pulse SILAC of sorted human erythroblasts

GlyA^{low/-}/Band3 and GlyA^{high}/Band3^{+/-} incubated in SILAC medium with EPO+SCF for 24h. Results representative of one experiment and expressed as median RP renewal are shown.

Figure 3: Inhibition of ribosome biogenesis accelerates human erythroblast differentiation.

(A) Quantification of pre-rRNA 45S transcript after 48h of treatment by 50 nM CX-5461 by RT-qPCR. Transcripts amounts were normalized to *B2M*, *UBC* and *ACTB* and expressed as normalized relative quantities (NRQ). Mean NRQ \pm SEM of 3 experiments. **(B)** RP renewal percentage after stable isotope labeling by aminoacids (SILAC) for 48h in human erythroblasts in the presence or absence of CX-5461. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments. **(C)** Comparison of the ratios of non RP, RPS and RPL renewal after SILAC between CX-5461 treated and untreated cells. Results are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments. **(D)** Polysome profiling. Ribosome from human erythroblasts treated or not with CX-5461 (50 nM) for 48h was purified on sucrose gradient and the relative abundance of free RNP complexes, the 40S, 60S and 80S subunits and polysomes was measured by absorbance at OD 260 nm. **(E)** Label-free proteomic for absolute quantification of RPs by mass spectrometry after 48h of incubation with or w/o CX-5461. Results are expressed as mean copy number \pm SEM of 5 independent experiments. **(F)** Proliferation rate of human erythroblasts expressed as the cumulative cell number at each timepoint. CX-5461 (50 nM) was added at day 0 on erythroblasts at the proE stage. Mean \pm SEM of 4 experiments. **(G)** Percent annexin V-positive cells determined by flow cytometry and shown as mean \pm SEM of 4 experiments. **(H)** Percent glycophorin A (GlyA)-positive cells were quantified by flow cytometry and shown as mean \pm SEM of 4 experiments. **(I)** Cytological examination of May-Grünwald-Giemsa (MGG)-stained cytopins. Proportions of erythroid precursor populations at day 16 (proE: proerythroblasts; baso1: early basophilic erythroblasts;

baso2: late basophilic erythroblasts; polyE: polychromatic erythroblasts; orthoE: orthochromatic erythroblasts). Mean percentages \pm SEM of 4 experiments. **(J)** Microphotographs representing MGG-stained cytopins of control and CX-treated erythroblasts after 4Hh of incubation (magnitude 100X). **(K)** Label-free proteomic for absolute quantification of protein copy number in erythroblasts treated or not for 48h with CX-5461. The most significantly up-regulated proteins are shown. Results are expressed as mean copy number of 3 independent experiments. **(L)** *GATA1* mRNA expression on transcriptomic ships of CX-5461 treated or untreated erythroblasts for 48h. **(M)** Western blot analysis of GATA1 protein expression in CX-5461 treated or untreated erythroblasts for 48h. Representative of 3 independent experiments. **(N)** Transcriptomic analysis of. Gene set enrichment analysis (GSEA) showing variations of GATA1 target gene expression in transcriptomic analysis of erythroblasts after 48h of treatment by CX-5461 or control. NES: normalized enrichment score.

Figure 4: CX-5461 activates a p53-dependent transcriptional program.

(A) Gene Ontology (GO) analysis of differentially expressed genes between CX-5461-treated and -untreated erythroblasts for 48h. $-\text{Log}_{10}$ (*P*-values) are shown. **(B)** Gene set enrichment analysis (GSEA) of p53 pathway genes in erythroblasts after 48h of treatment by CX-5461 or control. NES: normalized enrichment score. **(C)** Western Blot showing p53 activation by CX-5461 for 48h. Actin is used as loading control. Representative results of 3 independent experiments. **(D)** Venn diagram of the repartition of p53 direct target genes identified by ChIP-seq in CX-treated or control erythroblasts after 48h. **(E)** Venn diagram showing the overlap between p53 target genes identified by ChIP-seq after 48h of CX-5461 treatment and differentially expressed genes with a fold-change of $|1.2|$ between CX5461-treated or control erythroblasts (48h) in transcriptomic analyses. **(F)** Gene ontology (GO) analysis of the

70 upregulated p53 direct target genes after CX-5461 treatment. (G) Heatmap visualization of the most representative p53 direct target genes upregulated after CX-5461 treatment. (H) Quantification of p53 direct target gene expression after 48h or 96h of CX-5461 treatment by RT-qPCR. Student t-test for *P*-values. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001.

Figure 5: Inhibition of p53 prevents normal erythroid differentiation.

(A) p53 expression in human primary erythroblasts at different days in culture. Upper panel: Immunofluorescence showing p53 expression. DAPI is used for nucleus counter-staining. Images were obtained on a Leica DMI6000 inverted microscope with spinning disk and analyzed with Image J (x100). Bottom panel: Western blot analysis. Actin is used as loading control. (B) Western blot analysis of phospho-p53 serine 15 and p53 targets p21/Cdkn1A and BTG2 expression during normal erythroblast differentiation. Actin is used as loading control. (C) *TP53* knock-down by shRNA. Erythroblasts were transduced by a lentivirus expressing sh*TP53* or scramble (SCR) control and cell lysates were analyzed after 2 days for phospho-p53 ser15, p53, p21/Cdkn1A protein expression by Western blot. Actin is used as loading control. (D) Measurement of p53 target genes quantities by RT-qPCR in sh*TP53* and shSCR erythroblasts. Transcripts amounts were normalized to *B2M*, *UBC* and *ACTB* amounts. Results are expressed as mean NRQ ± SEM of 3 experiments. (E) Erythroid differentiation was assessed by the quantification of glycophorin A (GlyA) expression by flow cytometry at indicated days after lentivirus transduction. Results are expressed as mean percentages ± SEM of 3 experiments. (F) Cytological examination of May-Grünwald-Giemsa (MGG)-stained cytopins (proE: proerythroblasts; baso1: early basophilic erythroblasts; baso2: late basophilic erythroblasts; polyE: polychromatic erythroblasts; orthoE: orthochromatic erythroblasts) at day 4 after lentivirus transduction. Results are expressed as mean percentages ± SEM of 3

experiments. (G) Representative images of MGG-stained cytopins at day 4 after lentivirus transduction. Student t-test for *P*-values. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

Figure 6: Evidence of rDNA damage and ATR-CHK1-p53 pathway activation.

(A) Transmission electron microscopy (TEM) analysis of nucleolus structure in human erythroblasts during differentiation (left), upon a 4h-treatment with 5nM actinomycin (Act) D (middle) and CX-5461 50 nM for 48h (right). (B) Representative immunofluorescence images of DDX21 nucleolar delocalization in differentiating erythroblasts, and CX-5461 (50 nM for 48h)-treated erythroblasts. Control represents labeling with secondary antibody. Images were obtained on a Leica DMI6000 inverted microscope with spinning disk and analyzed with Image J (x100). (C) Activation of CHK1 during normal erythroblast differentiation. Phospho-CHK1 serine 345 and CHK1 expression by Western blot. Actin is used as loading control. Representative immunoblot of 3 independent experiments. (D) Western blot of phospho-CHK1 or phospho-p53 expression in erythroblasts treated by ATR inhibitor VE-821 (1 μ M) or CX-5461 (50nM) or both for 4 days. (E) Glycophorin A (GlyA) expression was quantified by flow cytometry. Mean \pm SEM of 3 experiments. (F) Annexin V-positive cells quantified as mean percentage \pm SEM of 3 experiments. (G) Erythroblasts proliferation as the cumulative cell number at each indicated time. ATR inhibitor VE-821 or CX-5461 was added at day 0 to erythroblasts at the proE stage. Mean \pm SEM of 3 experiments.

Supplemental figure legends

Sup. Fig. 1: Differentiation of extensively self-renewing erythroblasts (ESRE) derived from murine fetal liver erythroblasts.

(A) Amplification curve and cell size of murine erythroblasts. ESRE terminal differentiation was induced within 3 days. Cell proliferation monitored as cumulative cell number (closed symbols). Cell size measured using the forward-scattered light (FSC) expressed as mean fluorescence intensity (MFI; open symbols). (B) Cytological aspect of differentiating ESRE. Microphotographs at magnification 50x of MGG-stained cytopins. Proportion of immature (proE and basoE) and mature (polyE and orthoE) erythroblasts. Results are expressed as means \pm SEM of 3 experiments. (C) Quantification of hbb-b1 encoding b-globin by RT-qPCR. Transcripts amounts were normalized by *ACTB*. (D) RNA quantification in ribosome fractions. Quantities of RNA in purified ribosomes were measured at OD 260 nm. Mean \pm SEM of 3 experiments.

Sup. Fig. 2: Pulsed stable isotope labeling by aminoacids (SILAC) experiments.

(A) Sequence coverage of each RP in pulse SILAC experiments in human primary erythroblasts. Mean percentage \pm SEM of 3 independent experiments. (B) *Pulse-SILAC assay in murine erythroid cells*. Labeling was performed for 14h. Percentages of renewal of each ribosomal protein are calculated as: $(H/H+L)*100$. Mean \pm SEM of 2 experiments. (C) Proportion of cells expressing CD117 during murine erythroblasts differentiation measured by flow cytometry. (D) Rate of RP renewal during ESRE differentiation. H/L ratio were normalized to the median of H/L ratio of all RPs of the same subunit and transformed in Log2

values. RPs in red are those highly renewed in the ribosome. Heatmaps representative of 2 independent experiments.

Sup. Fig. 3: Stability of RP proteins and transcripts in CX-5461-treated erythroblasts.

(A) Label-free proteomic for absolute quantification of RPs by mass spectrometry after 96h of incubation with or w/o CX-5461 (50 nM). Results are expressed as copy numbers *per cell* with indicated mean \pm SD. Representative of 2 independent experiments. **(B)** Transcriptomic analysis of RP gene expression in erythroblasts treated for 48h or 96h with 50 nM CX-5461. Results are expressed as log₂ (fold change) between CX-5461 and control conditions. Each value represents the mean of 3 independent experiments and mean expression \pm SEM of RPL or RPS are shown. **(C)** Human erythroblasts were labeled for 24h with heavy aminoacids and ribosomal fractions were separated on sucrose gradient. Trypsin-digested peptides were analyzed by mass spectrometry in each fraction. For RP and non RP detected in the free RNP complexes fraction, the variations of intensities between CX-5461 treated and control conditions were measured and expressed as log₂(fold change).

Sup. Fig. 4: Analysis of human erythroid differentiation upon inhibition of ribosome biogenesis.

(A) Flow cytometric analysis of glycophorin A (GlyA) expression. CX-5461 was added at day 0 on proE. Representative monoparametric plots of GlyA expression versus count. **(B)** Flow cytometric analysis of α 4 integrin/CD49d and Band3 expression in glycophorin A-positive cells. Representative bi-parametric plots are shown. Precursors are separated as proE (i), baso1 (ii), baso2 (iii), polyE (iv), and orthoE (v). **(C)** Proportion of each precursor was determined according to Hu et al., Blood 2013 in CX-5461-treated and controls erythroblasts. Mean percentages \pm SEM of 3 experiments. Student t-test for P-values. * <0.05, ** <0.01.

Sup. Fig. 5: Characterization of the nucleolar disruption in differentiating erythroblasts.

(A) Nucleolus structure analysis by transmission electron microscopy (TEM) of fresh human erythroblasts isolated from bone marrows showing active, ring-shaped and micro-nucleolus.

(B) Immunofluorescence analysis of nucleolar compartments. Nucleophosmin (NPM1), fibrillarin (FBL) and upstream binding transcription factor (UBF) are used as markers of granular component, dense fibrillar component, and fibrillar center, respectively.

Microphotographs were obtained on a Leica DMI6000 inverted microscope with spinning disk and analyzed with Image J. **(C)** Proportion of each nucleolar structure in CX-5461-treated or control erythroblasts. Over 100 nucleoli were analyzed from 2 separate experiments. Mean percentages \pm SD.

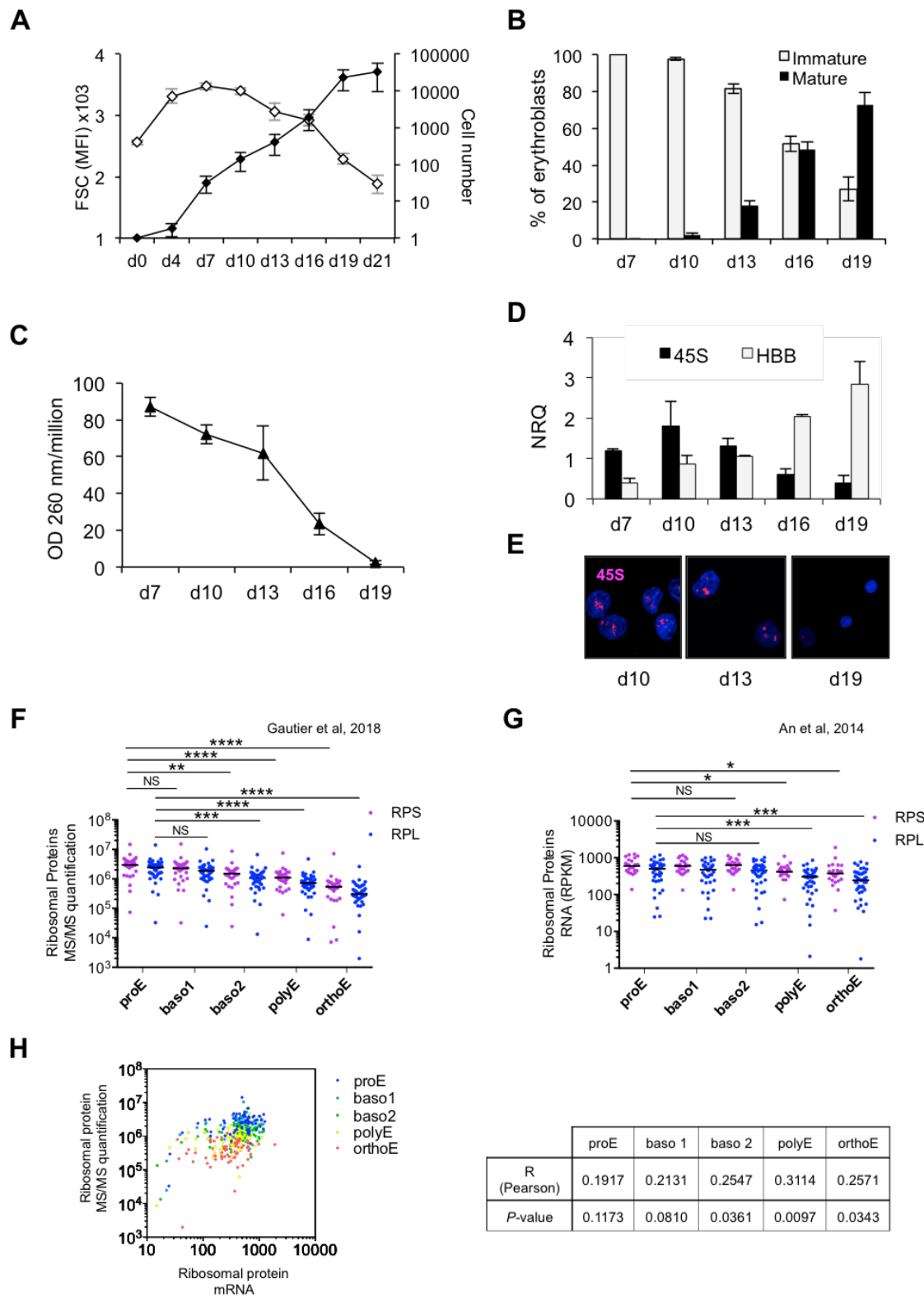


Figure 1: Quantification of ribosome contents during normal erythroid differentiation.

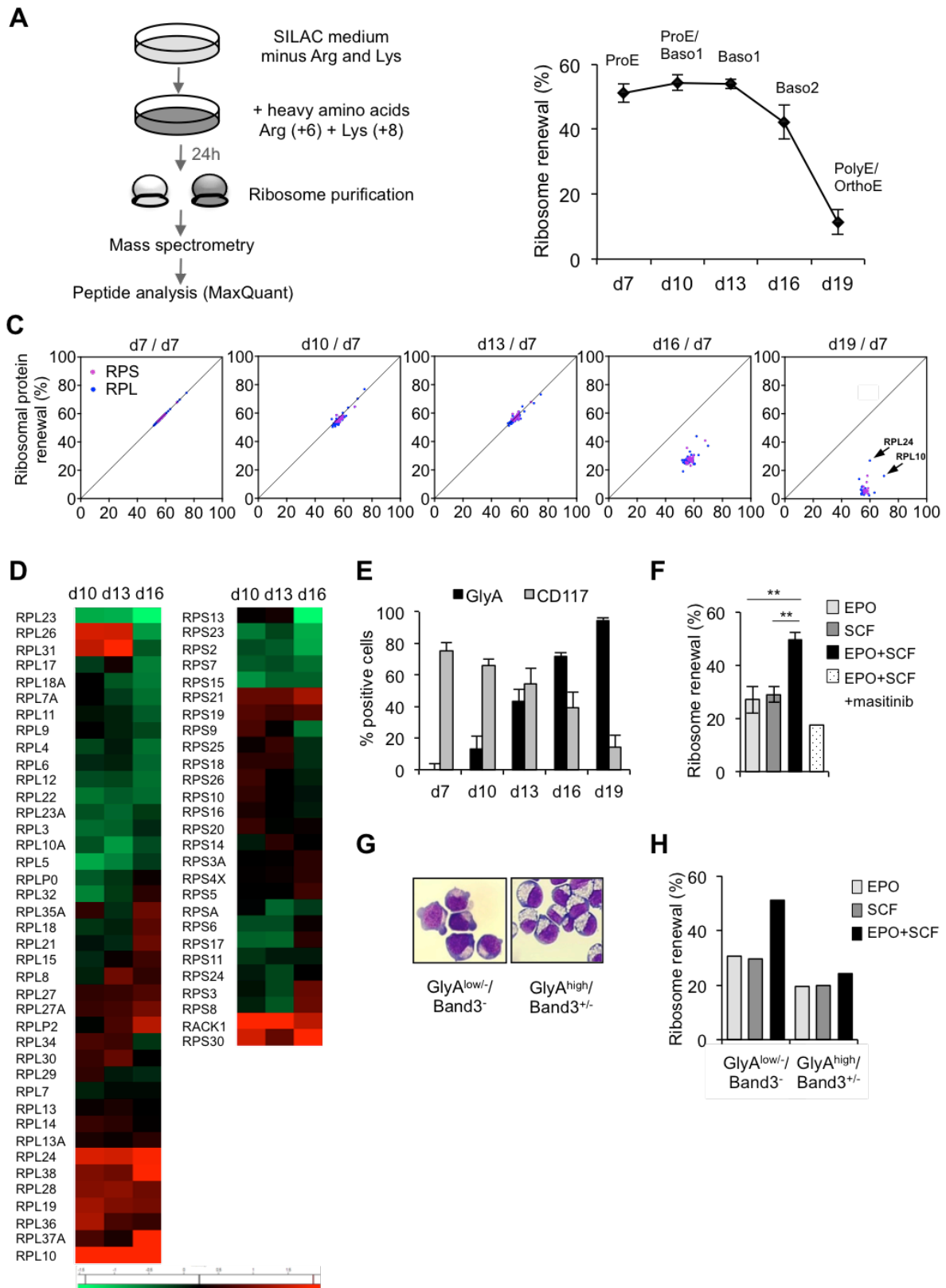


Figure 2: Kinetics of ribosome renewal during normal erythroid differentiation.

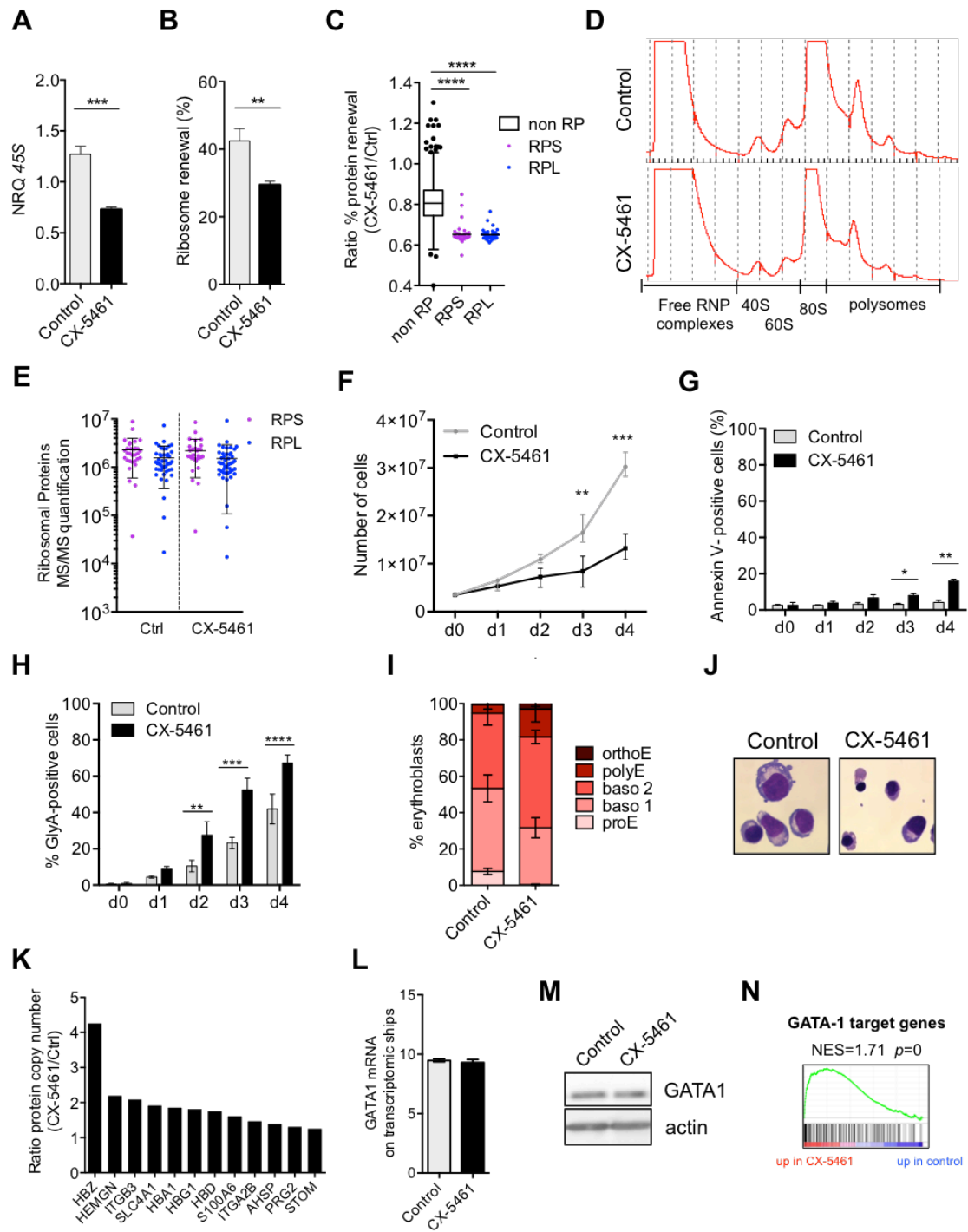


Figure 3: Inhibition of ribosome biogenesis forces human erythroblasts differentiation.

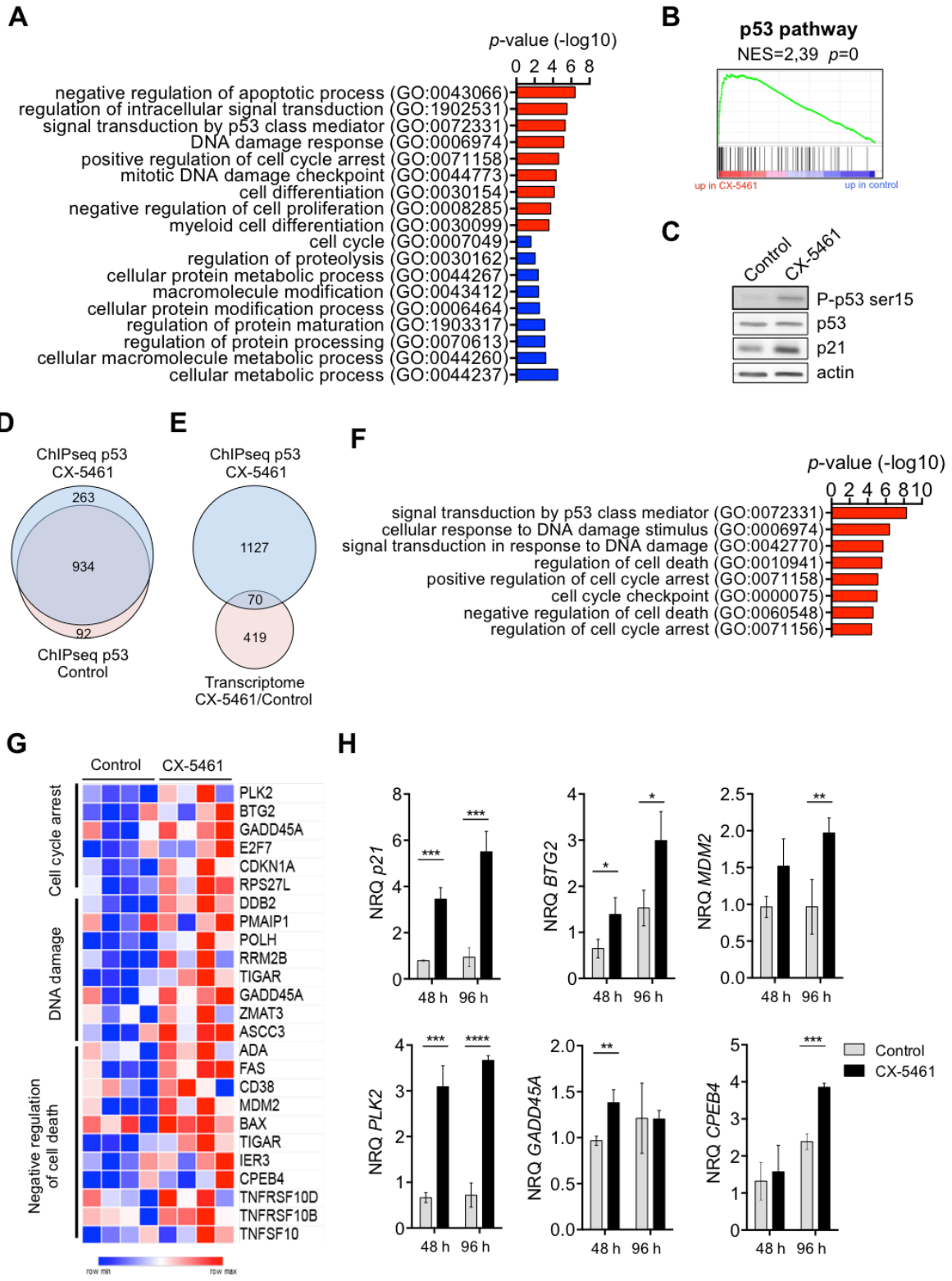


Figure 4: CX-5461 activates a p53-dependant transcriptional program.

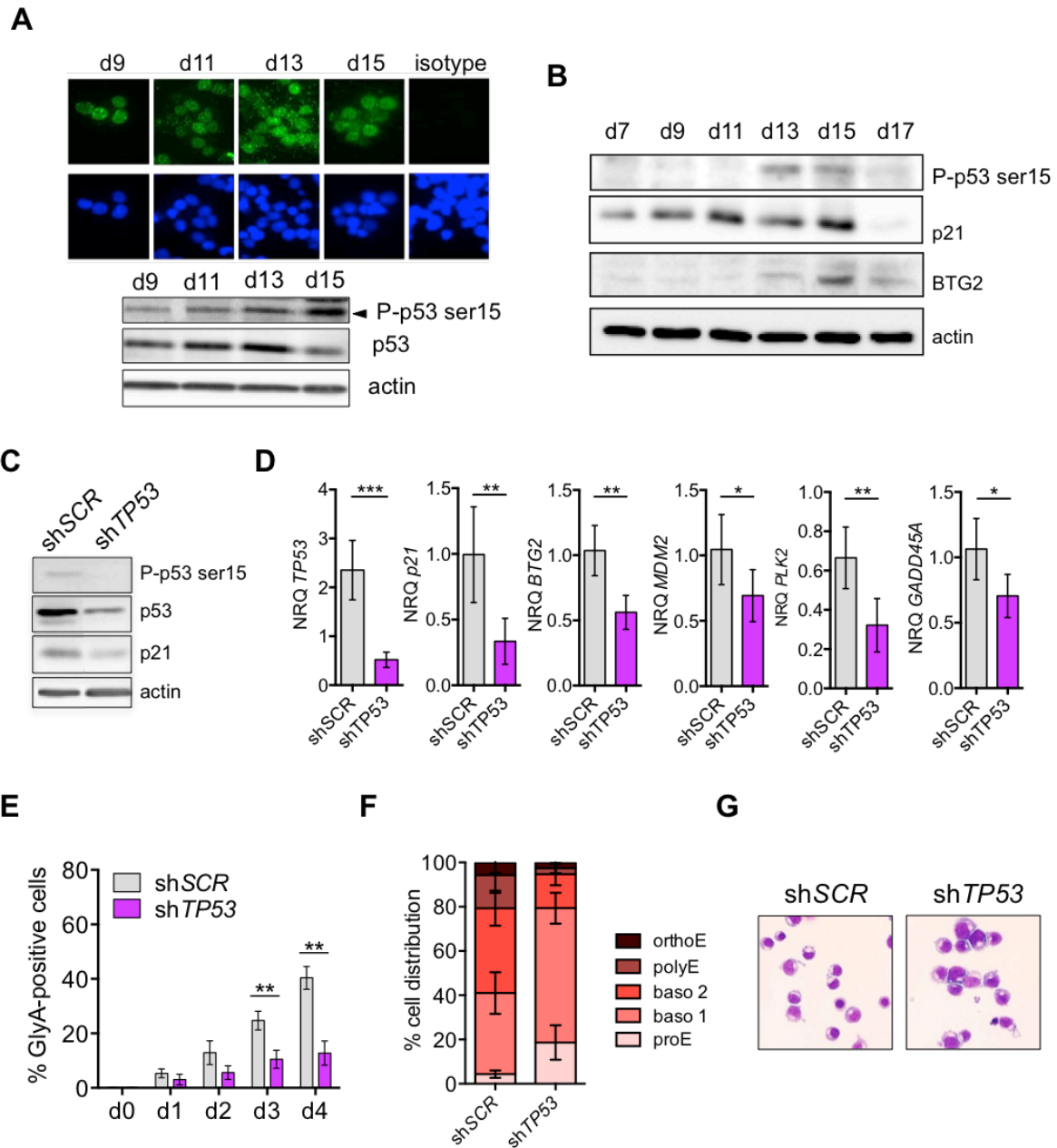


Figure 5: Inhibition of p53 prevents the erythroid differentiation.

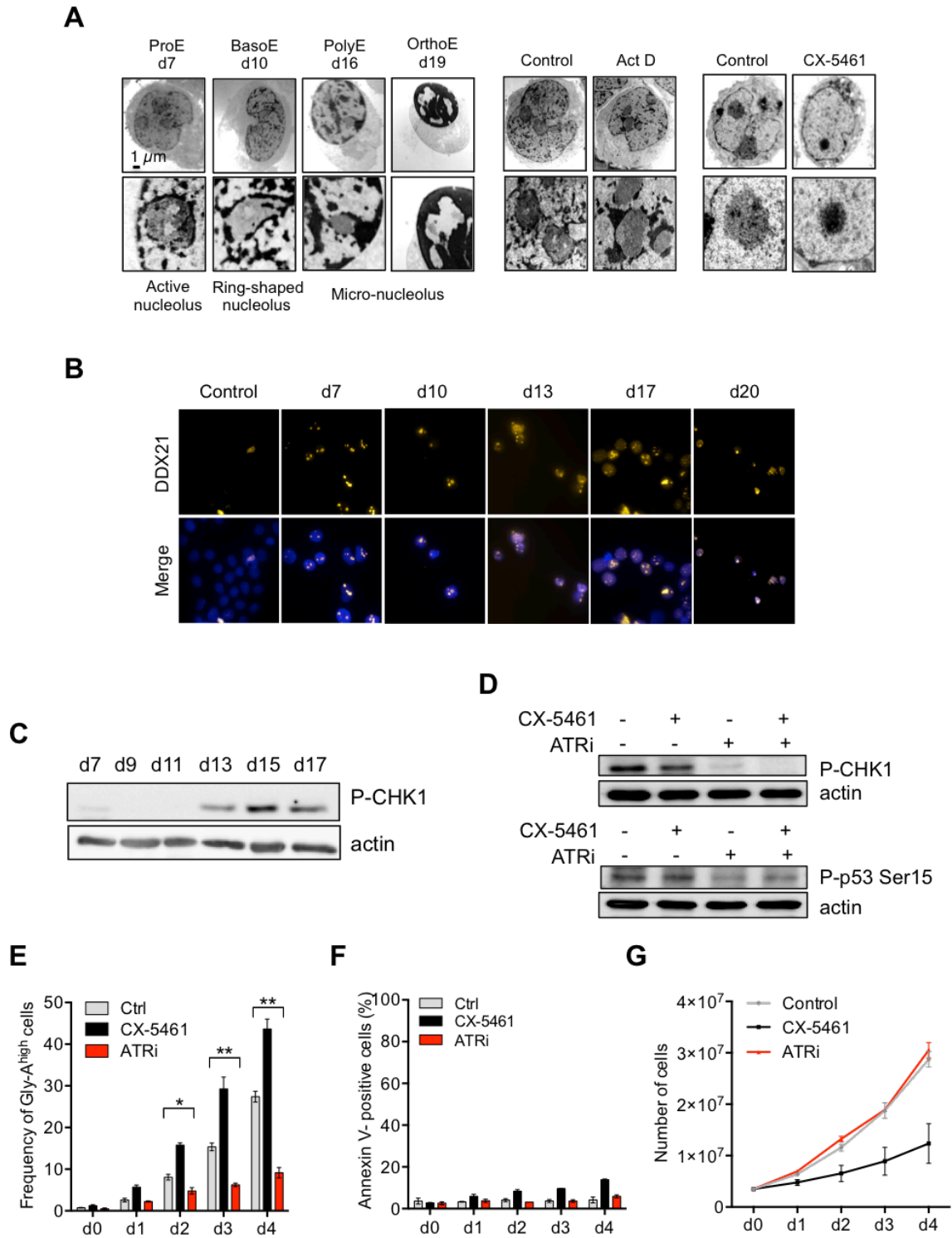
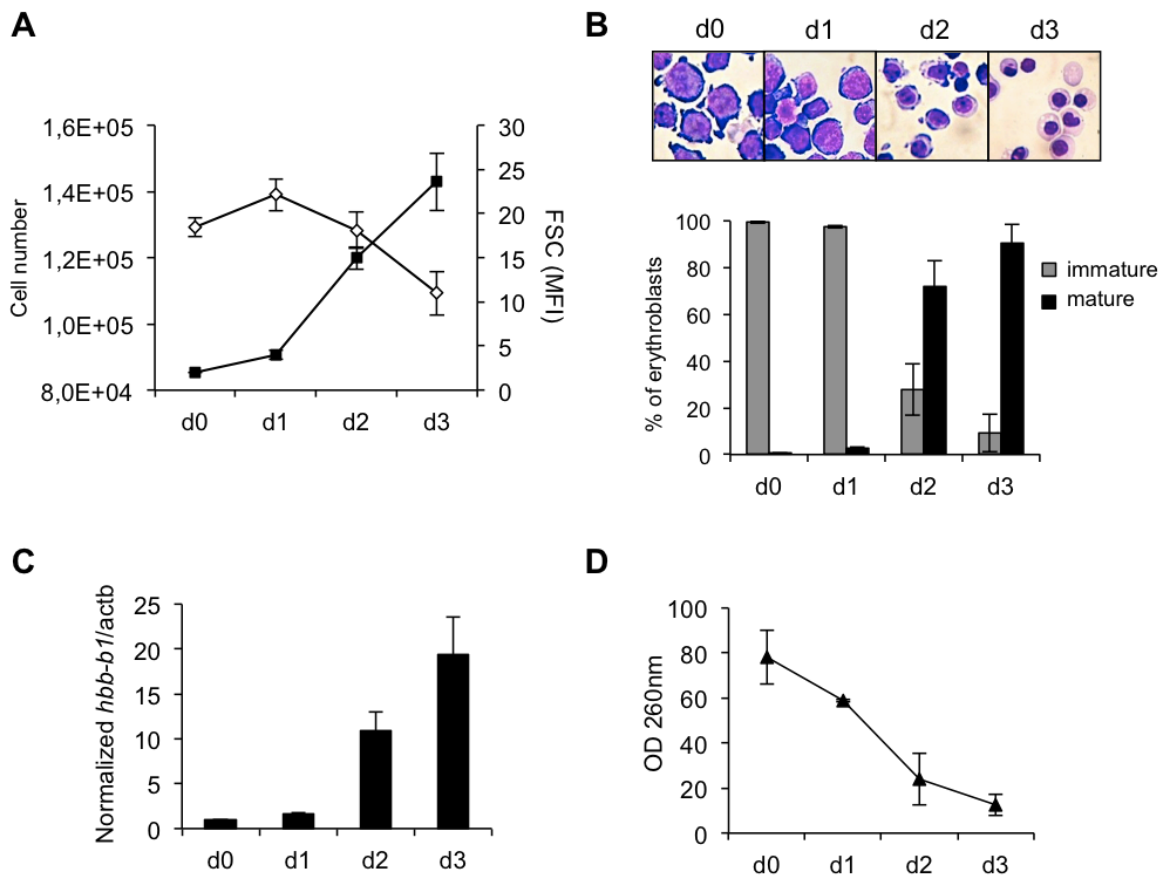
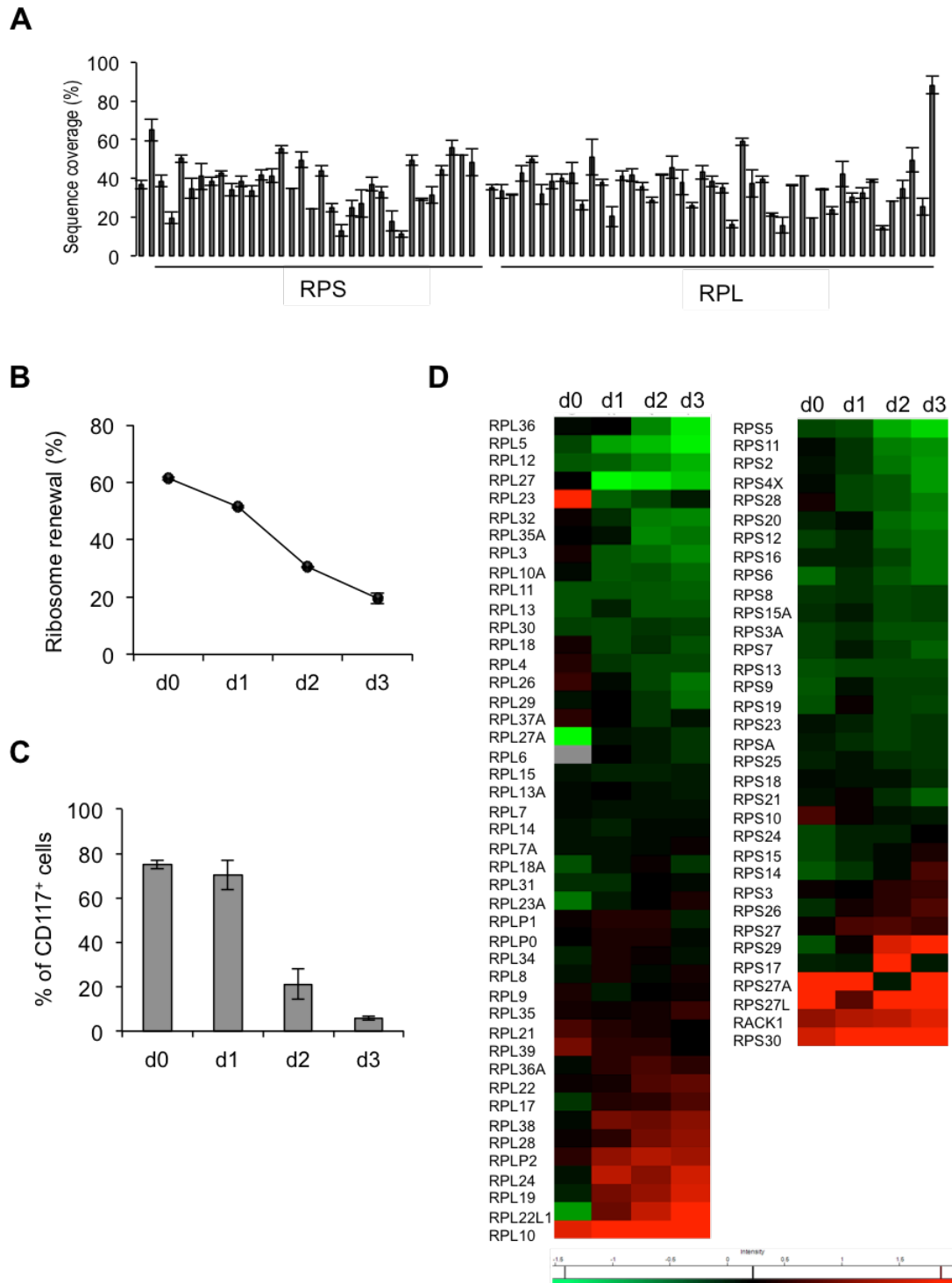


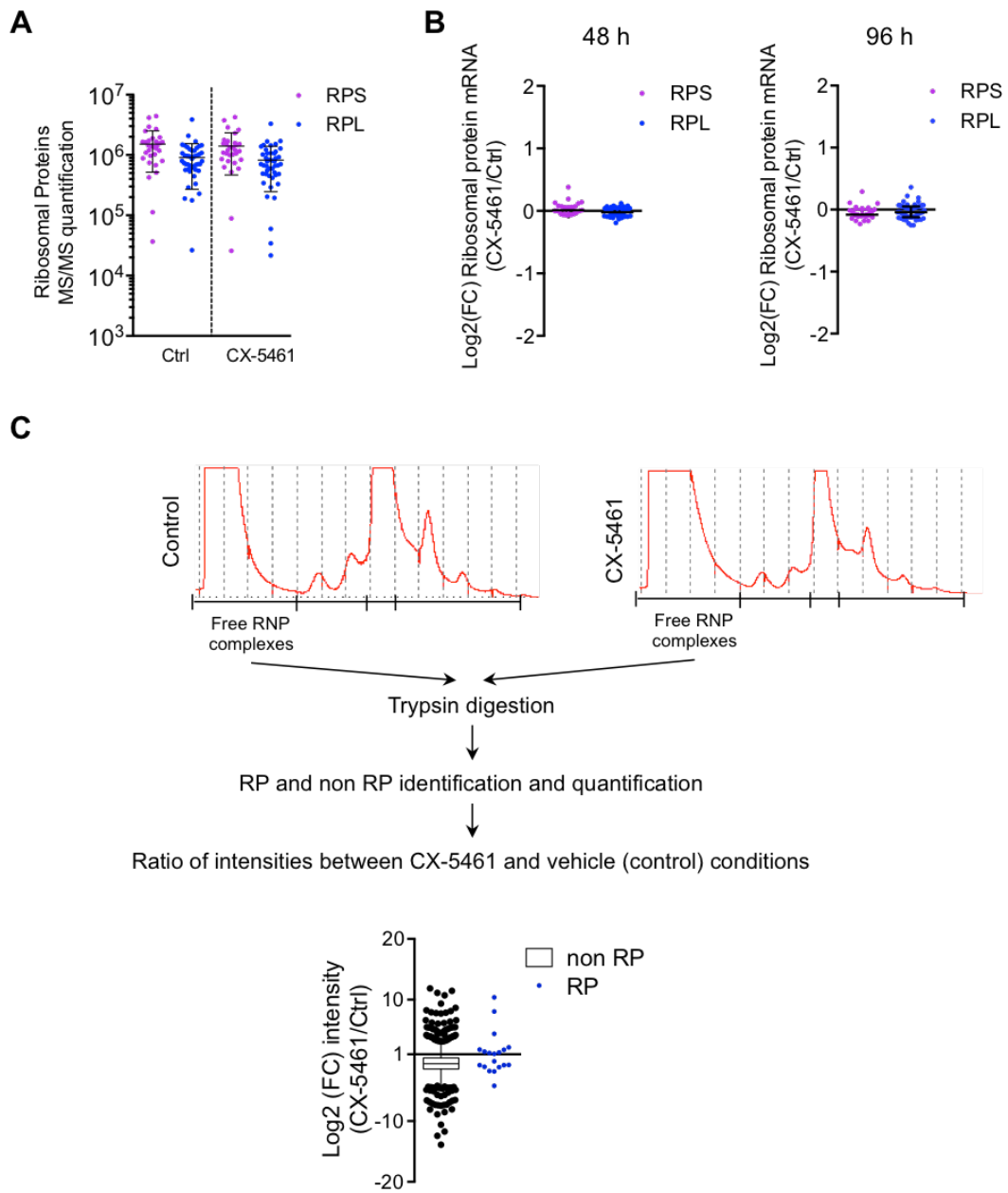
Figure 6: p53 activation results from a nucleolar disruption and activation of the ATR-CHK1-p53 pathway and inhibition of this pathway prevents erythroid differentiation.



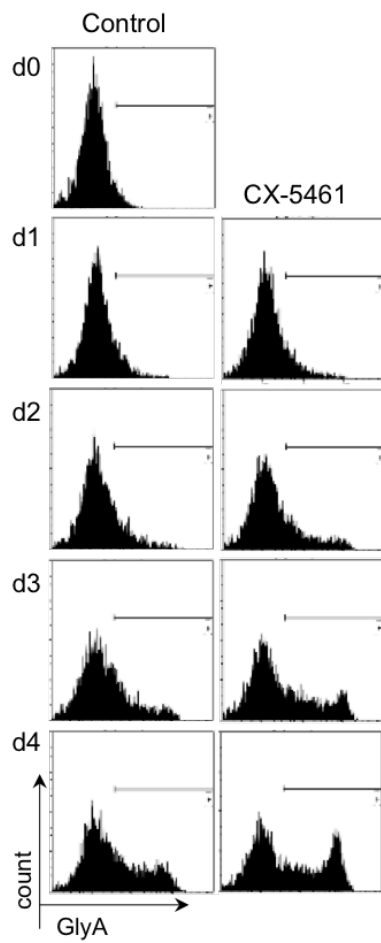
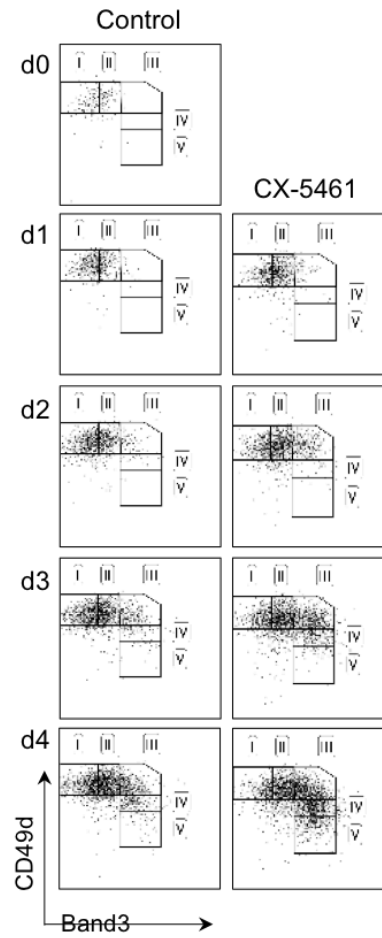
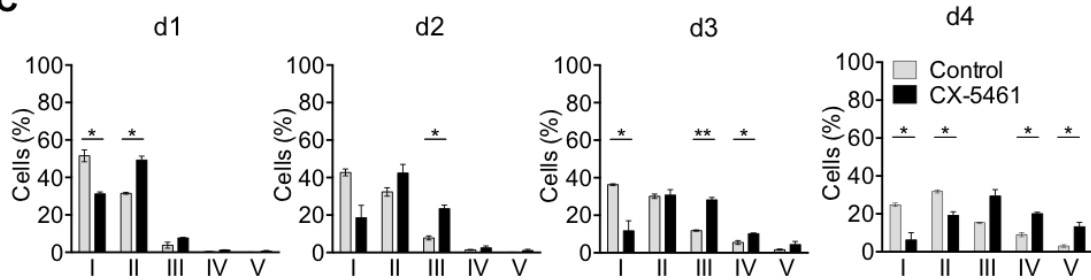
Sup. Fig. 1: Differentiation of extensively self-renewing erythroblasts (ESRE) deriving from murine fetal liver erythroblasts.



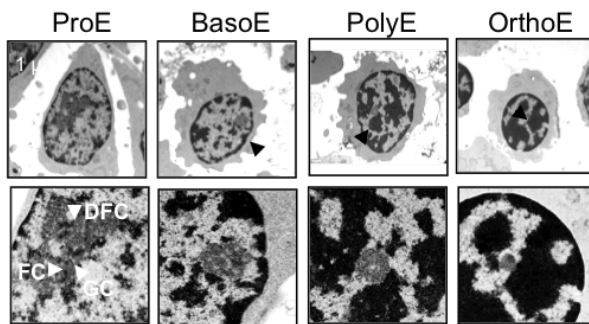
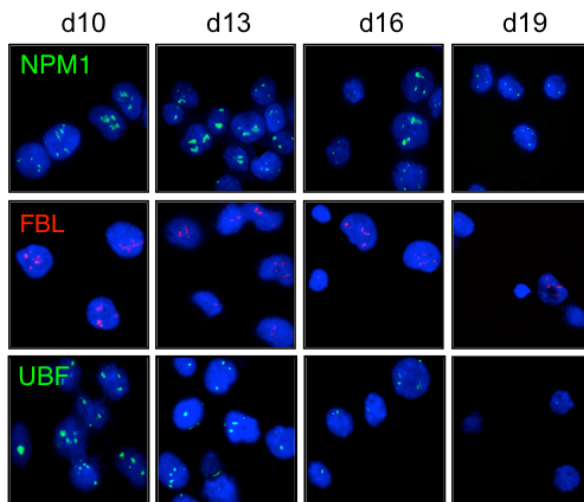
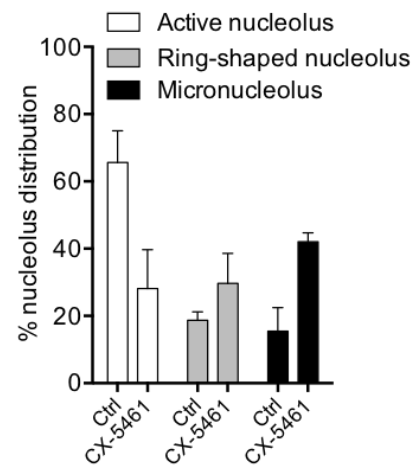
Sup. Fig. 2: Pulse stable isotope labeling by aminoacids (SILAC) experiments.



Sup. Fig. 3: Stability of RP proteins and transcripts in CX-5461-treated erythroblasts.

A**B****C**

Sup. Fig. 4: Analysis of human erythroid differentiation upon inhibition of ribosome biogenesis.

A**B****C**

Sup. Fig. 5 : Characterization of the nucleolar disruption in differentiating erythroblasts.

Supplemental tables

Table S1: List of RT-qPCR primers used in this study.

Gene	Forward primer	Reverse primer
Human 45S	AGCCTTCTCTAGCGATCTGA	TACCATAACGGAGGCAGAGA
Human HBB	GGCCCACAAGTATCACTAAGC	GGCCCACAAGTATCACTAAGC
Human UBC	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT
Human B2M	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT	CAAACCTCCATGATGCTGATTACA
Human ACTB	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTCTCAAACATGATCTGGG
Human CDKN1A	TGTCACTGTCTTGTACCCTTG	GGCGTTTGGAGTGGTAGAA
Human PLK2	AGAACCCTTGGAACACAGAAG	GGCCTCCCTAGTAACATTGTATAC
Human GADD45A	GGAGAGCAGAAGACCGAAAG	AGGCACAACACCACGTTATC
Human MDM2	TGCCAAGCTTCTCTGTGAAAG	TCCTTTTGATCACTCCCACC
Human BTG2	GCAGAGGCTTAAGGTCTTCAG	CTTGTGGTTGATGCGAATGC

Table S2: List of antibodies used in Western blot and immunofluorescence experiments.

Antibody	Company	Ref	Type
p53 Ser15	Cell Signaling Technologies	9284	rabbit polyclonal
p53	Cell Signaling Technologies	48818	mouse monoclonal
p21	Cell Signaling Technologies	2947	rabbit monoclonal
GATA1	Santa Cruz Biotechnology	sc-266	rat monoclonal
Actin	Sigma Merck	A1978	mouse monoclonal
CHK1	Santacruz Biotechnology	sc-8408	monoclonal souris
CHK1 Ser345	Cell Signaling Technologies	2348	rabbit monoclonal
NPM1	Life technologies	325200	mouse monoclonal
UBF	Santa Cruz Biotechnology	sc-12125	mouse monoclonal
Fibrillarin	Cell Signaling Technologies	26395	rabbit monoclonal
DDX21	Novus Biologicals	NBP1-83310	rabbit polyclonal

Table S3: List of human ribosomal proteins identified by pulsed SILAC. RPL: ribosomal protein large, RPS: ribosomal protein small. Protein database at www.uniprot.org.

Access number	Protein
P08865	40S ribosomal protein SA
P15880	40S ribosomal protein S2
P23396	40S ribosomal protein S3
P62861	40S ribosomal protein S30
P61247	40S ribosomal protein S3a
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform
P22090	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1
P46782	40S ribosomal protein S5
P62753	40S ribosomal protein S6
P62081	40S ribosomal protein S7
P62241	40S ribosomal protein S8
P46781	40S ribosomal protein S9
P25398	40S ribosomal protein S12
P62277	40S ribosomal protein S13
P62263	40S ribosomal protein S14
P62841	40S ribosomal protein S15
P62244	40S ribosomal protein S15a
P62249	40S ribosomal protein S16
P08708	40S ribosomal protein S17
POCW22	40S ribosomal protein S17-like
P62269	40S ribosomal protein S18
P39019	40S ribosomal protein S19
P60866	40S ribosomal protein S20
P63220	40S ribosomal protein S21
P62266	40S ribosomal protein S23
P62847	40S ribosomal protein S24
P62851	40S ribosomal protein S25
P62854	40S ribosomal protein S26
P42677	40S ribosomal protein S27
Q71UM5	40S ribosomal protein S27-like
P62857	40S ribosomal protein S28
P62273	40S ribosomal protein S29
P23396	40S ribosomal protein S3
P62861	40S ribosomal protein S30

Access number	Protein
P39023	60S ribosomal protein L3
P36578	60S ribosomal protein L4
P46777	60S ribosomal protein L5
Q02878	60S ribosomal protein L6
P18124	60S ribosomal protein L7
P62424	60S ribosomal protein L7
P62917	60S ribosomal protein L8
P32969	60S ribosomal protein L9
P62913	60S ribosomal protein L11
P30050	60S ribosomal protein L12
P26373	60S ribosomal protein L13
P40429	60S ribosomal protein L13a
P50914	60S ribosomal protein L14
P61313	60S ribosomal protein L15
P18621	60S ribosomal protein L17
Q07020	60S ribosomal protein L18
Q02543	60S ribosomal protein L18a
P84098	60S ribosomal protein L19
P46778	60S ribosomal protein L21
P35268	60S ribosomal protein L22
P62829	60S ribosomal protein L23
P62750	60S ribosomal protein L23a
P83731	60S ribosomal protein L24
P61254	60S ribosomal protein L26
P61353	60S ribosomal protein L27
P46776	60S ribosomal protein L27a
P46779	60S ribosomal protein L28
P47914	60S ribosomal protein L29
P62888	60S ribosomal protein L30
P62899	60S ribosomal protein L31
P62910	60S ribosomal protein L32
P49207	60S ribosomal protein L34
P42766	60S ribosomal protein L35
P18077	60S ribosomal protein L35a
Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36
P83881	60S ribosomal protein L36a
Q969Q0	60S ribosomal protein L36a-like
P61513	60S ribosomal protein L37a
P63173	60S ribosomal protein L38
Q59GN2	Putative 60S ribosomal protein L39-like
P05388	60S acidic ribosomal protein P0
P05386	60S acidic ribosomal protein P1
P05387	60S acidic ribosomal protein P2

Table S4: List of murine ribosomal proteins identified by pulsed SILAC. RPL: ribosomal protein large, RPS: ribosomal protein small. Protein database at www.uniprot.org.

Access number	Protein
P63325	40S ribosomal protein S10
Q9DB79	40S ribosomal protein S11
IQ6ZWZ6	40S ribosomal protein S12
P62301	40S ribosomal protein S13
O70569	40S ribosomal protein S14
P62843	40S ribosomal protein S15
P62245	40S ribosomal protein S15a
Q5CZY9	40S ribosomal protein S16
Q8BT90	40S ribosomal protein S17
F6YVP7	40S ribosomal protein S18
Q5M9P3	40S ribosomal protein S19
P25444	40S ribosomal protein S2
RS20	40S ribosomal protein S20
Q9CQR2	40S ribosomal protein S21
Q9CZ15	40S ribosomal protein S23
Q9CQK2	40S ribosomal protein S24
P62852	40S ribosomal protein S25
P62855	40S ribosomal protein S26
Q6ZWU9	40S ribosomal protein S27
P62983	40S ribosomal protein S27a
Q6ZWY3	40S ribosomal protein S27-like
P62858	40S ribosomal protein S28
P62274	40S ribosomal protein S29
P62908	40S ribosomal protein S3
Q91V99	40S ribosomal protein S30
D3Z6C3	40S ribosomal protein S3a
P62702	40S ribosomal protein S4, X isoform
Q91V55	40S ribosomal protein S5
P62754	40S ribosomal protein S6
P62082	40S ribosomal protein S7
P62242	40S ribosomal protein S8
Q6ZWN5	40S ribosomal protein S9
B2CY77	40S ribosomal protein SA

Access number	Protein
Q3THJ6	60S ribosomal protein L10
P53026	60S ribosomal protein L10a
E9PYL9	60S ribosomal protein L11
P35979	60S ribosomal protein L12
P47963	60S ribosomal protein L13
P19253	60S ribosomal protein L13a
Q9CWK0	60S ribosomal protein L14
E9QAZ2	60S ribosomal protein L15
Q80V08	60S ribosomal protein L17
P35980	60S ribosomal protein L18
P62717	60S ribosomal protein L18a
P84099	60S ribosomal protein L19
O09167	60S ribosomal protein L21
P67984	60S ribosomal protein L22
Q0VBA4	60S ribosomal protein L22-like 1
P62830	60S ribosomal protein L23
D3YWP3	60S ribosomal protein L23a
Q3UW40	60S ribosomal protein L24
P61255	60S ribosomal protein L26
P61358	60S ribosomal protein L27
P14115	60S ribosomal protein L27a
P41105	60S ribosomal protein L28
D3Z1N9	60S ribosomal protein L29
P27659	60S ribosomal protein L3
P62889	60S ribosomal protein L30
P62900	60S ribosomal protein L31
P62911	60S ribosomal protein L32
Q9D1R9	60S ribosomal protein L34
Q6ZWV7	60S ribosomal protein L35
O55142	60S ribosomal protein L35a
Q5M9L1	60S ribosomal protein L36
P83882	60S ribosomal protein L36a
P61514	60S ribosomal protein L37a
Q52KP0	60S ribosomal protein L38
P62892	60S ribosomal protein L39
Q564E8	60S ribosomal protein L4
P47962	60S ribosomal protein L5
P47911	60S ribosomal protein L6
P14148	60S ribosomal protein L7
D3YU93	60S ribosomal protein L7a
P62918	60S ribosomal protein L8
G3UW34	60S ribosomal protein L9
P68040	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
P14869	60S acidic ribosomal protein P0
P47955	60S acidic ribosomal protein P1
P99027	60S acidic ribosomal protein P2

Table S5: Description of RP timing of incorporation in the ribosome according to the literature (De la Cruz et al., 2015; Ferreira-Cerca et al., 2005; Rabl et al., 2011; Klinge et al., 2011).

RPL			RPS		
early	middle	late	early	middle	late
L3	L17	LP0	S3A	S2	S7
L4	L19	LP1	S6	S5	S10
L5	L26	LP2	S8	S15	S17
L6	L31	L10	S9	S18	S19
L11	L37	L21	S11	S21	S26
L35A		L24	S13		S29
		L27A	S14		S30
		L29	S16		RACK1
		L36	S23		
		L37A	S24		
		L40	S27		

Table S6: Geneset “GATA1 target genes”

Geneset used for GSEA analysis performed with desktop application www.broadinstitute.org/gsea. GATA1 target gene set derived from integrated ChIP-seq and transcriptomic data deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under access numbers GSE16594 and GSE18042.44 Genes bound by GATA1 and expressed with a fold change >2 or <-2 with a P -value < 0.05 were considered for the enrichment analysis.

Gene ID	Name	Gene ID	Name	Gene ID	Name
81027	TUBB1	8569	MKNK1	10587	TXNRD2
113278	SLC52A3	4524	MTHFR	55815	TSNAXIP1
3039	HBA1/HBA2	283537	SLC46A3	9491	PSMF1
202915	TMEM184A	89	ACTN3	57169	ZNFX1
269	AMHR2	55317	AP5S1	51317	PHF21A
6521	SLC4A1	6548	SLC9A1	92521	SPECC1
212	ALAS2	2313	FLI1	85462	FHDC1
9501	RPH3AL	440193	CCDC88C	148932	MOB3C
219539	YPEL4	9980	DOPEY2	286	ANK1
54509	RHOF	8435	SOAT2	117247	SLC16A10
55281	TMEM140	7456	WIPF1	83853	ROPN1L
643965	TMEM88B	9034	CCRL2	54434	SSH1
57580	PREX1	129642	MBOAT2	119	ADD2
7832	BTG2	10381	TUBB3	23097	CDK19
7288	TULP2	54625	PARP14	163259	DENND2C
144404	TMEM120B	571	BACH1	57465	TBC1D24
55198	APPL2	130612	TMEM198	388695	LYSMD1
43	ACHE	10396	ATP8A1	7318	UBA7
388403	YPEL2	7310	ZRSR2P1	152007	GLIPR2
129303	TMEM150A	22981	NINL	90410	IFT20
80301	PLEKHO2	55707	NECAP2	585	BBS4
90634	N4BP2L1	116151	FAM210B	10107	TRIM10
200162	SPAG17	84709	MGARP	8031	NCOA4
6581	SLC22A3	57153	SLC44A2	9650	MTFR1
11309	SLCO2B1	389072	PLEKHM3	8786	RGS11
29799	YPEL1	10435	CDC42EP2	8814	CDKL1
9911	TMCC2	3029	HAGH	83606	GUCD1
2993	GYPA	27102	EIF2AK1	55593	OTUD5
63874	ABHD4	119559	SFXN4	23002	DAAM1
79154	DHRS11	4000	LMNA	51665	ASB1
64714	PDIA2	51251	NT5C3A	2869	GRK5
9609	RAB36	6622	SNCA	6583	SLC22A4
8310	ACOX3	84971	ATG4D	54469	ZFAND6
343	AQP8	84465	MEGF11	4668	NAGA
8722	CTSF	7001	PRDX2	2035	EPB41
9246	UBE2L6	94103	ORMDL3	23119	HIC2
89797	NAV2	81558	FAM117A	6708	SPTA1

6710	SPTB	51761	ATP8A2	84787	KMT5C
85300	ATCAY	2145	EZH1	144108	SPTY2D1
23456	ABCB10	598	BCL2L1	3386	ICAM4
57636	ARHGAP23	220972	MARCH8	23295	MGRN1
23645	PPP1R15A	2330	FMO5	6536	SLC6A9
132	ADK	7975	MAFK	80737	VWA7
54620	FBXL19	5027	P2RX7	23558	WBP2
5866	RAB3IL1	402682	UFSP1	5498	PPOX
3565	IL4	57446	NDRG3		
55062	WIPI1	2055	CLN8		
115330	GPR146	54	ACP5		
5336	PLCG2	340348	TSPAN33		
51257	MARCH2	81889	FAHD1		

Table S7: Geneset “p53 pathway”

Geneset used for GSEA analysis performed with desktop application
www.broadinstitute.org/gsea.

Gene	Name	Gene	Name
6477	SIAH1	9134	CCNE2
27244	SESN1	7157	TP53
55240	STEAP3	317	APAF1
1647	GADD45A	896	CCND3
8795	TNFRSF10B	5728	PTEN
1643	DDB2	50484	RRM2B
64326	RFWD2	7161	TP73
3486	IGFBP3	9133	CCNB2
51246	SHISA5	7249	TSC2
1029	CDKN2A	64065	PERP
9540	TP53I3	3479	IGF1
63970	TP53AIP1	545	ATR
83667	SESN2	85417	CCNB3
10912	GADD45G	11200	CHEK2
894	CCND2	983	CDK1
4193	MDM2	5366	PMAIP1
841	CASP8	56475	RPRM
5268	SERPINB5	595	CCND1
3732	CD82	6241	RRM2
5054	SERPINE1	7057	THBS1
54205	CYCS	8493	PPM1D
836	CASP3	1111	CHEK1
891	CCNB1	472	ATM
2810	SFN	64393	ZMAT3
9538	EI24	355	FAS
842	CASP9	1019	CDK4
900	CCNG1	4616	GADD45B
143686	SESN3	27113	BBC3
1026	CDKN1A	898	CCNE1
637	BID	901	CCNG2
581	BAX	1017	CDK2
25898	RCHY1	1021	CDK6
51512	GTSE1	4194	MDM4

Table S8: Quantification of nucleolus species according to erythroid cell maturation. Species are numbered from transmission electron microscopy microphotograph erythroblasts isolated from bone marrow. Proerythroblasts (proE; n=16), basophilic erythroblasts (basoE; n=17), polychromatic erythroblasts (polyE, n=13), orthochromatic erythroblasts (orthoE; n=6).

	Active		Ring-shaped		Micronucleolus		Invisible	Number of nucleolus/ cell
ProEB	16/16	100%	0/16	0%	0/16	0%	0	1.5
BasoEB	14/17	82%	2/17	12%	1/17	6%	0	1
PolyEB	0/13	0%	4/13	31%	9/13	69%	3	1
OrthoEB	0/6	0%	0/6	0%	6/6	100%	4	1

Supplementary references

de la Cruz J, Karbstein K, Woolford JL Jr. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:93-129.

Ferreira-Cerca S, Pöll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell.* 2005 Oct 28;20(2):263-75.

Rabl J, Leibundgut M, Ataide SF, Haag A, Ban N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science.* 2011 Feb 11;331(6018):730-6

Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science.* 2011 Nov 18;334(6058):941-8.

IV. Conclusion

L'objectif principal de ce travail de thèse était de caractériser la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse normale. L'altération des ribosomes est directement impliquée dans l'atteinte érythroïde des ribosomopathies telles que l'anémie de Blackfan-Diamond et le syndrome 5q-. De nombreuses études se sont focalisées sur les mécanismes physiopathologiques de l'altération des ribosomes dans les ribosomopathies, mais aucune n'a exploré le rôle des ribosomes au sein de l'érythropoïèse en conditions physiologiques. Pour cela, nous avons développé une technique de protéomique (Pulse Silac) permettant d'identifier et de mesurer le renouvellement des protéines ribosomiques au sein d'échantillons d'érythroblastes primaires humains issus de sang de cordon ombilical. Nos résultats montrent une diminution drastique de la biogenèse des ribosomes lors de la différenciation érythroïde terminale, à partir du stade érythroblaste basophile. Pour étudier le rôle des ribosomes au cours de l'érythropoïèse, nous avons provoqué un arrêt prématuré de la biogenèse des ribosomes par l'utilisation d'un inhibiteur de l'ARN polymérase I, le CX-5461, au début de la différenciation érythroïde. Nos résultats montrent que l'inhibition précoce de la transcription de l'ARNr par le CX-5461 induit une accélération de la différenciation érythroïde, révélant ainsi un lien entre la biogenèse des ribosomes et le processus de l'érythropoïèse. Ensuite, nous avons exploré les déterminants de la différenciation érythroïde lorsque la biogenèse des ribosomes s'arrête. L'arrêt de la biogenèse des ribosomes, qu'elle soit spontanée ou induite par le CX-5461, est concomitante à une activation de la protéine p53. En intégrant des données de ChIP-seq et de transcriptomique réalisés dans les érythroblastes traités ou non avec le CX-5461, nous avons mis en évidence l'activation d'un programme transcriptionnel de p53 spécifique des gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Enfin, nous avons exploré le mécanisme d'activation de p53 lors de l'arrêt de la biogenèse des ribosomes. La phosphorylation de CHK1 sur la sérine 345, concomitante à l'activation de p53, et l'inhibition de l'activation de p53 par un inhibiteur spécifique d'ATR suggèrent l'implication de la voie de réparation ATR/CHK1/p53. De plus, au cours de la différenciation érythroïde, la structure du nucléole, lieu de biogenèse du ribosome, évolue de nucléoles multiples, de grande taille et actifs, vers un micronucléole constitué de composé granulaire inactif. Nous faisons l'hypothèse que la différenciation érythroïde pourrait provoquer un stress nucléolaire correspondant à un dommage à l'ADN

ribosomique, induisant un arrêt du cycle cellulaire et l'activation de la voie de réparation ATR/CHK1/p53.

Partie II : La régulation de la biogenèse des ribosomes et de la traduction au cours de l'érythropoïèse pathologique

I. Problématique

Dans les ribosomopathies anémie de Blackfan-Diamond (ABD) et syndrome 5q-, l'anémie est un symptôme majeur. La spécificité de l'atteinte érythroïde lorsque la biogenèse des ribosomes est altérée demeure un sujet de questionnement. Dans ces pathologies, l'atteinte d'une RP en particulier entraîne un déséquilibre stoechiométrique entre toutes les RPs. Les conséquences fonctionnelles de ce déséquilibre mènent à deux hypothèses : (i) le déficit quantitatif d'une RP pourrait ne pas interférer avec la biogenèse et aboutir à la production de ribosomes hétérogènes, par une composition en RPs différente, ou par des modifications post-traductionnelles des RPs et des ARNr différentes. Ces ribosomes « spécialisés » auraient une affinité spécifique pour certains ARNm (Ruvinsky et al., 2005). (ii) L'altération d'un composant ribosomique pourrait interférer avec la biogenèse et conduire à une diminution globale de la quantité de ribosomes fonctionnels et une variation de l'efficacité de traduction de certains groupes d'ARNm (Quin et al., 2016). Dans ces conditions, la traduction devient sélective.

Des travaux réalisés dans des modèles d'haploinsuffisance des gènes *RPS19* et *RPS14*, montrent une sélectivité de la traduction qui dépend du facteur de transcription érythroïde GATA-1 (Gilles et al., 2017; Ludwig et al., 2014). Selon l'équipe de Vijay Sankaran, l'altération de la traduction de GATA-1 pourrait dépendre de sa structure secondaire en 5'UTR (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014). Cependant, les mécanismes généraux qui gouvernent la sélectivité de la traduction lorsque la biogenèse des ribosomes est altérée sont encore discutés (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014).

II. Objectifs

Les objectifs de ces travaux sont donc d'étudier les paramètres qui gouvernent globalement la traduction protéique dans un contexte d'altération de la biogenèse des ribosomes.

Pour cela, nous avons établi un modèle de lignée cellulaire UT-7 et K562 dont l'expression du gène *RPS14* est ciblée par stratégie *shARN*. Dans un premier temps, nous avons caractérisé ces modèles en analysant l'impact de l'inhibition de *RPS14* sur la production des ribosomes, et sur la traduction du facteur de transcription érythroïde GATA1. Dans ce travail, ma contribution fut d'analyser la production des ribosomes dans le modèle UT-7 *shRPS14* et d'étudier, à titre de validation, de l'expression de GATA1 dans les érythroblastes primaires humains exprimant le *shRPS14*.

Dans un second temps, nous avons comparé le transcriptome, traductome et protéome de ces modèles cellulaires. L'intégration de toutes ces données a servi de base à la définition des caractéristiques des transcrits qui contrôlent l'efficacité de traduction lorsque le contenu cellulaire en ribosomes est diminué.

III. Résultats

Codon usage, mRNA length and 3'UTR structure govern the translation selectivity in limiting ribosome availability condition

Ismael Boussaid,^{1,2,3,4} Salomé Le Goff,^{1,2,3,4,5} Célia Floquet,^{1,2,3,4} Emilie-Fleur Gautier,^{5,6} Pierre-Julien Viailly,⁷ Anna Raimbault,^{1,2,3,4} Dina Al Dulaimi,^{1,2,3,4} Isabelle Dusanter,^{1,2,3,4} Isabelle Hatin,⁸ Patrick Mayeux,^{1,2,3,4,5,6,*} Bertrand Cosson,^{9,*} Michaela Fontenay.^{1,2,3,4,5,10¶}

¹Institut Cochin, Department Development, Reproduction, Cancer, Paris, France

²INSERM U1016, Paris, France

³CNRS UMR8104, Paris, France

⁴Université Paris Descartes, Sorbonne-Paris Cité, Paris, France

⁵Laboratoire d'excellence du Globule Rouge GR-Ex, Université Paris Descartes, Paris, France

⁶Proteomic platform 3P5, Université Paris Descartes, Paris, France

⁷Centre Henri-Becquerel, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Haute Normandie, INSERM U1245, Rouen, France

⁸Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Centre de l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

⁹ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Epigenetics and Cell Fate, UMR7216, CNRS, 35 rue Hélène Brion, 75013, Paris, France

¹⁰Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris Centre – Cochin, Service d'hématologie biologique, Paris, France

*Senior co-authors

¶Correspondence: Michaela Fontenay (michaela.fontenay@inserm.fr)

Summary

In ribosomopathies, Diamond-Blackfan anemia or 5q- syndrome, ribosomal protein genes are affected by mutation or deletion and bone marrow erythroid hypoplasia is dominating. Unbalanced production of ribosome subunits leading to limited ribosome availability regulates translation at the expense of the master erythroid transcription factor *GATA1* and erythroid differentiation program. We show that the transcript length, codon adaptation index (CAI) of the coding sequence (CDS) and 3'UTR structure are the key determinants of translation selectivity in cells affected by the downregulation of one RPS or RPL. In these conditions, short transcripts with structured 3'UTR and high CAI had decreased translation efficiency. An integrated analysis of transcriptome and proteome confirms that the post-transcriptional regulation of gene expression is directly linked to criteria governing translation selectivity. Proteins involved in normal erythroid differentiation share determinants of translation selectivity. Our results suggest that an interplay between CDS and UTR end characteristics could regulate mRNA translation.

Keywords

translation, ribosomopathies, GATA1, ribosomal protein, 5'UTR, 3'UTR, codon adaptation index, erythropoiesis.

Introduction

Haploinsufficiency or mutation of ribosomal protein (RP) genes in diseases called “ribosomopathies” results in the alteration of the translation capacity of the ribosome. Diamond-Blackfan anemias (DBA) are caused by heterozygous loss-of-function mutations in one of 18 different RP genes (Mirabello et al., 2017), while the haploinsufficiency of RPS14 gene accounts for the erythroid phenotype of the 5q- syndrome (Ebert et al., 2008; Schneider et al., 2016). In these diseases, the bone marrow erythroid lineage is commonly hypoplastic leading to the search for the mechanisms underlying a specific dysregulation of translation. Two models have been proposed to explain the specific phenotypes observed (Mills and Green, 2017). In a first model, changes in cellular ribosome concentration relative to mRNA levels may cause changes in the translation efficiency of different classes of mRNAs due to competition for ribosomes among the cellular mRNA complement (Lodish, 1974; Mills and Green, 2017). In a second model, specialized ribosomes with a different RP composition or with RPs or rRNA modifications, could be responsible for changes in interaction with mRNA or RNA Binding Proteins (RBPs) and tissue-selective translation (Xue and Barna, 2012; Imami et al., 2018).

Recent evidence coming from cellular models of DBA by expressing a shRNA to RPS19 or somatic 5q- syndrome by expressing a shRNA to RPS14 (Ludwig et al., 2014; Gilles et al., 2017; Khajuria et al., 2018) supports the first mechanism and a role for unbalanced production of ribosome subunits in the defective translation of GATA1, a master transcription factor that is required for the commitment of hematopoietic progenitors to the erythroid lineage and their differentiation into erythroblasts (Pevny et al., 1991). Translational decrease of GATA1 transcript could depend on the structure of its 5'UTR (Ludwig et al., 2014; Khajuria et al., 2018). A global assessment of the rules governing translation specificity when ribosome production is diminished is needed.

In this study, we investigated mechanisms that regulate translation in conditions of limited ribosome availability and their contribution to the normal human erythroid differentiation process. To address this question, we analyzed the transcripts expressed on the ribosome in conditions of RP downregulation in cell lines and primary cells. Our results indicate that the length of transcripts, the codon usage and the structure of 3'UTR are the key factors governing the translation selectivity under an imbalance of ribosome production.

Results

Limited ribosome availability lead to a translational defect of GATA1

To investigate the regulation of GATA1 gene expression in the context of RPS14 downregulation, we first established stable UT-7/EPO shRPS14 cell lines via a lentiviral transduction (**Figure 1A**). RPS14 mRNA expression was decreased at 3 days post-induction and cells accumulated in G1 phase with an increased level of apoptosis and a decreased expression of glycophorin A (GPA) (**Figure 1B & Figures S1A-C**). As expected, the 18S/28S ratio was diminished (**Figure 1C**). We assessed the quantity of ribosomes by label-free mass spectrometry (MS), which enabled the absolute quantification of RPs in these cells with histone signals as an internal calibrator (Gautier et al., 2016; Wiśniewski et al., 2014). As shown in **Figure 1D**, the quantity of RPSs, expressed as fold-change (FC) of copy number per cell, was decreased by 50% in the UT-7/EPO shRPS14 cell lines compared to shSCR cell line (**Table S1**). By contrast, the quantity of RPs of the large subunit (RPL) was less affected suggesting an unbalanced expression of RPs. We then performed polysome profiling of UT-7/EPO shRPS14 cell lines, which indicated a strong reduction or an absence of the free small subunit (FSSU) 40S and a relative increase of the free large subunit (FLSU) 60S. The entire

80S ribosome was reduced and the height of polysome peaks was lower showing that a RPS14 downregulation results in a decrease of translating ribosome content (**Figure 1E**).

The regulation of protein cellular levels can be achieved by controlling mRNA translation rate. To test this, we collected the sub-fractions corresponding to 40S, 60S, 80S, light and medium polysomes with 2-5 ribosomes on an mRNA, and heavy polysomes that contain >5 ribosomes on an mRNA. Other than 40S, the sub-fractions were pooled as fraction I representing 60S and 80S, fraction II representing light and medium polysomes and fraction III representing heavy polysomes. We then compared the abundance of GATA1 and MYC mRNA in each fraction. As shown in **Figure 1F**, GATA1 mRNA was less abundant in the heavy polysomes of fraction III in shRPS14 cells and had shifted to lighter fractions I and II although its expression was unchanged in whole cell lysates (**Figure S1D**). This suggests that a majority of GATA1 transcripts carried a lower number of ribosomes. By contrast, the MYC mRNA profile did not vary between conditions in any of the fractions (**Figure 1G**). Consistent with decreased GATA1 protein expression (**Figure 1H**), the transcriptomic analysis of the UT-7/EPO shRPS14 cell lines indicated a significant modulation of GATA1 target genes including a decreased expression of the majority of the activated GATA1 targets (**Figure 1I; Figures S1E-G; Table S2**). We confirmed the decrease of GATA1 translation in stable K562 shRPS14 cell lines (**Figures S1H-N**). The expression of GATA1 was also decreased in human primary erythroblasts infected by pLenti X1 non-inducible shRPS14 vector, which demonstrated a lower percentage of GPA⁺ cells and an increased percentage of Trypan-blue⁺ cells at 4 days post-infection (**Figure 1J-N**). Immunofluorescence also revealed a lower signal intensity of GATA1 staining in del(5q) MDS erythroblasts compared to control cells (**Figure S1O**). By contrast, the MILE transcriptomic data showed normal GATA1 transcript levels in MDS with del(5q) (**Figure S1P; Mills et al., 2009**). Taken together, these

findings indicate that RPS14 downregulation induces a decrease of ribosome availability that leads to a selective translation at the expense of GATA1.

Global assessment of translation in limited ribosome availability conditions.

To assess translation regulation as a whole in the UT-7/EPO and K562 shRPS14 cell models, we utilized Affymetrix HTA 2.0 microarrays to profile the mRNAs present on heavy polysomes referred to as the translome (Larsson et al., 2013) (**Figure 2A**). We first examined the relationship between the transcripts differentially expressed in the translome and transcriptome from the UT-7/EPO shRPS14 and shSCR cell lines and we found a weak but significant correlation (**Figure 2B**; Spearman test; $r=0.286$; $P<0.0001$; **Table S1**). This weak correlation has been reported in other models of ribosomopathy (Khajuria et al., 2018). A comparative analysis of the translome related to the transcriptome by calculating a ratio of fold change $FC_{\text{translome}}/FC_{\text{transcriptome}}$ allowed determining transcripts with the largest variations of translational efficiency (ΔTE) (**Figure 2C**). In particular, GATA1 mRNA was among the transcripts with the more downregulated TE (**Figures 2B, 2C**). Gene set enrichment analysis (GSEA) coupled to enrichment map visualization was used to annotate differentially enriched biological pathways of the translome and transcriptome. With a Cytoscape representation (**Figure 2D**; **Table S3**), we showed that the upregulated gene sets in the translome were grouped together as clusters which biological pathway annotation included cell cycle and proliferation regulation, DNA repair and apoptosis, RNA processing and translation. Conversely, the downregulated gene sets were poorly clustered. Transcriptome data showed few upregulated gene sets involved in RNA polymerase I regulation and few downregulated gene sets involved in cell proliferation and steroid biogenesis. A Gene Ontology (GO) term enrichment analysis of significantly up and

downregulated genes in translome and transcriptome confirmed these findings (**Figure S2 & Table S3**). Second, the most differentially up- or downregulated transcripts in the translome and transcriptome were selected (**Figure 2E**). A higher number of the transcripts varied in the polysomes compared to transcripts of the transcriptome (**Figure 2F**), with a little overlap between the up- and downregulated genes in the translome and transcriptome (**Figure 2G**). Since these global expression analyses indicated an uncoupling of the translome and transcriptome, we conclude to a selective gene expression regulation at a translational level.

Codon Adaptation Index, coding sequence length and thermodynamic characteristics of 3'UTR govern translation selectivity in conditions of limited ribosome availability.

Multiple mechanisms of translation regulation are dependent on the mRNA sequence and structure (Leppek et al., 2018; Hanson and Collier, 2018; Miettinen and Björklund, 2015; Floor and Doudna, 2016). We first focused our analysis on the contribution of UTRs to translation selectivity in the UT7/EPO shRPS14 model. Secondary structures in mRNA UTRs are characterized by the enthalpy ΔG (fold energy) and the length which are highly correlated and the fold energy per base which relationship to the length is not linear, each of them influencing translation efficiency (**Figures S3A-B**). We took advantage of the availability of thermodynamic parameters (length and energy per base) of UTRs in the UCSC databases to establish the thermodynamic landscape of all the referenced 5' and 3'UTR in humans (**Figure S3B**) (Lorenz et al., 2011; Barrett et al., 2012). We compared the 5'UTR and 3'UTR parameters of the 100 transcripts that were the most upregulated or downregulated in the translome and transcriptome (**Figures 3A-C**). We observed that the 5'UTR energy per base was generally slightly stronger in the downregulated mRNAs on the polysomes but

similar between the up- and downregulated mRNAs in the transcriptome (**Figure S3C**). Our analysis revealed that the 5'UTR thermodynamic characteristics provide a poor separation of the up- and downregulated transcripts of the translome (**Figure 3B, middle**). Interestingly, the 3'UTR thermodynamic characteristics of the most up- or downregulated transcripts on the polysomes were fully distinctive (**Figure 3C**). A strong negative energy per base and short length of the 3'UTR characterized the genes that were downregulated on heavy polysomes, indicating that they were less translated in conditions of RPS14 downregulation (**Figure 3C, middle & Figure S3D**). By contrast, the 3'UTR thermodynamic characteristics of the up- or downregulated transcripts in the transcriptome were similar showing that this regulation took place at a translational level (**Figure 3C, left**).

An integrated analysis of the translome and transcriptome identified the transcripts with the largest Δ TE (**Figure 2C**). The 3'UTR, but not the 5'UTR characteristics efficiently distinguished the transcripts with the largest Δ TE from the others (**Figures 3B right & S3E**). The thermodynamic landscape visualized the degree of structuration of GATA1 UTRs in comparison with all the other human transcripts demonstrating that GATA1 transcript has a short and unstructured 5'UTR and a short and highly structured 3'UTR. The 3'UTR parameters of GATA1 caused it to cluster with the transcripts downregulated on the polysomes and a low TE (**Figure 3C, middle & right**).

The length of entire transcript encompassing UTRs and coding sequence (CDS) distinguished transcripts with the more up and downregulated TE better than the length of the 3'UTR (**Figure S3E**). Transcript length and 3'UTR structure separated up- and downregulated transcripts and categorized GATA1 among the shortest transcripts with a structured 3'UTR (**Figure 3D**). We gated on four groups of transcripts for a GSEA (**Figure 3D**). The selected gene set with longer size and less structured 3'UTR was significantly enriched in the translome (gate II, NES=3.29; FDR<0.001; P<0.001), but not in the transcriptome. The gene

set with shorter transcript length and more structured 3'UTR was significantly depleted of the translome (gate III, NES=-2.38; FDR<0.001; P<0.001), but not in the transcriptome (**Figure 3E**). The gene sets in gates I and IV did not demonstrate any significant variations. Thus, the thermodynamic characteristics of the 3'UTR and the CDS+UTR length of transcripts may account for translation selectivity.

In addition to length and structure, several studies demonstrated that codon content was a key determinant of mRNA translation (Gardin et al., 2014; Hanson et al., 2018; Ingolia et al., 2009; Pechmann and Frydman, 2013). The codon usage in transcripts can be quantified by the CDS composition in optimal codons defined by the Codon Adaptation Index (CAI) (Sharp and Li, 1987; Puigbò et al., 2008). This characteristic has been shown to influence the ribosome elongation speed, the mRNA stability and the co-translational folding of nascent protein (Presnyak et al., 2015; Yu et al., 2015; Radhakrishnan et al., 2016). Compared to the CAI of all human transcripts, we found that the CDS composition in optimal codons was totally different in transcripts with up- or downregulated TE, transcripts with up-regulated TE having a low CAI whereas transcripts with a downregulated TE having a high CAI. Accordingly, GATA1 mRNA had a high CAI like all other transcripts which were downregulated on polysomes (**Figure 3F**). Finally, we confirmed all these translational regulation by performing the same analysis on the translome in a second model K562 shRPS14 (**Figure S3F**).

We then extended our analysis to DBA models taking advantage of previously published transcriptome and translome datasets in shRPL5 or shRPS19 primary human or Rps19 and Rpl5 murine erythroblasts (Khajuria et al., 2018; Horos et al., 2012). Despite the cell types, targeted RP and methods were different, the Δ TE across the models was significantly correlated (**Figure S3G**). In shRPL5/shRPS19 human primary erythroblasts, the Δ TE was upregulated for transcripts with a weak energy per base of the 3'UTR but not the 5'UTR, a

long transcript size and a low CAI (**Figure 3G and S3H**) as shown in UT-7 or K562 shRPS14 cell lines (**Figure S3C-F**). In murine fetal liver shRps19 or shRpl11 erythroblasts, a structured 5'UTR and a structured 3'UTR were significantly less represented on the polysome (**Figure 3H & Table S1**). Finally, targeting of the FSSU was more deleterious for the translation of mRNAs with structured 5'UTR translation than targeting of the FLSU (**Figure S3I**). Altogether these data show the translation selectivity depended on transcript length, 3'UTR structure and CAI. Furthermore these data show that translation selectivity was related to a common decrease of the cellular content in ribosome rather than a defect in one particular RP.

Codon Adaptation Index, coding sequence length and thermodynamic characteristics of UTRs are key determinants of translation in normal erythropoiesis.

Clinical manifestations in ribosomopathies are linked to the cell-specific impact of mutations. In particular, impaired erythropoiesis could be at least partly related to the translation default of GATA1 (Ludwig et al., 2014). To get further insights into the translation regulation during normal erythroid maturation, we investigated the characteristics of the transcripts in the proteome datasets from human erythroblasts at different steps of differentiation and red blood cells, and translome datasets from healthy donor reticulocytes (Gautier et al., 2016, 2018; Mills et al., 2016). We found that a high CAI and a short transcript length were the characteristics of the transcripts corresponding to the most produced proteins in reticulocytes or red blood cells (**Figures 4A & 4B**). Interestingly, in models of limited ribosome availability, transcripts sharing these characteristics were no more translated. More generally, a high CAI, a short transcript length and an unstructured 5' and 3' UTR were the characteristics of transcripts corresponding to proteins which expression increased along

normal erythroid differentiation (**Figures 4C and S4**). Altogether, these results indicate that the transcripts encoding proteins that accumulate along normal erythropoiesis shared determinants of translation selectivity which were highlighted in conditions of limited ribosome availability.

Proteome and transcriptome analyses confirm identified rules and point a post-translational regulation of RPs

Because the number of ribosomes associated to an mRNA depends on the length of the mRNA, studying the transcripts present on heavy polysomes could favor the identification of the longest mRNAs. To eliminate a putative bias, we performed an indirect measurement of translation by an integrated analysis of whole proteome and transcriptome in the UT7/EPO model. The $\log_2(\text{FC})$ of the proteins was plotted to the $\log_2(\text{FC})$ of the transcripts to identify components that underwent a post-transcriptional regulation (**Figure 5A & Table S1**). To evaluate post-transcriptional changes, we selected elements which expression was inversely regulated in the proteome and transcriptome with a ratio $\text{FC}_{\text{proteome}}/\text{FC}_{\text{transcriptome}} > 1.5$ or < -1.5 . First, we confirmed that the post-transcriptional changes identified by the proteome analysis were predicted by the ΔTE analysis. Post-transcriptionally upregulated elements had an upregulated TE while post-transcriptionally downregulated expression in the proteome had a downregulated TE highlighting that post transcriptional changes at proteome level directly results from translation selectivity. This also demonstrates that observed ΔTE were not only associated to changes in translational occupancy but also to changes in protein quantities (**Figure 5B**). Furthermore, the post-transcriptionally downregulated components in the proteome were encoded by transcripts with a significantly more structured 3'UTR, a shorter

transcript length and a higher CAI than the post-transcriptionally upregulated components (**Figures 5C-E**).

RPs and translation elongation factors belong to a category of transcripts that contains a 5' terminal oligopyrimidine (TOP) tract (Thoreen et al., 2012). We found that the 5'TOP transcripts were significantly enriched in the translome but not in the transcriptome suggesting that the 5'TOP motif may facilitate their targeting to ribosomes (**Figure 5F, top & middle; Table S4**). By contrast, 5'TOP transcripts were downregulated at protein level (**Figure 5F, bottom**), indicating that the decrease of ribosomal proteins could be related to protein degradation. Interestingly, RP transcripts which mostly harbored a short and unstructured 3'UTR were recognized among the post-transcriptionally downregulated elements (**Figure S5**). Removing RPs from the analysis increased the concordance between Δ TE and protein expression level (**Figures 5B-E**). These results confirmed that the determinants of translation selectivity predicted by our translome analysis are relevant. A GO analysis of the post-transcriptionally up- or down-regulated elements (**Figure 5A**) showed that those which were upregulated, were involved in DNA replication, RNA processing and splicing (**Figure 5G**). The terms overlapped those identified by the GSEA and GO analyses of the transcripts upregulated in the translome (**Figures 2D and S2**). Post-transcriptionally downregulated elements were involved in translation, rRNA processing and maturation (**Figure 5G**).

A functional validation of the rules governing the translation in limited ribosome availability conditions.

To validate our findings, we first investigated the effect of CAI on translation. The dual luciferase vector we used contained two luciferases with distinct CAI, Fluc had a high CAI

whereas the Rluc had medium CAI compared to the spectrum of CAI in human transcripts. We engineered another vector containing the same luciferases in terms of amino acid sequences but with a switch of the nucleotide sequence of the Fluc to obtain a very low CAI (**Figure 6A, 6B & Figure S6**). As expected, the Fluc with low CAI was less expressed than the Fluc with high CAI in the shSCR condition (**Figure 6C**). After induction of shRPS14 640 or shRPS14 641, the Fluc with high CAI was highly repressed compared to the Rluc and the ratio Fluc/Rluc was deeply downregulated. By contrast, the Fluc with low CAI was less affected than the Rluc and the ratio Fluc/Rluc did not change (**Figure 6D**).

We then investigated the impact of 5' UTRs or 3'UTRs length and structure on the expression of a reporter in shRPS14 or shSCR K562 cell lines. The 5'UTR sequences were cloned upstream of the Renilla luciferase (Rluc) and, alternatively the 3'UTR sequences were cloned downstream of the Firefly luciferase (Fluc) (**Figure S6B**). Six different 5'UTRs of various length and energy per base from PADI4, ERG, KLF1, GATA1, CEBPA or FLI1 transcription factors were tested on the Rluc signal normalized to unmodified Fluc (**Figure 6E**). In SCR condition, the length and the structure of the 5'UTR appeared to be a major determinant of the expression of the Rluc (**Figure 6F**). In one hand, the short PADI4 and KLF1 5'UTR upregulated the Rluc/Fluc ratio compared to empty vector while the FLI1 5'UTR which was longer with a similar energy per base than KLF1 5'UTR repressed it. In the other hand, the ERG, GATA1 and CEBPA 5'UTR which had an increasing energy per base and a similar length more efficiently diminished the Rluc/Fluc ratio when more structured.

When each of the shRPS14 were induced by doxycyclin, the Rluc/Fluc ratios decreased with all 5'UTR constructs independently of length or structure compared to an empty vector suggesting a global shut-down of translation initiation (**Figure 6G**). This result confirms that 5'UTR structure poorly regulates translation in UT-7/EPO shRPS14 cells (**Figure 3B**).

Finally, we investigated the effect of 9 different 3'UTRs on Fluc expression. The 3'UTRs were selected among the most deregulated mRNAs both in Khajuria's and our translome datasets. STBPX2, GATA1, WDR18, KIF15, CHAC1, CENPF, RECQL, VAT1 and ACSL4 genes exhibited a wide panel of 3'UTR with distinct structure and length (**Figure 6H**). In shSCR K562 cells and compared to empty vector, the Fluc/Rluc ratios were decreased according to the 3'UTR length but not according to the structure (**Figure 6I**). After induction of shRPS14, we denoted a clear rescue of the Fluc/Rluc ratio associated with the transfection of a long or unstructured or both 3'UTR (**Figure 6J**).

Altogether these results validated the observations of our global investigation of translation rules in limited ribosome availability conditions.

Discussion

RP depletion has been recognized as a principal cause of erythroid hypoplasia either in acquired del(5q) MDS or DBA (Ebert et al., 2008; Farrar et al., 2011). The specific impairment of erythroid lineage has been linked to a decreased representation of GATA1 transcript on polysomes in conditions of an RPS19, RPL5, RPL11 or RPS14 haploinsufficiency (Gilles et al., 2017; Ludwig et al., 2014). Our results indicate that in addition to a reduction of GATA1 mRNA on polysomes, translation as a whole is selective under conditions of low ribosome availability in cells with downregulation of one RP.

Translation efficiency is thought to depend on the thermodynamic properties of a given transcript (Barrett et al., 2012; Tuller et al., 2010). For instance, the presence of an IRES in BAG1 or CSDE1 or the length of 5'UTR of BCAT1 have been implicated in their disrupted translation when RPL11 or RPS19 is haploinsufficient (Horos et al., 2012; Pereboom et al., 2014). The structure of 5'UTR in GATA1 mRNA has been linked to its translation

downregulation in the context of RPS19 haploinsufficiency. However, depending on which transcripts GATA1 mRNA was compared with, its 5'UTR was considered either highly structured or unstructured (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014). Our visualization of the thermodynamic landscape allowed establishing that, in comparison to all other human 5'UTR sequences, GATA1 5'UTR is short and unstructured. Thanks to a global investigation of all the determinants of translation selectivity in two shRPS14 cell line models, we found that short mRNAs with a high codon adaptation index, a high folding energy per base and a short 3'UTR, and to a far lesser extent, transcripts with a high energy per base of 5'UTR were specifically less translated. GATA1 mRNA belongs to the group of the shortest transcripts with high CAI, a highly structured 3'UTR and a less structured 5'UTR. We confirm our findings in published ribosome profiling data of shRPS19/shRPL5 human primary erythroblasts and translome data of shRps19/shRpl11 murine fetal liver erythroblasts (Horos et al., 2012; Khajuria et al., 2018). Interestingly, targeting a RPS rather than a RPL affected the translation of mRNA with a structured 5'UTR. This observation highlighted the crucial role of FSSU in initiation and scanning along the 5'UTR (Archer et al., 2016).

Thus the rules of translation selectivity were conserved across the different models of RP deficiencies demonstrating that translation selectivity was rather linked to the decrease of the cellular content in ribosome than linked to the defect of one particular RP. Interestingly, proteins whose transcripts displayed these characteristics accumulate during normal erythropoiesis suggesting that such a combination of parameters may allow a high protein expression level in a short time. Consistently, the high CAI confers a high speed of elongation and a long half-life to these transcripts (Presnyak et al., 2015; Radhakrishnan et al., 2016; Yu et al., 2015). Further experiments are required to investigate the interplay between CDS and UTRs and its role in the control of mRNA stability and translation. Understanding these processes would permit an optimization of gene expression in some diseases.

Several studies have already highlighted the contribution of 3'UTR length to the regulation of translation (Miettinen and Björklund, 2015; Tanguay and Gallie, 1996). Highly translated mRNAs have the ability to form a loop through interactions between polyA binding proteins and initiation factors that brings the 5' and 3' ends in communication (for review, Vicens et al., 2018). It has been suggested that ribosomes may move through the 3'UTR to support recycling and re-initiation of another loop of translation at the 5'UTR (Brojna and Wen, 2009; Miettinen and Björklund, 2015). A small distance between 3' and 5' ends would be an advantage for the recycling re-initiation process (Fernandes et al., 2017). We speculate that a short and structured 3'UTR by reducing the distance between 3' and 5' ends would contribute to increase translation efficiency. In agreement with this hypothesis, recent evidence showed that the depletion of the ribosome recycling/re-initiation protein ABCE1 tended to arrest ribosomes on transcripts with short and highly structured 3'UTR (Sudmant et al., 2018; Young et al., 2015). These transcripts which have similar characteristics to those we found preferentially translated during normal erythropoiesis could be privileged for the recycling/re-initiation process. In conditions of RPS14, RPL5 and RPS19 downregulation, the translation of transcripts with short and structured 3'UTR was decreased. Therefore, in conditions of limited ribosome availability, re-initiation could no longer occur normally and terminating ribosomes should be released to feed the depleted cellular pool. Interestingly, overexpression of ribosome rescue factors PELO/HBS1L in RPS19 haplo-insufficient K562 cell line, restored hemoglobin levels (Mills et al., 2016). Whether such a mechanism may compensate for the loss of ribosomes in the disease caused by RPS14 haploinsufficiency requires further investigations.

The fact that shortest transcripts were also less present at polysomes under conditions of low ribosome availability has been reported in several studies in yeast and human where RP genes RPS19, RPL5, RACK1 or RPS26 were mutated or deleted (Ferretti et al., 2017; Thompson

and Gilbert, 2017; Thompson et al., 2016). This finding contrasts sharply with what is observed under normal conditions in a wide range of eukaryotic organisms, in which the shortest transcripts are more easily translated than the longest mRNAs (Arava et al., 2003). The translation initiation rate, density of ribosomes on the transcript and protein abundance usually negatively correlates with the CDS length (Weinberg et al., 2016). In addition, a high density of ribosomes on short transcripts contributes to the efficiency of their translation (Arava et al., 2003; Thompson and Gilbert, 2017; Thompson et al., 2016). Recent computational analyses have shown that the recycling/re-initiation process could account for the high density of ribosomes and efficient translation of short mRNAs (Fernandes et al., 2017; Rogers et al., 2017). In our study, the severe defect in the translation of the shortest transcripts could be explained by a diminution of re-initiation. The same reasoning could be applied to explain why high CAI transcripts were more affected by the limiting ribosome availability than low CAI. Under normal conditions, high CAI is an advantage for having access to this process of recycling/re-initiation thanks to a faster elongation rate (Fernandes et al., 2017).

In conclusion, the rate of protein synthesis depends on a complex network of regulatory elements implicating the expression level of an mRNA, the cellular concentration of ribosomes, the mRNA length, the density of ribosomes and the initiation and termination rates (Lodish, 1974; Mills and Green, 2017). Our study indicates that, when the ribosome concentration becomes a limiting factor, mRNAs translation is selective depending on mRNA CAI, length and 3'UTR structure. Further investigations are required to understand how the cellular ribosome concentration modifies translation initiation, translation termination and ribosome recycling to make the link between the genetic alteration of an RP and the impaired translation in erythroid cells.

Acknowledgements

The authors want to acknowledge Dr Narla Mohandas, Dr Olivier Kosmider and Dr Christian Bastard for very helpful discussions. They also want to thank Dr Franck Letourneur from the genom'IC platform, Florent Dumont, bioinformatician funded by the Site de recherche intégrée sur le cancer (SIRIC) CAncer Research for PErsonalized Medicine CARPEM, Alice Rousseau for technical assistance and Marjorie Leduc from the 3P5 proteomic platform of Paris Descartes University. This study was funded by INSERM, by the Institut National du Cancer (INCa) and the Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS) of the French Ministry of Social Affairs and Health through the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC MDS-04: INCa-DGOS_5480). SLG is the recipient of a PhD funding from the Laboratory of Excellence on red cells GR-Ex.

Author contributions

IB designed the study, performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; SLG, CF, DAD, AR, E-FG, P-JV performed the experiments and analyzed the data; IH, ID, PM analyzed the data and reviewed the manuscript; BC: designed the study and analyzed the data; MF designed the study, analyzed the data, supervised the work and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure

The authors have no competing financial interest to disclose.

References

- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O., and Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3889–3894.
- Archer, S.K., Shirokikh, N.E., Beilharz, T.H., and Preiss, T. (2016). Dynamics of ribosome scanning and recycling revealed by translation complex profiling. *Nature* 535, 570–574.
- Barrett, L.W., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 3613–3634.
- Brogna, S., and Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 107–113.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., et al. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339.
- Farrar, J.E., Vlachos, A., Atsidaftos, E., Carlson-Donohoe, H., Markello, T.C., Arceci, R.J., Ellis, S.R., Lipton, J.M., and Bodine, D.M. (2011). Ribosomal protein gene deletions in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 118, 6943–6951.
- Fernandes, L.D., Moura, A.P.S. de, and Ciandrini, L. (2017). Gene length as a regulator for ribosome recruitment and protein synthesis: theoretical insights. *Sci. Rep.* 7, 17409.
- Ferretti, M.B., Ghalei, H., Ward, E.A., Potts, E.L., and Karbstein, K. (2017). Rps26 directs mRNA-specific translation by recognition of Kozak sequence elements. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 700–707.
- Floor, S.N., and Doudna, J.A. (2016). Tunable protein synthesis by transcript isoforms in human cells. *ELife* 5.
- Gardin, J., Yeasmin, R., Yurovsky, A., Cai, Y., Skiena, S., and Futcher, B. (2014). Measurement of average decoding rates of the 61 sense codons in vivo. *ELife* 3.
- Gautier, E.-F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonnet, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.-C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* 16, 1470–1484.
- Gautier, E.-F., Leduc, M., Cochet, S., Bailly, K., Lacombe, C., Mohandas, N., Guillonnet, F., El Nemer, W., and Mayeux, P. (2018). Absolute proteome quantification of highly purified populations of circulating reticulocytes and mature erythrocytes. *Blood Adv.* 2, 2646–2657.
- Gilles, L., Arslan, A.D., Marinaccio, C., Wen, Q.J., Arya, P., McNulty, M., Yang, Q., Zhao, J.C., Konstantinoff, K., Lasho, T., et al. (2017). Downregulation of GATA1 drives impaired hematopoiesis in primary myelofibrosis. *J. Clin. Invest.* 127, 1316–1320.

- Hanson, G., and Collier, J. (2018). Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 20–30.
- Hanson, G., Alhusaini, N., Morris, N., Sweet, T., and Collier, J. (2018). Translation elongation and mRNA stability are coupled through the ribosomal A-site. *RNA N. Y. N* 24, 1377–1389.
- Horos, R., Ijspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I.P., et al. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* 119, 262–272.
- Imami, K., Milek, M., Bogdanow, B., Yasuda, T., Kastelic, N., Zauber, H., Ishihama, Y., Landthaler, M., and Selbach, M. (2018). Phosphorylation of the Ribosomal Protein RPL12/uL11 Affects Translation during Mitosis. *Mol. Cell* 72, 84–98.e9.
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., and Weissman, J.S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218–223.
- Khajuria, R.K., Munschauer, M., Ulirsch, J.C., Fiorini, C., Ludwig, L.S., McFarland, S.K., Abdulhay, N.J., Specht, H., Keshishian, H., Mani, D.R., et al. (2018). Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell* 173, 90–103.e19.
- Larsson, O., Tian, B., and Sonenberg, N. (2013). Toward a genome-wide landscape of translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012302.
- Leppek, K., Das, R., and Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 158–174.
- Lodish, H.F. (1974). Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis. *Nature* 251, 385–388.
- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F., and Hofacker, I.L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol. AMB* 6, 26.
- Ludwig, L.S., Gazda, H.T., Eng, J.C., Eichhorn, S.W., Thiru, P., Ghazvinian, R., George, T.I., Gotlib, J.R., Beggs, A.H., Sieff, C.A., et al. (2014). Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat. Med.* 20, 748–753.
- Miettinen, T.P., and Björklund, M. (2015). Modified ribosome profiling reveals high abundance of ribosome protected mRNA fragments derived from 3' untranslated regions. *Nucleic Acids Res.* 43, 1019–1034.
- Mills, E.W., and Green, R. (2017). Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science* 358.
- Mills, E.W., Wangen, J., Green, R., and Ingolia, N.T. (2016). Dynamic Regulation of a Ribosome Rescue Pathway in Erythroid Cells and Platelets. *Cell Rep.* 17, 1–10.

- Mills, K.I., Kohlmann, A., Williams, P.M., Wieczorek, L., Liu, W., Li, R., Wei, W., Bowen, D.T., Loeffler, H., Hernandez, J.M., et al. (2009). Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood* 114, 1063–1072.
- Mirabello, L., Khincha, P.P., Ellis, S.R., Giri, N., Brodie, S., Chandrasekharappa, S.C., Donovan, F.X., Zhou, W., Hicks, B.D., Boland, J.F., et al. (2017). Novel and known ribosomal causes of Diamond-Blackfan anaemia identified through comprehensive genomic characterisation. *J. Med. Genet.* 54, 417–425.
- Pechmann, S., and Frydman, J. (2013). Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 237–243.
- Pereboom, T.C., Bondt, A., Pallaki, P., Klasson, T.D., Goos, Y.J., Essers, P.B., Groot Koerkamp, M.J.A., Gazda, H.T., Holstege, F.C.P., Costa, L.D., et al. (2014). Translation of branched-chain aminotransferase-1 transcripts is impaired in cells haploinsufficient for ribosomal protein genes. *Exp. Hematol.* 42, 394–403.e4.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257–260.
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K.E., Graveley, B.R., et al. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160, 1111–1124.
- Puigbò, P., Bravo, I.G., and Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol. Direct* 3, 38.
- Radhakrishnan, A., Chen, Y.-H., Martin, S., Alhusaini, N., Green, R., and Collier, J. (2016). The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell* 167, 122–132.e9.
- Rogers, D.W., Böttcher, M.A., Traulsen, A., and Greig, D. (2017). Ribosome reinitiation can explain length-dependent translation of messenger RNA. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005592.
- Schneider, R.K., Schenone, M., Ferreira, M.V., Kramann, R., Joyce, C.E., Hartigan, C., Beier, F., Brümmendorf, T.H., Germing, U., Platzbecker, U., et al. (2016). Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat. Med.* 22, 288–297.
- Sharp, P.M., and Li, W.H. (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 15, 1281–1295.
- Sudmant, P.H., Lee, H., Dominguez, D., Heiman, M., and Burge, C.B. (2018). Widespread Accumulation of Ribosome-Associated Isolated 3' UTRs in Neuronal Cell Populations of the Aging Brain. *Cell Rep.* 25, 2447–2456.e4.
- Tanguay, R.L., and Gallie, D.R. (1996). Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* 16, 146–156.

- Thompson, M.K., and Gilbert, W.V. (2017). mRNA length-sensing in eukaryotic translation: reconsidering the “closed loop” and its implications for translational control. *Curr. Genet.* 63, 613–620.
- Thompson, M.K., Rojas-Duran, M.F., Gangaramani, P., and Gilbert, W.V. (2016). The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *ELife* 5.
- Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485, 109–113.
- Tuller, T., Waldman, Y.Y., Kupiec, M., and Ruppin, E. (2010). Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3645–3650.
- Vicens, Q., Kieft, J.S., and Rissland, O.S. (2018). Revisiting the Closed-Loop Model and the Nature of mRNA 5’-3’ Communication. *Mol. Cell* 72, 805–812.
- Weinberg, D.E., Shah, P., Eichhorn, S.W., Hussmann, J.A., Plotkin, J.B., and Bartel, D.P. (2016). Improved Ribosome-Footprint and mRNA Measurements Provide Insights into Dynamics and Regulation of Yeast Translation. *Cell Rep.* 14, 1787–1799.
- Wiśniewski, J.R., Hein, M.Y., Cox, J., and Mann, M. (2014). A “proteomic ruler” for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 13, 3497–3506.
- Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 355–369.
- Young, D.J., Guydosh, N.R., Zhang, F., Hinnebusch, A.G., and Green, R. (2015). Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3’UTRs In Vivo. *Cell* 162, 872–884.
- Yu, C.-H., Dang, Y., Zhou, Z., Wu, C., Zhao, F., Sachs, M.S., and Liu, Y. (2015). Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Mol. Cell* 59, 744–754.
- Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T.B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M.J., Orkin, S.H., et al. (2009). Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol. Cell* 36, 682–695.

Methods

Cell culture

Human erythroblasts were derived from CD34⁺ cord blood progenitors and infected by non-inducible GFP-pLenti X1 vector containing sh*RPS14* or shSCR. UT-7/EPO cell line was transduced by a scramble (SCR) or *RPS14* shRNA cloned in pLKO.1 Tet-On vector, selected with puromycin (1 mg/mL) and induced by doxycycline (0.2 µg/mL) for 3 days. Cord bloods and patient sample were obtained from the Centre d'Investigation Clinique Paris Descartes Necker Cochin through the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC MDS-04; INCa-DGOS-5480; IRB IdF 2753). Human CD34⁺ progenitors were purified on MidiMacs system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and cultured in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM, Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin (Life Technologies), and 15% bovine serum albumin insulin transferrin (BIT 9500) serum substitute (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). For amplification, CD34⁺ progenitors were cultured with 1U/ml interleukin-3 for 3 days, and with 100 ng/mL stem cell factor and 10 ng/mL interleukin-6 for 6 days. Recombinant EPO at 1U/ml was then added to the medium for the differentiation phase. The UT-7/EPO erythro-megakaryocytic cells were cultured in α Minimum Essential Medium (α MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), 1mM glutamine, 100UI/mL penicillin-streptomycin and 1 UI/mL EPO. K562 human erythroid cells (ATCC) were maintained at a density between 0.1 x 10⁶ and 1 x 10⁶ cells per milliliter in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1mM glutamine, 100UI/mL penicillin-streptomycin. Cytokines were purchased from Miltenyi Biotech and chemical products from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂.

Lentiviral vector

For UT-7 and K562 cell line infection, a scramble (SCR) control shRNA and *RPS14* shRNA (640 and 641) were cloned in pLKO.1 Tet-On vector. Cells were selected with puromycin (1 mg/mL). shRNA expression was induced by doxycycline (0.2 µg/mL) for 3 days (UT7) or 5 days (K562). For primary cell infection, sh*RPS14* (640 and 641) and shSCR were cloned in the non-inducible pLenti X1 vector encoding green fluorescent protein (GFP). Cells were sorted on GFP expression at 3 days after infection and harvested.

Quantitative proteomics

The label free quantification (LFQ) proteomic experiments has been performed as described previously (Gautier et al., 2016). Peptides were prepared from whole-cell lysates, using the filter-aided sample preparation (FASP) method essentially as previously described (Wisniewski et al., 2009). In the first experiment, peptides were pre-fractionated by strong cationic exchange (SCX) StageTips (Kulak et al., 2014). In the subsequent experiments, peptides were analyzed without prefractionation since the study did not require the quantification of proteins expressed to very low levels. Mass spectrometry (MS) analyses were performed on a Dionex U3000 RSLC nano-LC-system coupled to Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Peptides were separated on a C18 reverse-phase resin (75-mm inner diameter and 15-cm length) with a 3 h gradient. The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data-dependent scheme.

LFQ Data and Statistical Analyses

For data and statistical analyses, the MS data were processed by MaxQuant version 1.5.2.8 using human sequences from the Uniprot-Swiss-prot database (Uniprot, release 2015-02) with a false discovery rate below 1% for both peptides and proteins. Label-free protein quantification was done using unique and razor peptides. Bioinformatic analysis has been performed as described previously (Gautier et al., 2016) LFQ results from MaxQuant were imported into Perseus software (version 1.5.1.6). Protein copy numbers per cell were then calculated using the Protein ruler plugin of Perseus by standardization to the total histone MS signal (Wisniewski et al., 2009). In UT-7/EPO model only genes quantified in all replicates and all conditions were considered. Raw data have been deposited and processed data are provided in Table S1. Protein abundances for erythroid progenitors, precursors and mature stages were obtained from two previous studies of our team (Gautier et al. 2016).

Polysome profiling

At respectively 3 and 5 days post-induction, 30 millions of UT-7/EPO and K562 cells were incubated with 100µg/ml cycloheximide for 10 min at 37°C and, washed, and then pelleted by centrifugation. Lysis was obtained by vortexing glass beads (diameter 0.25-0.5 mm; ref. A553.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 100 µg/mL cycloheximide, and 200 U/mL RNasine (Promega) in RNase free H₂O. Total RNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm in the supernatants collected by centrifugation for 5 min at a

16,000 rcf. The samples were loaded onto a 10 to 50% sucrose gradient in 50mM Tris-acetate pH 7.6, 50mM NH₄Cl, 12mM MgCl₂, 1mM DTT and centrifuged at 36,000 rpm for 3 h (SW41 rotor in XE-90 ultracentrifuge, Beckman Coulter Miami, FL). Fractions were collected and their absorbance was measured using a UA-6 detector (Teledyne ISCO, Lincoln, NE). For ribosomal fractions, one volume of Trizol (Ambion) was added to the sucrose fractions. After vortexing, chloroform (200 μ L) was added and the mixture was centrifuged for 10 min at 15000 rpm. RNA was extracted and recovered in RNase free H₂O and a 1 μ L aliquot was reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcription kit (Invitrogen, #28025-013).

Oligonucleotide Microarrays: transcriptome and translome analysis

RNA was extracted from total cell lysates or from purified heavy polysomes for gene expression profiling on an Affymetrix GeneChip Human transcriptome 2.0 (HTA 2.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and 18S and 28S RNA quality was checked using a Bioanalyzer (Agilent). Briefly, linear amplification of 20 ng of total RNA was performed using the Ovation Biotin RNA Amplification and Labelling System (NuGEN, San Carlos, CA). The resulting fragmented, labeled cDNA was hybridized to oligonucleotide microarrays. Raw fluorescence intensity values were normalized using Robust Multi-array Average (RMA) algorithm in R to generate the normalized data matrix by performing background correction, quantile normalization and log₂ transformation of raw fluorescence intensity values of each gene. Data were normalized using custom brainarray CDF files (v20 ENTREZG). Heatmaps were drawn using the Morpheus software (<http://www.broadinstitute.org/morpheus/>). Differential expression analysis was carried out by a Student *t*-test corrected by significance analysis microarrays (SAM). Differentially expressed genes were then selected using a *P*-value cut-off < 0.05, a calculated *q*-value (FDR) \leq 0.05 and a minimum fold-change of > 1.5 or < -1.5. These genes were annotated Gene Ontology, enrichment analysis was performed using the gene ontology consortium software (<http://www.geneontology.org/>). Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed on normalized data matrix deriving from the translome and transcriptome using the GSEA desktop application® v.2.0.12 (www.broadinstitute.org/gsea). Enrichment rates were considered significant when the *P*-value < 0.05 and the FDR \leq 0.05. *GATA1* target gene set derived from integrated ChIP-seq and transcriptomic data deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under access numbers GSE16594 and GSE18042 (Yu et al., 2009). Genes bound by GATA1 and expressed with a fold change > 2 or < -2 with a *P*-value < 0.05 after 14h or 30h were

considered for the enrichment analysis. For Network integration analysis, data were imported into GSEA software to generate enrichment scores for gene sets in Hallmark, C2.all MSigDB datasets. Cytoscape (v3.2.1) and the Enrichment Map plug-in was used to generate networks for gene sets enriched with a FDR cut-off of < 0.1 . Nodes represent the gene sets that were enriched at the top or bottom ranking of the differentially expressed genes. The node size corresponds to the number of genes in the set. Edges indicate overlaps between gene sets and the line thickness indicates the similarity coefficient between gene sets in red for upregulated and blue for downregulated genes. The node color depends on the FDR value as shown on the scale. Clusters of nodes are determined with Autoannotate App and denoted by the circles.

To calculate the Codon adaptation index, a human codon usage table has been calculated from a set of 19250 human genes from the Ensembl database (Release 57). Only genes with UniProtKB/SwissProt ID have been included. In cases of alternative splicing variants, only the longest splice variant has been included. Genes encoding proteins of length shorter than 99 amino acids have been also removed. The Codon adaptation index annotation were performed with the CAIcal tool (<http://genomes.urv.es/CAIcal/>) (Puigbo et al., 2008). Transcript properties and thermodynamic characteristics (free folding energy ΔG , UTR and CDS length) were collected on UCSC database and obtained from the RNAfold program ViennaRNA Package. A highly structured sequence was defined as a sequence with strongly negative energy of folding in Kcal.mol^{-1} . The datasets generated and analyzed are provided in the Supplemental data.

Ribosome profiling data analysis

We took advantage of two published datasets. First, a dataset of DBA model was obtain from GSE89183. We used the processed count table to determine differentially translated (e.g., changes in TE) genes. We performed the same analytical method indicated in (Khajuria et al., 2018): We used Xtail ([https:// github.com/xryanglab/xtail](https://github.com/xryanglab/xtail)), which first uses the negative binomial distribution to estimate either the \log_2 fold changes separately for mRNAs and RPFs between conditions (i.e., ΔmRNA and ΔRPF) or the \log_2 fold changes for mRNA to RPF within conditions (i.e., $\text{TE}_{\text{control}}$ and TE_{RPH}), and then estimates a discrete joint probability distribution of either ΔmRNA and ΔRPF or $\text{TE}_{\text{control}}$ and TE_{RPH} . Testing of differential translation (i.e., ΔTE in both cases) was then performed, the least significant result of the two methods was kept. The Benjamini–Hochberg FDR was used to control for multiple testing. Only genes with > 150 mRNA counts and > 90 RPF counts were analyzed in order to obtain more stable estimates of ΔTE . The second dataset was obtained from GSE85864. This

ribosome profiling was carried out as described in (Ingolia et al., 2012, Mills et al., 2016) and have been used to determine the most translated genes in reticulocytes.

Luciferases constructs and assays

6 different 5'UTRs (PADI4, ERG, KLF1, GATA1, CEBPA and FLI1 5'UTRs) and 9 different 3'UTRs (STBPX2, GATA1, WDR18, KIF15, CHAC1, CENPF, RECQL, VAT1 and ACSL4 3'UTRs) were amplified using Phusion polymerase (NEB, Ipswich, MA) from anchored oligo-dT primed cDNA libraries from K562 cells or directly synthesized if shorter than 100 nucleotides. All these UTRs were cloned using NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit into a vector based on pmirGlo containing a Firefly and a Renilla luciferase restriction sites and polyA signals. All 3'UTRs were inserted directly downstream the Firefly luciferase with NheI and Sall restriction sites. All 5'UTRs were inserted directly upstream the Renilla luciferase using PflmI restriction site. The initial Firefly luciferase of the pmirGlo vector (Promega) were switch for the Firefly luciferase of the pCINeoFLuc vector using primers, ApaI and Sall restriction sites and the NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB, Ipswich, MA). Constructions were control using restriction enzymes SacI, KpnI, XbaI, and EcoRV and size verified by gel electrophoresis, and using dideoxy sequencing. All primers and sequences are listed in Table S5. At day 3 post doxycycline, transfection of these vectors were performed in K652 shSCR sh640 and sh641 conditions using lipofectamine 3000 following the manufacturer protocol. At day 5 post doxycycline, K562 cells were collected 48 h after transfection and assayed for luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a Multilabel Plate Reader Fluostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg). Firefly luciferase activity was normalized against Renilla luciferase activity or inversely in each sample.

Flow cytometry

The expression of glycophorin A (GPA, CD235a; clone GA-R2, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) or c-Kit (CD117; clone YB5.B8, BD Bioscience) was followed and quantified on a BD LSRFortessa™ cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed with Kaluza software 1.2 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). For cell cycle experiments, iodure propidium-positive cells were quantified on a Flow cytometer BD Accuri™ C6 and data were analyzed with the use of CFlow software (BD Biosciences). Apoptosis was determined by assaying PE-coupled annexin V (Ref 556421, BD Biosciences), quantified on a Guava

cytometer (easyCyte™ Merck Millipore, Darmstadt, Germany), and data were analyzed using Cytosoft 5.1 (Guava Technologies Inc., Hayward, CA).

Western blot

UT7/EPO cells ($5 \cdot 10^5$), were lysed in 50 μ L 1X LaemmLi buffer [62.5 mM Tris HCl pH 6.7, 10% glycerol, 2% sodium dodecylsulfate (SDS), 40 mM dithiothreitol (DTT), bromophenol blue], heated at 90°C for 5 min and resolved on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel. Protein signals were revealed by chemoluminescence (ECL Biorad) and detected using a CCD camera (LAS 3000 Fujifilm). Primary antibodies are listed in the table S5.

RT-qPCR

RNA was extracted using the Kit QIAamp® RNA Blood MiniKit. Reverse transcription was performed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit Thermo Scientific™ on an Applied Biosystems 2720® thermocycler (25°C 10 min, 50°C 15 min, 85°C 5 min). PCR was subsequently performed in triplicate using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). An amplification efficiency >95% was obtained after 40 cycles (95°C, 55°C, 72°C) on a LightCycler480 (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA). For quantification, CP values were used to calculate the normalized ratio quantities (NRQ) according to the formula: $NRQ = RQ/NF$ with RQ being the $E^{\Delta CP}$ where ΔCP is the difference between the CP of the gene of interest and the mean CP of this gene in all samples, E is the primer efficacy and NF is the mean of RQ of the reference genes. For ribosomal fractions, RNA levels were summed across all fractions and presented as percentage of this total. The primers for RT-qPCR used are listed in the table S5.

Statistical analysis

Analysis for each plot is listed in the figure legend and/or in corresponding methods above. In brief, all grouped data are presented as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). All boxes and whisker plots of expression data are presented as medians \pm interquartile range. The *P*-values are calculated using two-sided Mann–Whitney U-test,

Student *t*-test or Kruskal-Wallis ANOVA test in GraphPadPrism software (GraphPad Software, San Diego, CA). GSEA is based on the Kolmogorov-Smirnov test.

Data accessibility

The raw and preprocessed HTA 2.0 microarray data are publicly available at NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) database (GEO; GSE108822). The raw and preprocessed proteomic data are available via ProteomeXchange with identifiers PXD008650 and PXD009258. We also used several published datasets to confirm our model: (GEO; GSE89183; GSE22903; GSE85864).

Figure legends

Figure 1: A *RPS14* downregulation results in limited ribosome availability and reduced GATA1 translation.

(A-G) Knockdown of *RPS14* in UT-7/EPO cell line by inducible shRNA (sh640 and sh641). (A) Schematic workflow. (B) *RPS14* mRNA level measurement by RT-qPCR expressed as the NRQ to *UBC* and *B2M* \pm SEM (n=3). (C) Bioanalyzer quantification of 18S and 28S rRNA expressed as mean ratios \pm SEM (n=3). (D) Quantitative proteomic analysis of RPs from whole cell lysates. Data are expressed as a fold change of the copy number per cell between sh*RPS14* and shSCR conditions in doxycycline-induced cells (n=3). (E) Polysome profiling. Free 40S, free 60S and ribosome 80S (fraction I), light and medium polysomes (fraction II) and heavy polysomes (>5 ribosomes; fraction III) are indicated. (F, G) Relative distribution of *GATA1* and *MYC* mRNA in ribosomal fractions. Quantification by RT-qPCR is expressed as mean \pm SEM (n=3). (H) GATA1 protein expression determined by western blot. Quantification to actin (n=3). (I) Transcriptomic analysis of UT-7/EPO sh*RPS14* cell lines. Gene set enrichment analysis (GSEA) showing variations of GATA1 targets. (J-N) Knockdown of *RPS14* by shRNA in human primary erythroblasts of healthy donors. (J) Schematic workflow. (K) RT-qPCR for *RPS14* mRNA. Results are expressed as normalized ratio quantities (NRQ) to *UBC* and *B2M* \pm (SEM) (n=3). (L) Glycophorin A (GPA)⁺ cells by flow cytometry expressed as mean percentages \pm SEM (n=3). (M) Cell death expressed as mean percentages of Trypan-blue⁺ cells \pm SEM (n=3). (N) RSP14 and GATA1 protein expression determined by western blot. Actin as loading control (n=3). Unpaired two-tailed Student's t-test for *P*-values. **P*<0.05; ** *P* <0.01; *** *P* <0.001.

Figure 2: Selective translation in UT-7/EPO sh*RPS14* cell lines.

(A) Schematic workflow showing RNA extraction from actively translating polysomes (translatome) or from whole cell lysates (transcriptome) in sh*RPS14* 640, sh*RPS14* 641 and shSCR cells for microarrays analysis. The comparative analysis of the translatome related to the transcriptome and the determination of transcripts with the largest Translational Efficiencies variation Δ TE. (B) 2D density plot of log₂(FC) obtained from the translatome and transcriptome. A Spearman test (r coefficient with [95% confidence interval] and *P*-value) was used for correlation. (C) Post-transcriptionally regulated elements with a ratio

($FC_{\text{translatome}}/FC_{\text{transcriptome}}$) >1.5 or <-1.5 were overlaid as red or blue dots, respectively. **(D)** GSEA of differentially expressed genes in the translome and transcriptome. Enriched cellular programs are indicated using the Enrichment Map App of Cytoscape software (P -value cut-off = 0.005, q -value cut-off = 0.1). Nodes represent the gene sets that were enriched at the top or bottom ranking of the differentially expressed genes. The node size corresponds to the number of genes in the set. Edges indicate overlaps between gene sets and the line thickness indicates the similarity coefficient between gene sets in red for upregulated and blue for downregulated genes. The node color depends on the FDR value as shown on the scale. Clusters of nodes are determined with Autoannotate App and denoted by the circles. **(E)** Heatmaps representing the significantly up- or downregulated transcripts in the translome and transcriptome with a P -value cut-off <0.05 , a calculated q -value (FDR) in significance analysis microarrays (SAM) ≤ 0.05 and a minimum fold-change of >1.5 or <-1.5 . The color scale representing the min and max expression per row is indicated. **(F)** Numbers of significantly up- or downregulated transcripts shown as doughnuts. **(G)** Venn diagram showing the overlap between significantly up- and downregulated transcripts in the translome and transcriptome.

Figure 3: Codon Adaptation Index, coding sequence length and thermodynamic characteristics of 3'UTR govern translation selectivity in conditions of limited ribosome availability.

(A) Schematic representation of the workflow: RNA from actively translating polysomes or whole cell lysates were analyzed using Affymetrix microarrays. The top 100 upregulated (in red) and downregulated (in blue) genes were identified by calculating the \log_2 fold change (FC) of the values in shRPS14 to shSCR cell lines. CAI of CDSs and the thermodynamic characteristics of UTRs including the fold energy, length, and energy per base were determined. Comparison of CDS's and UTR's characteristics of the top 100 upregulated and downregulated transcripts in the UT-7/EPO shRPS14 translome and transcriptome. **(B-C)** Thermodynamic landscape: Bi-parametric scatter-plots with energy per base on y axis and length on x axis in a log scale of 5'UTRs **(B)** and 3'UTRs **(C)**. All transcripts described in the UCSC database are represented by grey dots. Red dots for the top 100 upregulated transcripts and blue dots for the top 100 downregulated transcripts in transcriptome, translome and $FC_{\text{translatome}}/FC_{\text{transcriptome}}$ analysis. *GATA1* is indicated by a green triangle. **(D)** Bi-parametric

scatter-plot in log scale representing the free-energy per base of 3'UTR and transcript length (CDS+UTRs) of each transcript described in the UCSC database as grey dots. Red dots for the top 100 upregulated transcripts and blue dots for the top 100 downregulated transcripts in $FC_{\text{translatome}}/FC_{\text{transcriptome}}$ analysis. (E) GSEA of the four subgroups of transcripts defined in D in the translato-me. (F-H) For all human transcripts CAI and their respective transcript length (CDS+UTRs) were represented as grey dots in a bi-parametric scatter-plot in log scale. (F) Red dots for the top 100 upregulated transcripts and blue dots for the top 100 downregulated transcripts in $FC_{\text{translatome}}/FC_{\text{transcriptome}}$ analysis. (G-H) Annotation of CDS and UTRs characteristics of transcripts translationally up and down regulated in other models of ribosomopathies; Left: *shRPL5/shRPS19* human primary cells (GSE89183); Right: *shRpl11/shRps19* murine erythroblasts (GSE 22903). (G) Thermodynamic landscape: Bi-parametric scatter-plots with energy per base on y axis and length on x axis in a log scale of 5'UTRs and 3'UTRs. Bi-parametric scatter-plot with CAI on x axis and total length of the transcript on y axis. All transcripts described in the UCSC database are represented by grey dots. Red dots for the top 100 upregulated transcripts and blue dots for the top 100 downregulated transcripts in ribosome profiling experiments. (H) Monoparametric representation of energy per base of the 5'UTR and 3'UTR expressed as means \pm SD. The p-values were calculated using two-sided Mann–Whitney U-test. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$.

Figure 4: Codon Adaptation Index, coding sequence length and thermodynamic characteristics of UTRs are key determinants of translation in normal erythropoiesis.

(A-B) Bi-parametric scatter-plot in log scale of all human transcripts CAI and transcript length (CDS+UTRs) as grey dots. (A) Top 15 transcripts most translated in reticulocyte (Mills et al., GSE85864) are overlaid in green (B) Top 15 of proteins most expressed in red blood cells (Gautier et al., PXD009258) are overlaid in green. (C) Dynamic repartition of proteins during erythropoiesis. Heatmaps showing repartition of copy number of proteins ranked according to transcripts features (CAI, 5' and 3'UTR structure and total length) in rows and stages of differentiation in columns. Each row represents one 10^{th} of the total scale of the corresponding feature.

Figure 5: Proteome and transcriptome analyses confirm identified rules and point a post-translational regulation of RPs.

A quantitative analysis of the whole proteome was performed in sh*RPS14* 640, sh*RPS14* 641 and shSCR UT7/EPO cell lines. Data are expressed as fold-change (FC) between sh*RPS14* versus shSCR conditions of the mean copy number per cell of three independent experiments. (A) Scatter plots of $\log_2(\text{FC})$ obtained from the proteome and transcriptome. Post-transcriptionally modulated components with a ratio ($\text{FC}_{\text{proteome}}/\text{FC}_{\text{transcriptome}}$) >1.5 or <-1.5 were overlaid as red or blue dots, respectively. (B) ΔTE determined in the translome/transcriptome analysis (see **Figure 2**) of post-transcriptionally regulated elements (C) Comparison of the thermodynamic characteristics of the 3'UTR between the two groups defined in (A) and the group with a ratio ($\text{FC}_{\text{proteome}}/\text{FC}_{\text{transcriptome}}$) <-1.5 minus RPs. (D) Comparison of the total length of post-transcriptionally upregulated and downregulated elements. (E) Comparison of the CAI of post-transcriptionally upregulated and downregulated elements. The *P*-values were calculated using two-sided Mann–Whitney U-test. (F) GSEA shows the enrichment of transcripts containing 5'TOP sequences in the transcriptome, translome and proteome. The *p*-values were calculated using two-sided Mann–Whitney U-test. $**P<0.001$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$. (G) Gene Ontology (GO) enrichment analysis of post-transcriptionally upregulated and downregulated elements.

Figure 6: A functional validation of rules governing the translation in limited ribosome availability conditions.

K562 sh*RPS14*₆₄₀, sh*RPS14*₆₄₁ and shSCR cells were transfected luciferases constructs. (A) Schematic representation of luciferases codon content. (B) Frequency distribution of CAI among all human transcripts. CAI of Firefly luciferases and Renilla luciferase are indicated. (C) Relative ^{Firefly/Renilla} luciferase activity in SCR condition for constructs testing high versus low CAI. (D) Ratio of relative ^{Firefly/Renilla} luciferase activity in sh*RPS14* vs shSCR for constructs testing CAI (n=13). (E) Schematic representation of luciferase vectors used to test 5'UTR structure and length. Thermodynamic landscape of the different 5'UTRs inserted upstream Rluc. (F) Relative ^{Renilla/Firefly} luciferase activity in SCR condition for constructs testing 5'UTR. (G) Ratio of relative ^{Renilla/Firefly} luciferase activity in sh*RPS14* vs shSCR for constructs testing 5'UTR (n=9). (H) Schematic representation of luciferase vectors used to test the 3'UTR structure and length. Thermodynamic landscape of the different 3'UTRs

inserted downstream Rluc. **(I)** Relative ^{Firefly/Renilla} luciferase activity in SCR condition for constructs testing 3'UTR. **(J)** Ratio of relative ^{Firefly/Renilla} luciferase activity in sh*RPS14* vs shSCR for constructs testing 3'UTR (n=13 for *GATA1*, n=9 for all the others). Medians are shown as white horizontal bars, boxes represent first and third quartiles and whiskers represent minimal and maximal values. Light green for sh*RPS14*₆₄₀ and dark green for sh*RPS14*₆₄₁. p-values were calculated using Kruskal Wallis ANOVA test (**F, I**) and unpaired two-tailed Student's t-test (**D, G, J**): ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

List of supplemental Tables

Table S1: Data relative to translome, transcriptome and proteome analysis. Sheet 1: Translatome, transcriptome and proteome datasets, related to figures 1,2,3,5. **Sheet 2:** List of genes which are significantly down regulated in the transcriptome analysis, related to **Figures 2 and 3**. **Sheet 3:** List of genes which are significantly up regulated in the transcriptome analysis, related to **Figures 2 and 3**. **Sheet 4:** List of genes which are significantly up regulated in the translome analysis, related to **Figures 2 and 3**. **Sheet 5:** List of genes which are significantly down regulated in the translome analysis, related to **Figures 2 and 3**. **Sheet 6:** List of genes up regulated in the analysis of FC(translatome)/(transcriptome), related to **Figures 2 and 3**. **Sheet 7:** List of genes down regulated in the analysis of FC(translatome)/(transcriptome), related to **Figures 2 and 3**. **Sheet 8:** Post-transcriptionally up regulated genes (Proteome/translatome >1.5), related to **Figure 5**. **Sheet 9:** Post-transcriptionally down regulated genes (Proteome/translatome < -1.5) with RPs, related to **Figure 5**. **Sheet 10:** Post-transcriptionally down regulated genes (Proteome/translatome < -1.5) without RPs, related to **Figure 5**. **Sheet 11:** Levels of Ribosomal Proteins in sh*RPS14* vs shSCR conditions, related to **Figure 1**. **Sheet 12:** Raw data of proteomic analysis for M1 and M2 replicates, related to **Figures 1 and 5**. **Sheet 13:** Raw data of proteomic analysis for M0 replicates, related to **Figures 1 and 5**. **Sheet 14:** Translatome dataset of K562 cells (sh*RPS14* 640 641 and shSCR), related to supp figure 4. **Sheet 15:** Analysis of mix(sh*Rps19/Rpl5*) vs shScr primary murine fetal liver erythroblasts (Horos et al., 2012 dataset) related to figure 4. **Sheet 16:** Analysis mix(sh*RPS19/RPL5*) vs shluc in human primary CD34 cells in erythroid differentiation (Khajuria et al., 2018) related to figure 4. **Sheet 17:** Analysis of sh*RPS19* vs shluc human primary CD34 cells in erythroid differentiation (Khajuria et al., 2018) related to **Figure 4**. **Sheet 18:** Analysis of sh*RPL5* vs shluc human primary CD34⁺ cells in erythroid differentiation (Khajuria et al., 2018) related to **Figure 4**.

Table S2: GATA1 targets used as geneset for GSEA.

Table S3: Data relative to GSEA, Cytoscape and GO enrichment analysis.

Table S4: 5'TOP transcripts used as geneset for GSEA

Table S5: List of primers and sequences used. Sheet 1: qPCR Primers and Westernblot antibodies related to **Figures 1 and S1**. **Sheet 2** Luciferase sequences related to **Figures 6 and**

S6. Sheet 3 Overlapping primers, 5' and 3'UTR and luciferase sequence used for constructs related to **Figures 6 and S6**.

List of supplemental Figures

Figure S1: A *RPS14* downregulation results in limited ribosome availability and reduced *GATA1* translation. Related to Figure 1.

Figure S2: Selective translation in UT-7/EPO sh*RPS14* cell lines. Related to Figure 2.

Figure S3: CAI, transcript length and 3'UTR structure explain the translation rules in limiting ribosome availability conditions. Related to Figure 3.

Figure S4: Codon adaptation index, coding sequence length and thermodynamic characteristics of UTRs are key determinants of translation in normal erythropoiesis. Related to Figure 4.

Figure S5: Thermodynamic characteristics of RPs. Related to Figure 5.

Figure S6: Luciferase pmirGLO vector. Related to Figure 6.

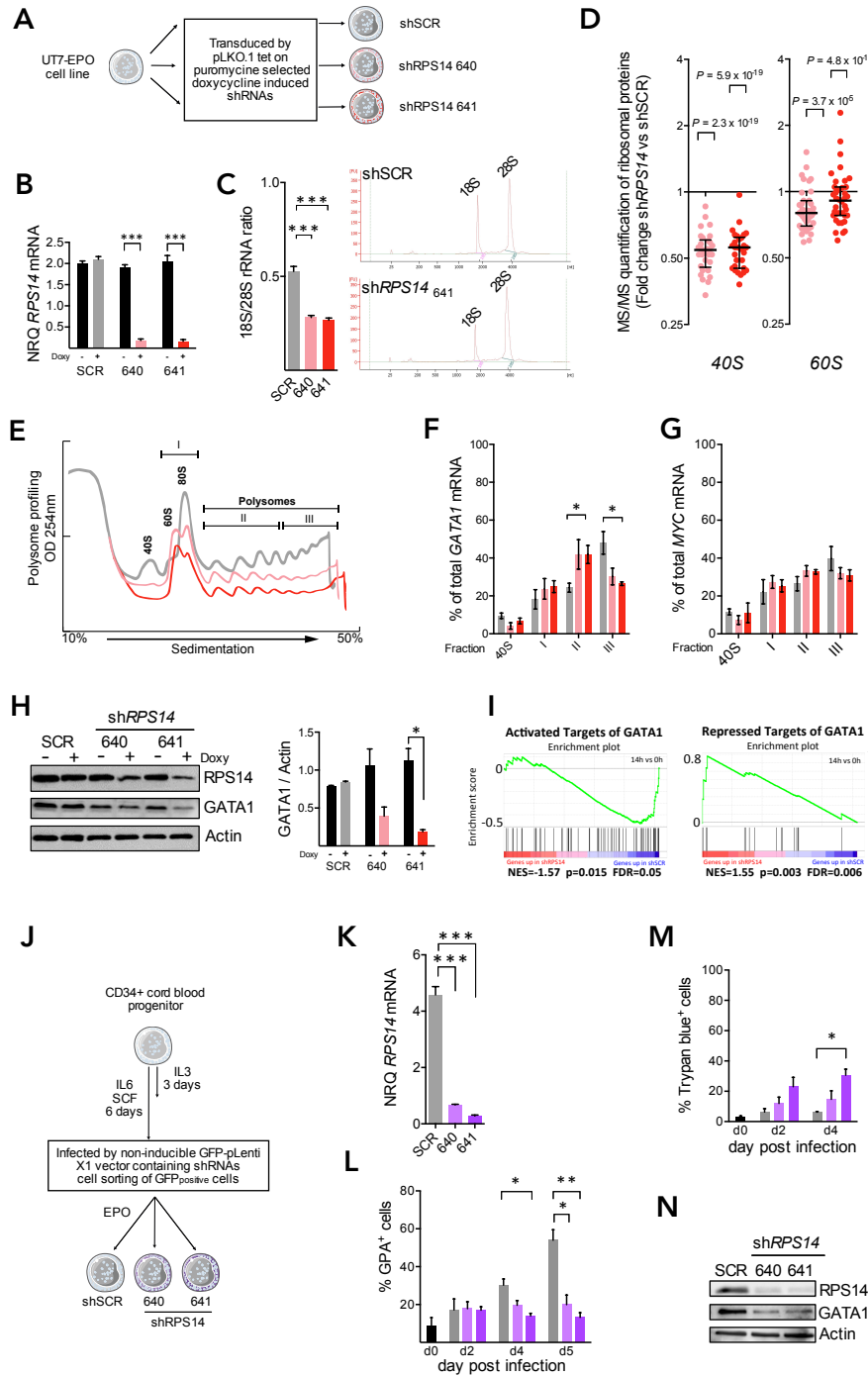


Figure 1

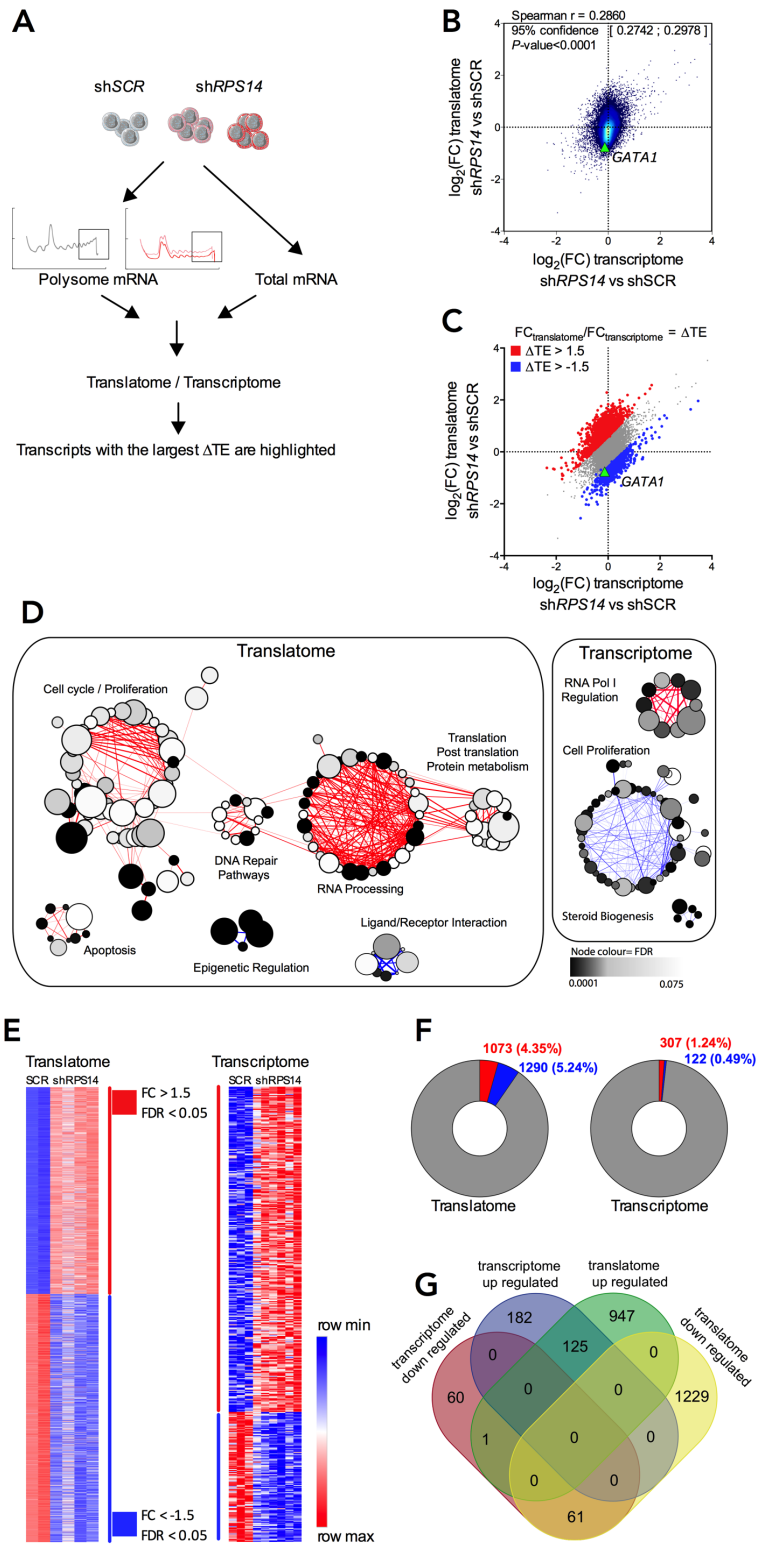


Figure 2

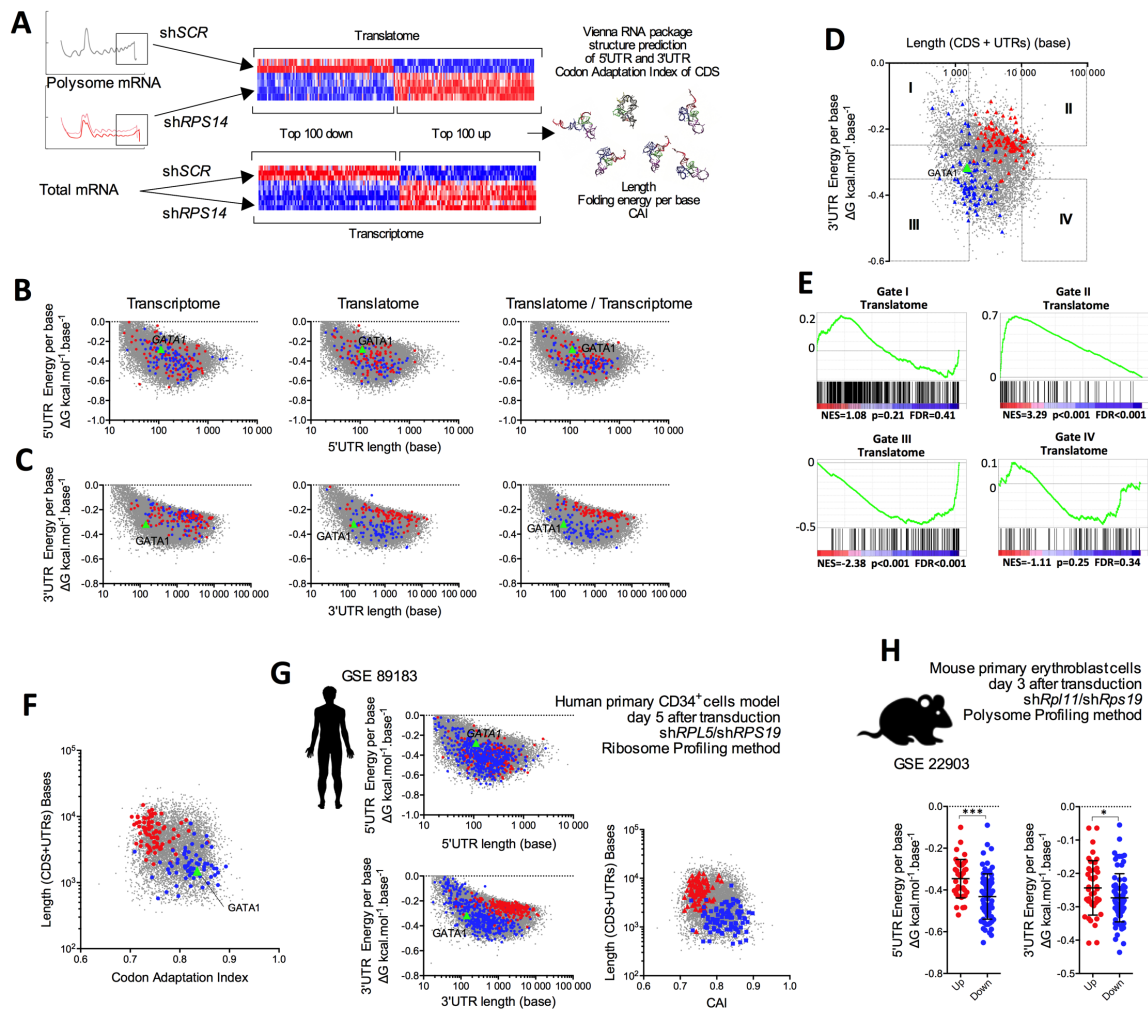


Figure 3

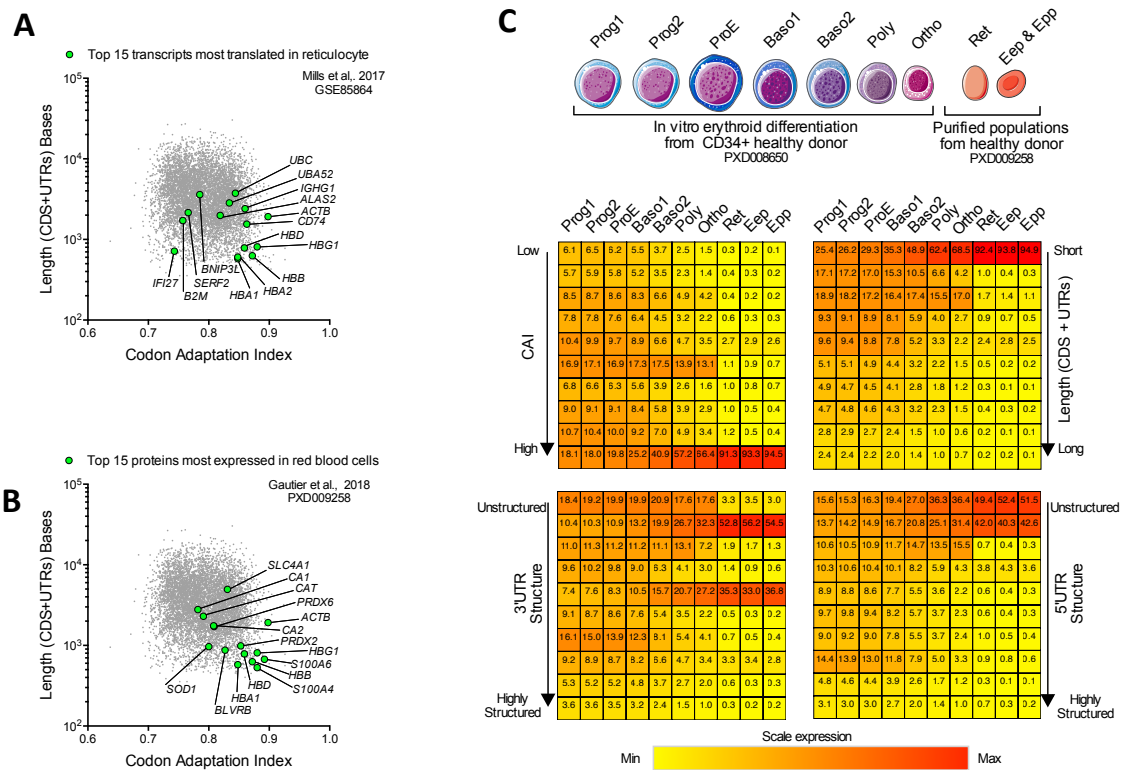


Figure 4

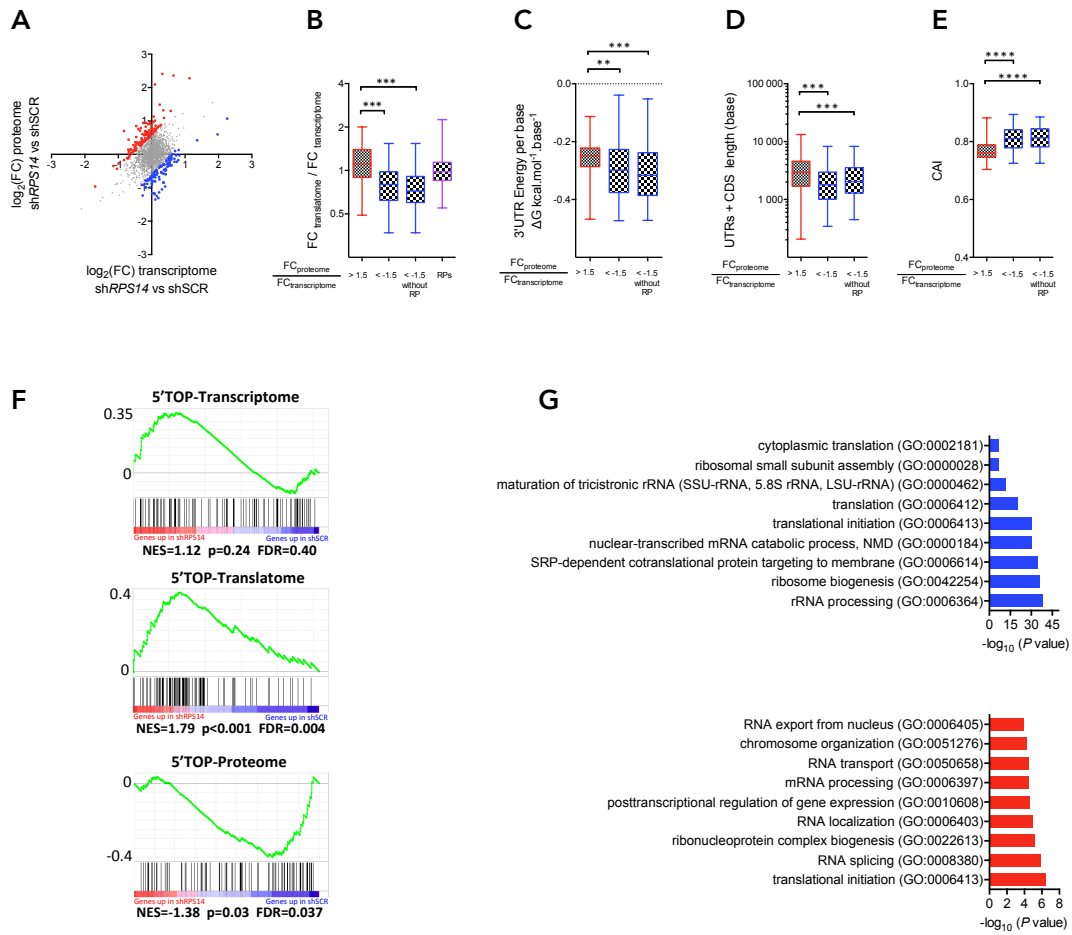


Figure 5

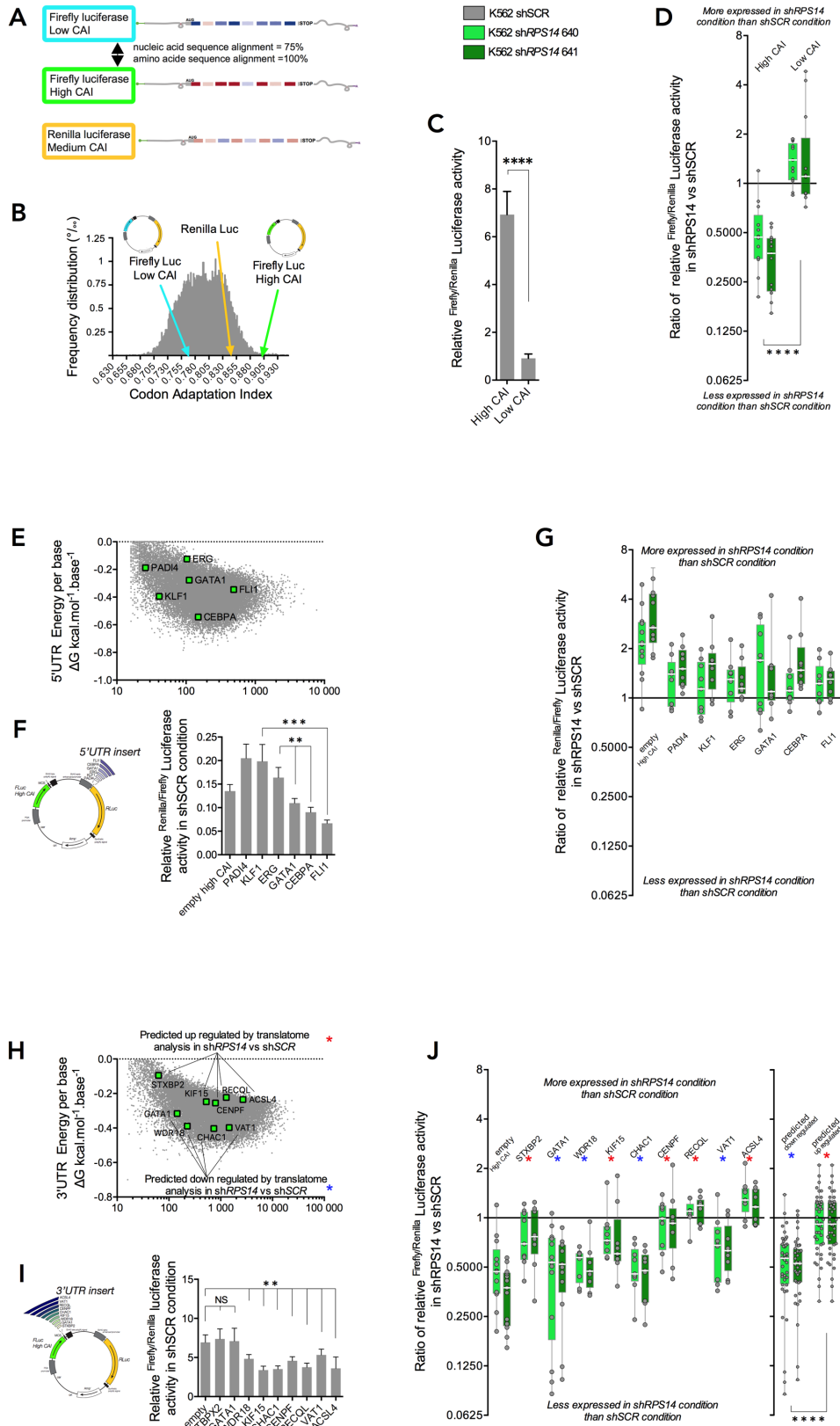


Figure 6

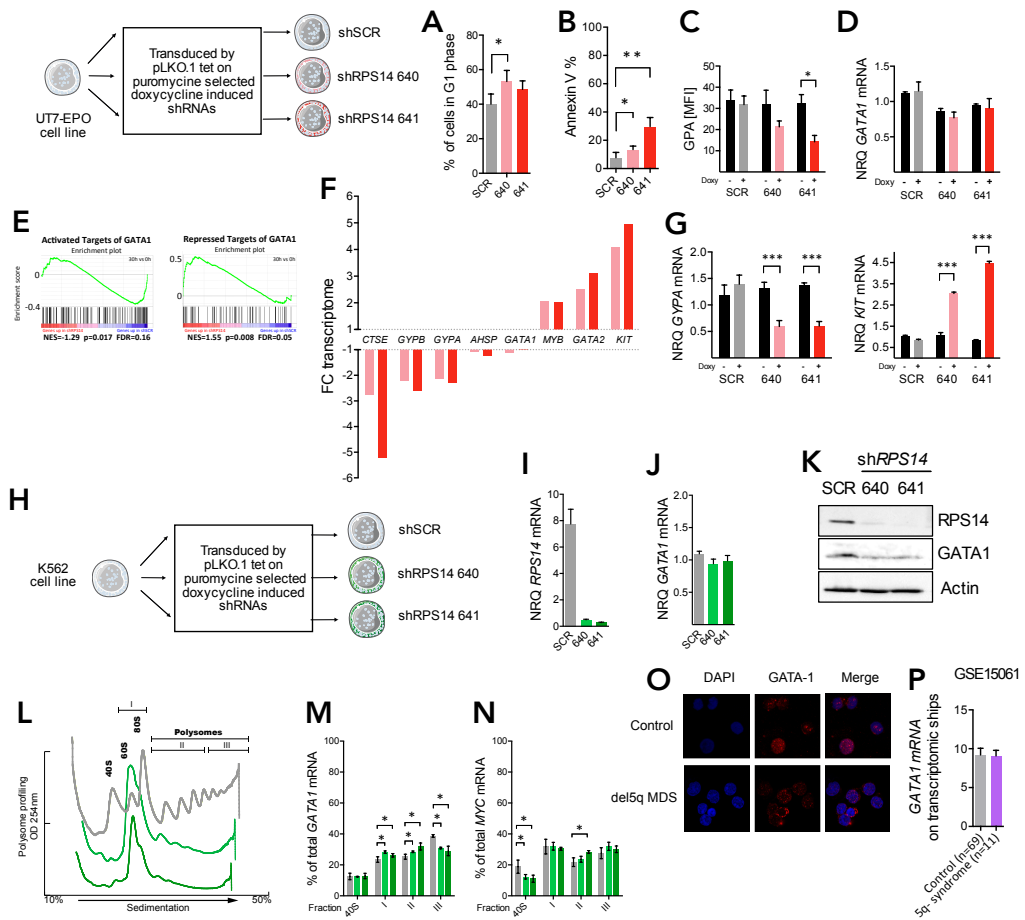


Figure S1

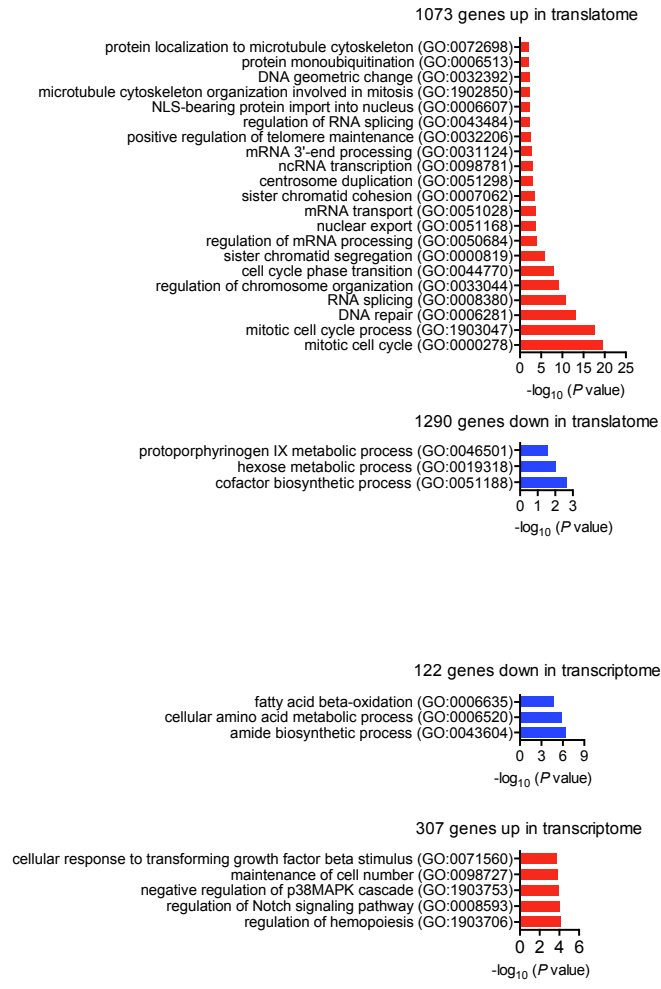


Figure S2

Top 15 of proteins most expressed in red blood cells in copy per cell
 Gautier et al., 2018 PXD009258

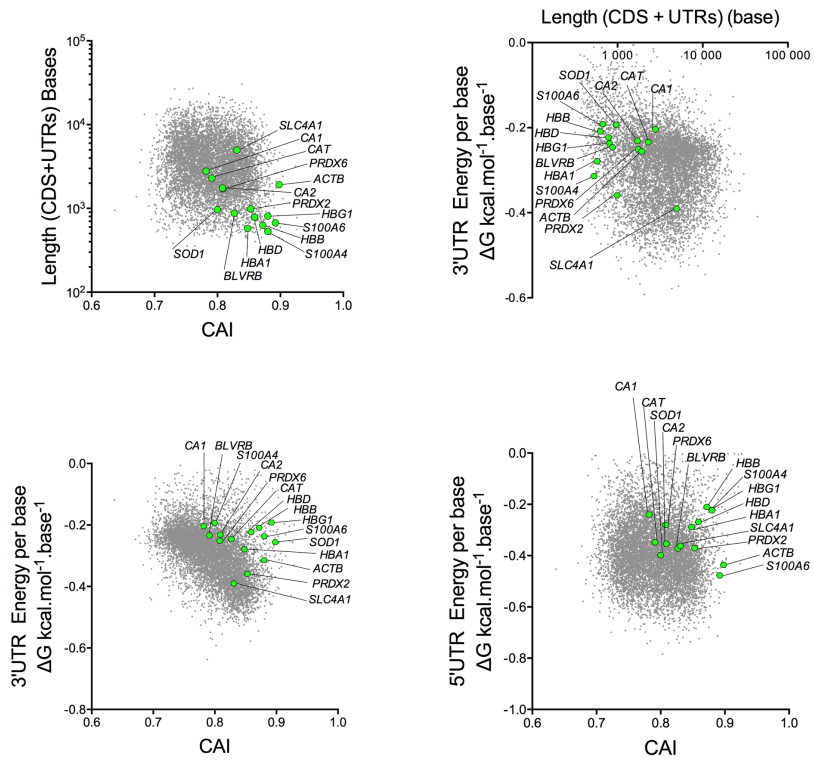


Figure S4

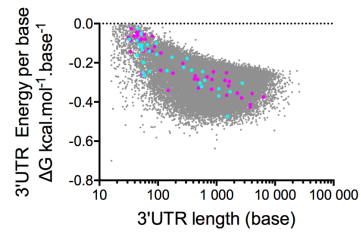


Figure S5

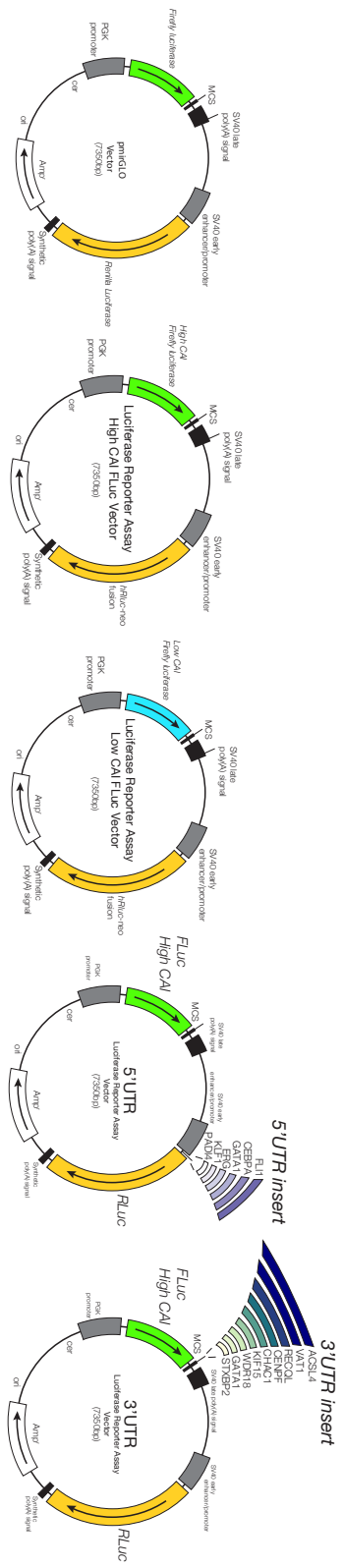


Figure S6: Luciferase vectors. pmIRGLO vector backbone on the left. Constructs on the middle and on the right

IV. Conclusion

Dans les ribosomopathies telles que l'anémie de Blackfan-Diamond et le syndrome 5q-, la mutation ou la délétion d'un gène codant une protéine ribosomique conduit à une altération de l'efficacité de traduction des ribosomes. Le symptôme majeur de ces pathologies est une anémie sévère. La spécificité d'atteinte du compartiment érythroïde a été associée à un défaut de traduction du principal facteur de transcription érythroïde GATA1, en conditions d'haploinsuffisance en *RPS19* ou *RPS14* (Gilles et al., 2017; Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014).

L'objectif de ce travail était d'explorer les mécanismes qui régulent la traduction dans des conditions où la quantité de ribosomes fonctionnels est limitante, et d'examiner leur contribution dans le processus de différenciation érythroïde humaine. Pour cette étude, nous avons développé deux modèles de lignées cellulaires UT-7/EPO et K562 dont l'expression du gène codant la protéine ribosomique *RPS14* est ciblée par stratégie shARN. La diminution d'expression de *RPS14* conduit à une réduction de moitié du contenu cellulaire en ribosomes et une traduction sélective au détriment de GATA1. Afin d'explorer les paramètres qui gouvernent la traduction globale dans un contexte d'altération de la biogenèse des ribosomes, nous avons analysé les transcrits exprimés sur les polysomes en condition d'inhibition d'expression d'une RP de la petite ou de la grande sous-unité. Ainsi, il apparaît que la longueur des transcrits, la structure de l'extrémité 3'UTR, et la proportion de codons optimaux dans la séquence codante sont les déterminants de la sélectivité de la traduction dans les cellules dont la quantité des ribosomes est réduite. En effet, dans ces modèles, les transcrits caractérisés par une courte séquence, avec une extrémité 3'UTR hautement structurée, et un fort taux de codons optimaux sont les plus impactés en terme d'efficacité de traduction. De plus, une analyse intégrée du transcriptome et du protéome global des cellules UT-7/EPO sh*RPS14* confirme que la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes est directement liée à ces critères de sélectivité de traduction.

Enfin, dans le but de mieux comprendre la spécificité de l'impact du lignage érythroïde dans les ribosomopathies, nous avons étudié la régulation de la traduction au cours de l'érythropoïèse normale. Pour cela, les caractéristiques des transcrits ont été analysées à partir de données de protéomique générées à chaque stade de différenciation érythroblastique

et dans les globules rouges (Gautier et al., 2016), et à partir de données de traductome générées dans des réticulocytes de donneur sain (Mills et al., 2016). Nous montrons que les protéines les plus abondantes dans les réticulocytes et les globules rouges correspondent à des transcrits de courte séquence, et avec un fort taux de codons optimaux. Ces résultats indiquent que les transcrits codant pour les protéines qui s'accumulent au cours de l'érythropoïèse normale possèdent des caractéristiques optimales pour la traduction en condition physiologiques. Cependant, ces caractéristiques s'avèrent délétères en condition de disponibilité limitée en ribosomes.

Discussion et Perspectives

I. Discussion partie I :

A. La biogenèse des ribosomes est régulée au cours de l'érythropoïèse.

La différenciation érythroïde terminale est caractérisée par un arrêt progressif de la traduction protéique (Blázquez-Domingo et al., 2005), et une diminution progressive du contenu cellulaire en protéines (Gautier et al., 2016). En amont du processus de la traduction protéique, notre démarche consistait à éclaircir le rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'érythropoïèse.

1. La diminution de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse

Notre travail montre que la diminution drastique de la biogenèse des ribosomes est un processus physiologique de la différenciation érythroïde terminale. Ces données sont en accord avec une observation précédente de l'équipe de Mohandas Narla, qui a réalisé une analyse transcriptomique globale à chaque stade de différenciation érythroïde terminale humaine (An et al., 2014). Dans cette étude, les gènes les plus différentiellement exprimés sont analysés en clusters selon leur profil d'expression au cours de l'érythropoïèse. L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés, par l'utilisation des annotations de *Gene Ontology*, montre que les gènes relatifs à la biogenèse des ribosomes font partie du top 5 des termes les plus significativement enrichis. Leur profil d'expression chute à partir du stade érythroblaste basophile (voir **figure 29A**). Par ailleurs, la diminution de la biogenèse des ribosomes semble également survenir au cours de l'érythropoïèse murine. En effet, des données non publiées de l'équipe de Patrick Mayeux montrent qu'il y a une diminution d'expression des protéines liées à la biogenèse des ribosomes, dès 12 h après l'induction de la différenciation d'érythroblastes primaires de souris, et de cellules de la lignée érythroïde MEDEP (voir **figure 29B**). De plus, l'analyse couplée du transcriptome et du protéome des cellules MEDEP, 12h après l'induction de la différenciation, montre une diminution drastique de l'expression des gènes de la biogenèse des ribosomes à la fois au niveau protéique et au niveau de l'ARNm (voir **figure 29C**). Il est intéressant de noter que cette diminution est plus

importante au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, ce qui est cohérent avec nos résultats du profil d'expression des RPs humaines au cours de l'érythropoïèse. Par ailleurs, on peut observer que les gènes liés à la maturation des ARNt et à la maturation des ARNr suivent le même profil que les gènes relatifs à la biogenèse des ribosomes (voir **figures 29B** et **29C**). Ceci suggère que ce n'est pas uniquement les protéines ribosomiques qui diminuent au cours de l'érythropoïèse, mais toute la machinerie cellulaire impliquée dans la maturation et la production des particules ribosomiques.

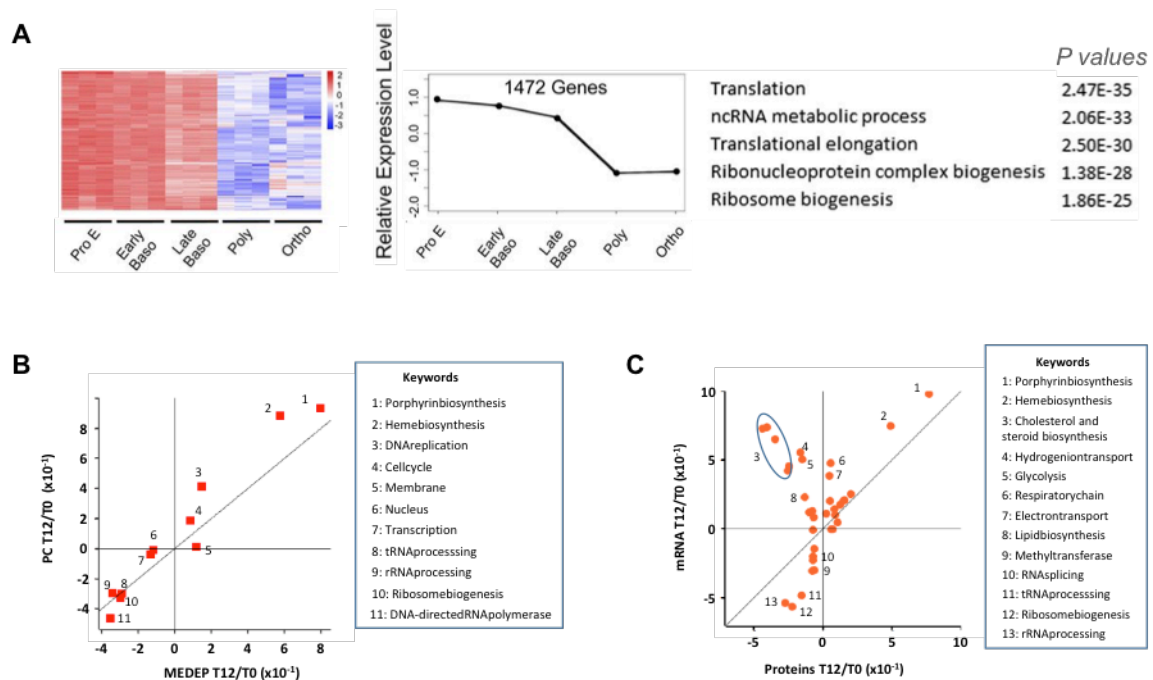


Figure 29: La biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse humaine et murine.

(A) Le groupe de gènes dont le profil d'expression transcriptomique diminue à partir du stade basophile est représenté en heatmap (gauche) et en expression relative (milieu). L'analyse Gene Ontology de ce groupe de gènes a identifié les principaux GO terms les plus enrichis, et leur P value est indiquée (droite) (An et al., 2014). (B) Analyse d'enrichissement du protéome intervenues au cours des 12 premières heures de différenciation d'érythroblastes primaires de souris et des cellules MEDEP. (C) Analyse d'enrichissement des modifications du transcriptome et du protéome pendant les 12 premières heures de différenciation des cellules MEDEP (Données non publiées, Patrick Mayeux).

2. Le rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'érythropoïèse

Afin de rechercher le rôle de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse, nous avons modélisé un arrêt précoce de la biogenèse des ribosomes. L'inhibition de la transcription de l'ADNr par le CX-5461, dans les précurseurs érythroblastiques immatures au

début de la différenciation érythroïde, conduit à une induction de la maturation des érythroblastes normaux. Ces résultats suggèrent que l'arrêt de la biogenèse des ribosomes suffit à provoquer une accélération de la différenciation terminale. Des expériences supplémentaires d'inhibition de la biogenèse des ribosomes par d'autres procédés seraient nécessaires afin de corroborer avec les effets observés du CX-5461 sur les érythroblastes normaux. Par exemple, des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont consisté à inhiber la biogenèse des ribosomes par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de mTOR, la rapamycine. En accord avec les résultats obtenus par le traitement avec le CX-5461, nous avons montré que la rapamycine entraîne également une accélération de la différenciation érythroïde. Toutefois, dans le cas du CX-5461, l'inhibition de la biogenèse des ribosomes est sélective de l'inhibition de l'ARN pol I, ce qui entraîne une réduction spécifique de la transcription de l'ADNr. La transcription et la production globale des RPs ne semblent pas affectées par le CX-5461. En revanche, la rapamycine inhibe la kinase mTOR qui contrôle à la fois la transcription de l'ADNr et la production des RPs. Il semblerait donc que l'inhibition de la transcription de l'ADNr, élément limitant de la production des ribosomes, soit suffisante pour l'induction de la différenciation érythroïde. Toutefois, des expériences supplémentaires d'inhibition sélective de la transcription de l'ADNr, par exemple par l'utilisation de BMH-21 (inhibiteur spécifique de l'élongation de l'ARN pol I) ou par le ciblage de l'expression des sous-unités de l'ARN pol I par stratégie *siARN*, en opposition avec une inhibition globale de l'expression des RPs, permettraient de discriminer le rôle de la transcription de l'ADNr et de la production des RPs dans l'érythropoïèse.

De manière tout à fait intéressante, l'induction d'une différenciation myéloïde est obtenue lors du traitement des lignées de leucémie myéloïde par le CX-5461 (Hein et al, Blood 2017) mettant l'accent sur un rôle de la biogenèse des ribosomes dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Afin de confirmer que l'arrêt de la biogenèse des ribosomes est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale, il faudrait réaliser l'expérience inverse, à savoir maintenir la biogenèse des ribosomes, afin d'observer si cela bloque la différenciation érythroïde. Par exemple, par la surexpression de l'ARN pol I, de Myc ou de mTOR, nous pourrions augmenter la biogenèse des ribosomes et étudier l'impact sur la différenciation érythroïde.

3. Hypothèses des facteurs responsables de la diminution de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse

Néanmoins, en conditions physiologiques, nous avons montré que tous les composants des ribosomes semblent diminuer au cours de la différenciation. En effet, à la fois la quantité de transcrite précurseur ribosomique 47S, résultat de la transcription de l'ADNr, et la quantité des RPs, diminuent au cours de l'érythropoïèse. La question qui se pose dans le modèle physiologique, est : quel est l'élément responsable de la diminution des composants ribosomiques ? Est-ce dû à un arrêt de biosynthèse ou à une dégradation de ces derniers ?

La première hypothèse suppose qu'un arrêt de la production des RPs s'opère au cours de l'érythropoïèse. L'intégration des données de protéome et de traductome dans un modèle d'inhibition de la biogenèse des ribosomes (Partie II des résultats), montre qu'une réduction de la quantité de ribosomes disponibles conduit à une traduction protéique sélective. Notamment, la traduction des ARNm 5'TOP correspondant aux gènes codant les RPs, semble favorisée. Selon ce modèle, les caractéristiques des transcrits codant des RPs sont optimales et permettent une traduction très efficace de ces derniers. Ce mécanisme est cohérent avec l'abondance des RPs dans les cellules saines. Ainsi, la diminution de production des RPs au cours de l'érythropoïèse ne semble pas être un mécanisme cohérent avec ces données. De plus, la traduction des RPs profite d'un mécanisme de régulation additionnel contrôlé par la kinase mTOR, elle-même stimulée par les facteurs de croissance.

La seconde hypothèse suggère un mécanisme de dégradation des RPs successive à leur production. Une étude récente a mis en évidence un mécanisme de contrôle qualité des complexes ribosomiques par le facteur UBE2O. UBE2O est une E2-E3 ubiquitine ligase qui reconnaît et lie un large spectre de protéines et de complexes destinés à la dégradation par le protéasome. En particulier, cette enzyme serait responsable de la dégradation des RPs et des ribosomes en fin de différenciation érythroïde. De plus, la déplétion de l'expression d'UBE2O dans un modèle murin conduit à une anémie sévère (Nguyen et al., 2017). Ces travaux suggèrent que l'élimination des ribosomes est un processus clé de la différenciation érythroïde terminale. En effet, ce mécanisme, démontré dans les réticulocytes, participerait au remodelage extensif du protéome global nécessaire pour la maturation du réticulocyte en

globule rouge, dont le cytosol est composé d'environ 98% de molécules d'hémoglobine (voir **figure 30**).

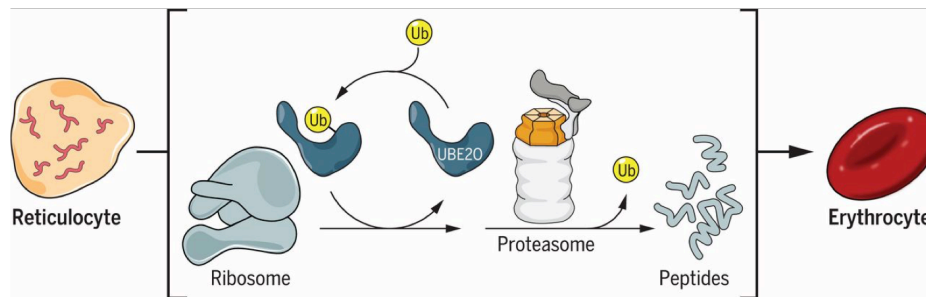


Figure 30 : Modèle d'élimination des ribosomes par l'enzyme UBE20 dans les réticulocytes (d'après (Nguyen et al., 2017)).

4. La diminution de la biogenèse des ribosomes : vers un mécanisme général de la différenciation ?

La différenciation érythroïde est caractérisée par une diminution progressive de la taille des cellules. En effet, les précurseurs érythroïdes prolifèrent, sans croissance cellulaire, ainsi la division cellulaire s'opère sans augmentation préalable de la taille des cellules. Une réduction de la taille des cellules filles, par rapport à la taille de la cellule mère est observée. Cette particularité est cohérente avec une réduction de la quantité de ribosomes au cours de l'érythropoïèse. En effet, la biogenèse des ribosomes est un processus intimement lié à la croissance et à la prolifération cellulaire. En absence de processus de différenciation, les cellules croissent, accumulent leurs composants cellulaires par la synthèse continue d'ARN et de protéines jusqu'à un seuil critique (checkpoint), puis se divisent. Nous émettons l'hypothèse que la diminution de la biogenèse des ribosomes est un mécanisme général du processus de différenciation cellulaire. En effet, la différenciation est un processus qui s'accompagne généralement d'une diminution de la croissance cellulaire puisqu'il y a une diminution de la demande en protéines néosynthétisées. En revanche, une réorientation de la biosynthèse protéique s'opère, en faveur de la mise en place d'un programme de spécialisation cellulaire. Plusieurs modèles de différenciation cellulaire ont mis en évidence une réduction de la biogenèse des ribosomes. Que ce soit dans des modèles d'hématopoïèse (Gratenstein et al., 2005; Krichevsky et al., 1999; Kroll et al., 2001; Poortinga et al., 2004; Sherton and Kabat, 1976), au sein d'autres tissus cellulaires (myoblaste de rat (Zahradka et al., 1991)) ou chez la levure à fission (Álvarez and Moreno, 2006), le processus de

différenciation s'accompagne d'une diminution de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique. En particulier, une étude récente s'est intéressée au rôle de la biogenèse des ribosomes dans la différenciation et a inhibé ce processus dans des cellules à potentiel de différenciation myéloïde HL-60 et monocyttaire THP-1 (Hayashi et al., 2014). L'inhibition sélective de la transcription de l'ADNr conduit à l'induction de la différenciation cellulaire dans ces modèles. Ces données permettent de valider nos résultats et confirmer le rôle de la biogenèse des ribosomes au cours de la différenciation érythroïde.

Pour conclure sur ce thème, le rôle indispensable de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse semble contradictoire avec le contexte pathologique des ribosomopathies où l'altération de la biogenèse des ribosomes conduit à des défauts de l'érythropoïèse. Ceci indique que la biogenèse des ribosomes doit être finement régulée durant l'érythropoïèse afin d'aboutir à la formation de globules rouges normaux. Nous pouvons supposer que la cinétique et l'intensité de la diminution de la biogenèse des ribosomes soient différentes selon le contexte physiologique et pathologique. De plus, les voies de signalisation en aval de ce processus pourraient également être différenciées. La voie de signalisation p53 est intéressante et semble pouvoir apporter des réponses à ces divergences.

B. L'implication de la voie p53 au cours de l'érythropoïèse normale

1. La protéine p53 est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale

Nous avons montré une activation de la protéine p53, spontanément au cours de la différenciation des érythroblastes normaux, et également lors de l'induction de la différenciation érythroïde par le CX-5461. Dans ces deux cas, l'activation de p53 semble coïncider avec la réduction de la biogenèse des ribosomes. Pour étudier le rôle de p53 dans l'érythropoïèse, nous avons inhibé son expression par stratégie *shARN* dans les érythroblastes normaux, ce qui conduit à un blocage de la différenciation érythroïde, avec une accumulation de précurseurs érythroïdes immatures. Ces résultats suggèrent que p53 est impliqué dans la différenciation érythroïde.

La protéine p53 a précédemment été impliquée dans l'hématopoïèse. En effet, une étude a établi que la protéine p53 était exprimée au sein des CSHs. L'inactivation de p53 dans les CSHs de souris entraîne une entrée dans le cycle cellulaire et une augmentation de la prolifération, ce qui suggère un rôle positif de p53 dans le maintien de la quiescence des CSHs (Liu et al., 2009). Dans ces cellules, p53 fonctionne comme un antioxydant et contribue à la réduction des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), protégeant ainsi les CSH des dommages et des mutations de l'ADN (Sablina et al., 2005). Très peu d'études se sont intéressées au rôle de la protéine p53 dans le lignage érythroïde. Néanmoins, l'augmentation de l'expression de la protéine p53 sauvage dans les lignées érythro-leucémiques humaine K562 (Feinstein et al., 1992) et murine Friend (Johnson et al., 1993) est associée à une induction de la différenciation érythroïde. De plus, l'expression de p53 a été détectée par immunohistochimie dans des érythroblastes tardifs issus de sang de cordon, mais n'est pas détectée dans les érythroblastes précoces (Peller et al., 2003). Les auteurs suggèrent que cette activation de p53 est requise pour les stades terminaux de la différenciation érythroïde et conduirait à la condensation du noyau et à son expulsion, sans induire d'apoptose. Enfin, en accord avec nos résultats, des travaux réalisés dans un modèle murin montrent que l'inactivation de p53 favorise l'expansion des érythroblastes immatures aux dépens des stades les plus différenciés (Ganguli et al., 2002).

L'ensemble de ces données suggère un rôle de la protéine p53 dans la différenciation érythroïde mais ce rôle est à ce jour mal caractérisé. Nous avons montré l'activation de la protéine p53 au cours de la différenciation érythroïde par la technique de Western Blot. Et pour preuve de son activité, nous avons montré que p53 est liée à la chromatine au niveau des promoteurs de ses cibles transcriptionnelles, par ChIP-seq. Il serait intéressant de suivre la localisation subcellulaire de p53 au cours de la différenciation érythroïde, par exemple par immunofluorescence. En effet, l'activation de la protéine p53 s'accompagne généralement de sa relocalisation nucléaire, et notamment des changements dans la localisation subcellulaire de p53 ont précédemment été associés à la différenciation des neurones (Eizenberg et al., 1996). Enfin, des expériences supplémentaires d'inhibition de l'expression de p53 seraient nécessaires afin de confirmer les effets de blocage de la différenciation des érythroblastes observés en condition *shp53*.

2. La protéine p53 régule le cycle cellulaire au cours de l'érythropoïèse

Pour explorer le rôle de p53 dans l'érythropoïèse, nous avons entrepris la démarche d'identifier ses gènes cibles transcriptionnelles par ChiP-seq, lors de l'induction de la différenciation par le CX-5461. Les résultats indiquent que l'activation de p53 conduit à une induction spécifique de gènes cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

En effet, la différenciation cellulaire, en plus d'être liée à une diminution de la prolifération, est généralement associée à un échappement du cycle cellulaire (pour revue, (Ruijtenberg and van den Heuvel, 2016). Dans la différenciation érythroïde, des données indiquent que les précurseurs érythroblastes subissent 3 à 5 divisions, suivies d'une sortie irréversible du cycle cellulaire. Des travaux sur les facteurs Rb et E2F4 ont établi que la division cellulaire est fortement couplée à la différenciation érythroïde, car des défauts d'expression de ces gènes sont associés à une anémie foetale (Kinross et al., 2006; Sankaran et al., 2008). Les mécanismes de coordination du cycle cellulaire au cours de la différenciation érythroïde terminale impliqueraient notamment cMyc et la cycline D3 (Jayapal et al., 2010; Sankaran et al., 2012b). Ces données sont donc cohérentes l'activation du programme transcriptionnel impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire observé dans nos résultats.

Dans notre modèle d'induction de la différenciation par le CX-5461, nous avons montré que l'activation de p53 est associée à une forte induction de l'expression de la protéine p21. La protéine p21 est une cible transcriptionnelle de p53 spécifiquement impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire mais pas dans l'induction de l'apoptose (Brown et al., 1997). De plus, son expression est augmentée en fin de différenciation érythroïde (Hsieh et al., 2000). Deux études ont révélé une régulation de l'expression de *CDKN1A* (p21) par fixation directe sur sa région promotrice de GATA-1 et EKLF (Papetti et al., 2010; Siatecka et al., 2010). Il pourrait donc exister une compétition entre ces facteurs de transcription sur les régions promotrices de leurs cibles transcriptionnelles communes, telles que *CDKN1A* (p21). En effet, lors de la différenciation érythroïde normale, l'expression de la protéine p21 précède le pic d'activation de p53, ce qui suggère que p53 n'est pas l'unique inducteur de l'expression de p21. Toutefois, lors de l'induction de la différenciation par le CX-5461, nous avons observé une augmentation quantitative de la fixation de p53 au promoteur du gène *CDKN1A*, par

rapport au contrôle non induit (ChIPseq-qPCR, donnée non montrée), ce qui prouve que dans notre modèle, p53 est aussi un activateur de l'expression de p21.

3. Différentiel de l'activation de p53 dans le contexte physiologique et dans le contexte pathologique

Nous émettons l'hypothèse d'un rôle positif de l'activation de p53 au cours de l'érythropoïèse, or, dans les modèles cellulaires et animaux de ribosomopathies, l'activation de p53 est généralement attribuée responsable de l'apoptose massive des érythroblastes. Comment pourrait-on expliquer ces différences de phénotypes ? Celles-ci pourraient relever de différences d'intensité de l'activation de p53 entre la condition physiologique et la condition pathologique.

Plusieurs études ont établi un lien entre la nature du stress et la dynamique d'expression de p53 (Batchelor et al., 2011; Purvis et al., 2012). En effet, ces travaux montrent qu'un stress mineur et ponctuel conduirait à une activation transitoire de p53 tandis qu'un stress soutenu conduirait à une activation persistante dans la durée de la protéine. En plus, les auteurs établissent un lien entre le niveau d'activation de p53 et l'activation de ses gènes cibles transcriptionnelles. Les cellules soumises à une activation transitoire de p53 activeraient les gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, tandis qu'une activation soutenue de p53 serait liée à l'induction des gènes impliqués dans l'apoptose (Purvis et al., 2012). En définitive, le choix du destin cellulaire, entre arrêt du cycle ou apoptose, serait conditionné par l'intensité de l'activation de p53, et en amont par la nature du stress.

En pratique, la balance entre l'activation transitoire et soutenue de p53 pourrait être liée aux mécanismes de régulation post-traductionnels de p53. Comme il est décrit dans l'introduction de la thèse, les modifications post-traductionnelles de p53 sont multiples et induisent des réponses redondantes. Par exemple, les phosphorylations des sérines 6, 9, 15, 20 et thréonine 18, entre autres, sont induites à la suite d'un signal de dommages à l'ADN (voir **figure 31**). Certaines théories suggèrent que le niveau d'activation de p53 repose sur un effet additif des modifications post-traductionnelles de p53 (Gu and Zhu, 2012). Ainsi, la persistance d'un stress s'accompagnerait d'une augmentation quantitative du nombre de

modifications post-traductionnelles de p53, ce qui serait le signal pour l'induction de l'apoptose cellulaire.

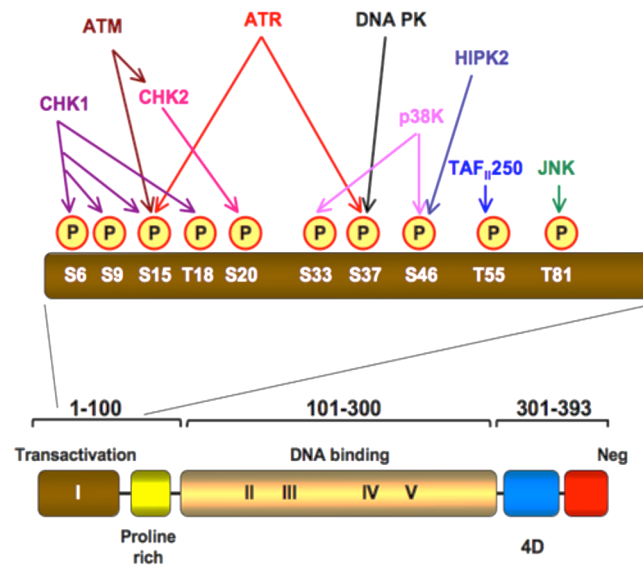


Figure 31 : Les modifications post-traductionnelles de la protéine p53 à la suite d'un dommage à l'ADN.

Source : http://p53.free.fr/p53_info/p53_modifications.html

Dans notre modèle d'érythroblastes normaux, traités ou non par le CX-5461, l'induction de la différenciation s'accompagne d'une activation de p53 non associée à une induction de l'apoptose. En revanche, dans les modèles de ribosomopathies, l'activation de p53 semble soutenue puisqu'elle conduit à l'apoptose des érythroblastes. Ainsi, on peut supposer que la nature du stress est différente entre le contexte physiologique et pathologique. Au cours de l'érythropoïèse normale, l'activation de p53 coïncide avec la diminution de la biogenèse des ribosomes, qui pourrait correspondre à une forme de stress mineur pour la cellule, qui serait « surmonté » par un arrêt du cycle cellulaire en faveur de la survie des érythroblastes. En revanche, dans les ribosomopathies, l'altération de la biogenèse des ribosomes est drastique et pourrait correspondre à un stress majeur pour la cellule, qui forcerait l'entrée en apoptose. Une étude a rapporté le même antagonisme dans la lignée promyélocytaire HL-60, où un niveau élevé de l'expression de p53 conduit à une apoptose des cellules tandis que la différenciation cellulaire est favorisée par de faibles niveaux d'expression de p53 (Ronen et al., 1996). Ainsi, au sein d'une même cellule, il apparaît que le niveau d'activation de p53 peut directement influencer son devenir cellulaire.

Pour la suite de ce travail, il serait intéressant d'explorer la dynamique des modifications post-traductionnelles de p53 au cours de la différenciation érythroïde normale et de comparer ce profil avec le contexte pathologique des ribosomopathies. En effet, la technique de CHIP-seq réalisée dans les érythroblastes primaires nous donne une vue d'ensemble des cibles de p53 activées lors de l'induction de la différenciation érythroïde, celles-ci étant majoritairement relatives à l'arrêt du cycle cellulaire (p21, GADD45A) et à une fonction anti-proliférative (PLK2, BTG2). L'analyse des gènes cibles directes de p53 dans un contexte de ribosomopathies nous permettrait d'établir un différentiel de programme transcriptionnel avec le contexte physiologique et d'identifier des cibles spécifiquement impliquées dans le phénotype d'altération érythroïde de la maladie.

4. L'activation de p53 comme cible thérapeutique ?

Dans les ribosomopathies telles que l'anémie de Blackfan-Diamond ou le syndrome 5q-, l'altération de la biogenèse des ribosomes est associée à une activation de la protéine p53. L'activation de p53 est responsable de l'apoptose massive des érythroblastes et est en ce sens un effecteur critique de l'anémie hypoplasique. Actuellement, le lénalidomide est une thérapie efficace dans le traitement du syndrome 5q-, car permet d'améliorer l'érythropoïèse des patients. Le lénalidomide agit par un mécanisme qui promeut la dégradation de p53, suite à la stabilisation de MDM2 par phosphorylation. Les progéniteurs érythroïdes marquent un arrêt du cycle en phase G2/M (Wei et al., 2009). Le traitement par le lénalidomide réduit significativement l'expression de p53 dans les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse des patients 5q- répondeurs. Cependant, certains patients ne répondent pas au lénalidomide ou acquièrent des résistances, qui sont corrélées à une ré-augmentation de l'expression de la protéine p53 (Wei et al., 2013). Le contrôle de l'expression de p53 dans les précurseurs érythroïdes semble une stratégie thérapeutique permettant de restaurer l'érythropoïèse des patients 5q-, par la réversion de l'apoptose massive des érythroblastes. Cependant, la suppression soutenue de p53 pourrait avoir des conséquences délétères par la promotion de la tumorigenèse. En effet, la susceptibilité aux cancers est un symptôme commun des ribosomopathies et la mutation de la protéine p53 survient chez 50% des patients 5q-. Les mécanismes de progression des ribosomopathies en cancer ne sont pas bien connus, mais ils pourraient impliquer une régulation croisée entre les RPs et des voies oncogènes impliquant c-Myc ou mTOR (van Riggelen et al., 2010; Zoncu et al., 2011). De plus, l'apoptose massive

des précurseurs érythroïdes observée dans les ribosomopathies pourrait favoriser la sélection de clones dans lesquels des gènes suppresseurs de tumeur ou des oncogènes seraient dérégulés. La transition entre la ribosomopathie et la transformation leucémique est un paradoxe puisque les cellules passent d'un état hypoprolifératif avec une altération de la biogenèse des ribosomes, vers un état hyperprolifératif avec une biogenèse des ribosomes accrue (De Keersmaecker et al., 2015; Sulima et al., 2019). En effet, dans les cancers, la taille des nucléoles est augmentée, reflet d'une activité augmentée de la biogenèse des ribosomes (Derenzini et al., 2009). De plus, l'augmentation de l'activité de l'ARN pol I et l'augmentation de la quantité d'ARNm codant les RPs sont également observées dans certains cancers (Ruggero and Pandolfi, 2003). Ainsi, l'inhibition de la biogenèse des ribosomes représente un mécanisme majeur par lequel de nombreuses agents thérapeutiques exercent un effet cytotoxique spécifique sur les cellules cancéreuses. En particulier, les molécules ciblant spécifiquement l'ARN polymérase I sont des nouvelles approches thérapeutiques. L'efficacité de ces molécules repose sur leur capacité à induire une activation de p53, conséquence de l'inhibition de la biogenèse des ribosomes, et d'induire l'activation des gènes cibles de p53 conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Derenzini et al., 2018). C'est le cas par exemple du CX-5461, inhibiteur spécifique de l'ARN pol I actuellement en essai clinique de phase I pour les patients atteints de cancers hématologiques et en essai clinique de phase I et II pour les patients atteints de cancer du sein. Plusieurs études ont pointé l'activation de p53 comme médiateur de l'apoptose dans les cellules cancéreuses à la suite de l'inhibition de l'ARN pol I par le CX-5461 (Bywater et al., 2012; Drygin et al., 2011). Des études réalisées sur des cellules leucémiques humaines et murines montrent que le CX-5461 promeut leur apoptose par un mécanisme p53-dépendant (Hein et al., 2017).

En conclusion, la biogenèse des ribosomes et l'activation de p53 sont des cibles thérapeutiques utilisées dans le traitement des cancers. Dans les ribosomopathies, à l'inverse, la stratégie consiste à inhiber l'expression de p53 afin de contrer les conséquences phénotypiques de l'altération de la biogenèse des ribosomes. Cependant, l'antagonisme entre ces deux contextes est subtil, puisque les patients atteints de ribosomopathies présentent des risques augmentés de développer des tumeurs. Une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques de l'activation de p53 semble nécessaire, ainsi que les mécanismes de progression tumorale, afin de cibler au mieux ces pathologies sans risquer d'induire un effet délétère aux cellules saines.

C. La différenciation érythroïde induit un stress nucléolaire

Nous avons montré que la structure des nucléoles était modifiée au cours de l'érythropoïèse physiologique. Le fait que les nucléoles diminuent en nombre et en taille puis progressent vers une forme inactive en différenciation terminale est en accord avec la diminution de la biogenèse des ribosomes observée au cours de l'érythropoïèse. La disruption de la structure nucléolaire observée lorsque la biogenèse des ribosomes est inhibée par le CX-5461 et dans les stades érythroïdes terminaux est caractéristique d'un stress nucléolaire (pour revue, (Németh and Grummt, 2018)).

1. Quel est le mécanisme en amont de l'activation de p53 ?

Pour établir un lien mécanistique entre le stress nucléolaire et l'activation de la protéine p53, nous avons exploré deux hypothèses. D'une part, le mécanisme le plus documenté à la suite d'une inhibition de la biogenèse des ribosomes est la perturbation de l'axe de régulation RP-MDM2-p53. En effet, l'altération de la biogenèse des ribosomes conduit généralement à un excès de protéines ribosomiques libres non incorporées aux ribosomes, qui vont fixer MDM2. La liaison RP-MDM2 interfère à la liaison MDM2 à p53, ce qui permet à ce dernier d'échapper à la dégradation par le protéasome et de s'accumuler dans la cellule. Ce mécanisme a été mis en évidence dans différents modèles de ribosomopathies (Dai and Lu, 2004; Jaako et al., 2015). Cependant, notre étude du renouvellement des protéines par marquage Pulse Silac en condition d'inhibition de la biogenèse des ribosomes indique une absence de RP au sein de la fraction libre. Ces résultats suggèrent que la plupart des RPs de la cellule sont incorporées au sein des ribosomes ou rapidement dégradées.

La seconde hypothèse est l'activation de la voie des dommages à l'ADN suite au stress nucléolaire. En effet, un modèle de souris leucémiques montre que l'inhibition de l'ARN pol I par le CX-5461 et l'activation de la protéine p53 sont associées à une activation des kinases CHK1 et CHK2, et à un arrêt du cycle cellulaire (Hein et al., 2017). Ces observations ont été reproduites par une autre équipe dans un modèle de cellules de leucémie lymphoblastique aiguë (Negi and Brown, 2015). Dans notre modèle, nous avons montré une activation spontanée de la kinase CHK1 au cours de la différenciation érythroïde, et concomitante à

l'activation de p53. De plus, l'arrêt des érythroblastes en phase G2/M observé en condition CX-5461 est caractéristique d'une activation de la signalisation des dommages à l'ADN. Enfin, l'analyse globale du profil d'expression génique des érythroblastes en condition CX-5461 montre que les gènes les plus significativement enrichis appartiennent à la voie de signalisation des dommages à l'ADN.

2. Un dommage à l'ADN ribosomique au cours de l'érythropoïèse ?

CHK1 est une protéine sérine/thréonine kinase qui est impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome. Son activation en réponse aux dommages à l'ADN coordonne la régulation et l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, et éventuellement la mort cellulaire afin d'empêcher les cellules endommagées de progresser dans le cycle cellulaire. Une seule étude a établi un lien entre CHK1 et l'érythropoïèse murine. Dans un modèle murin *Chk1*^{+/-}, l'haploinsuffisance du gène *Chk1* entraîne une anémie sévère (Boles et al, 2010). De plus, les progéniteurs érythroïdes *Chk1*^{+/-} présentent une augmentation des foyers de lésion à l'ADN (pH2AX) et une énucléation défectueuse du fait d'un défaut de formation d'anneaux d'actine contractile nécessaires à ce processus. Par ailleurs, la déplétion de CHK1 entraîne un défaut de différenciation dans le lignage des lymphocytes T (Zaugg et al., 2007). Cependant, aucune étude à ce jour n'a établi le rôle de CHK1 au cours de l'érythropoïèse humaine. Nous avons montré que l'inhibition de CHK1 dans les érythroblastes normaux entraîne un défaut de différenciation érythroïde, et récapitule les effets de l'inhibition de l'expression de p53, ce qui suggère un rôle important de CHK1 au cours l'érythropoïèse humaine.

Quelle est la relevance de l'activation de CHK1 au cours de la différenciation érythroïde ? Quel serait le déclencheur de l'activation de cette voie suite à l'inhibition de la biogenèse des ribosomes ? Une théorie suggère que l'inhibition de la biogenèse des ribosomes par le CX-5461 entraînerait des perturbations de la conformation de la chromatine, responsables de l'activation de la voie des dommages à l'ADN. En effet, le mécanisme d'action du CX-5461 est d'empêcher le recrutement de l'ARN pol I au niveau des promoteurs de l'ADNr. L'absence de l'ARN pol I sur ces multiples promoteurs d'ADNr entraîneraient une augmentation de portions de chromatine « exposées » et des modifications de la topologie des ADNr, ce qui favoriseraient le recrutement des kinases ATM/ATR (Quin et al., 2016).

Ainsi, l'activation de la signalisation ATR/CHK1 pourrait s'exercer en absence de réel dommage à l'ADN et CHK1 serait un gardien de l'intégrité de la structure de la chromatine. Une seconde hypothèse suggère que l'activation de la voie ATR/CHK1 pourrait être due à une obstruction de la transcription, de la maturation, et/ou de la réplication de l'ADNr. Cette théorie est basée sur le fait que ces trois processus s'opèrent simultanément dans la cellule. Une dérégulation d'un de ces processus peut provoquer la formation de structures stables, comme par exemple des structures r-loop, qui entraîneraient l'activation de la voie des dommages à l'ADN. Au cours de l'érythropoïèse physiologique, la chromatine des érythroblastes se condense progressivement jusqu'à l'expulsion du noyau au stade acido-E. De plus, les ADNr sont les gènes les plus intensivement transcrits dans le génome. On pourrait supposer que cette condensation de la chromatine au cours de l'érythropoïèse pourrait entraîner des réarrangements de structure de la chromatine et conduire à l'activation de la voie ATR/CHK1, avec ou sans dommage à l'ADN. En effet, la question de la dégradation de l'ADN lors de la condensation de la chromatine observée des érythroblastes reste ouverte. Ainsi, le rôle de cette voie pourrait permettre d'anticiper et de réparer les dommages à l'ADN en cas de dommages, et/ou de participer au processus d'énucléation en différenciation terminale.

Pour la suite de ce travail, il paraît intéressant d'explorer l'activation de la voie ATR/CHK1 en conditions physiologiques. La protéine DDX21 est une hélicase qui coordonne la transcription de l'ADNr et la maturation des ARNr (Calo et al., 2015). Constitutivement associée au complexe de l'ARN pol I dans le nucléole, la relocalisation de DDX21 dans le nucléoplasme semble être un marqueur spécifique d'un dommage à l'ADNr. Des expériences sont actuellement entreprises au laboratoire afin de caractériser l'expression et la localisation de cette protéine au cours de l'érythropoïèse normale et induite par le CX-5461.

D. Le ribosome dans l'érythropoïèse normale et pathologique

Au cours de la différenciation érythroïde normale, nous avons montré que la biogenèse des ribosomes subit une diminution drastique à partir du stade baso 2. En accord avec l'inactivation irréversible des nucléoles au stade polyE, la transcription de l'ADN ribosomique et le nombre absolu de protéines ribosomiques s'effondrent dans les

érythroblastes en différenciation terminale. La diminution de la biogenèse des ribosomes semble donc coordonnée et équilibrée entre les composants ribosomiques, ce qui suggère que plusieurs mécanismes convergent afin d'interrompre la biogenèse de ribosomes d'une façon globale au cours de la différenciation érythroïde terminale. Cependant, dans le contexte des ribosomopathies, l'altération de la biogenèse des ribosomes est causée par une mutation ou délétion d'une protéine ribosomique. Ceci entraîne un déséquilibre stoechiométrique entre les protéines ribosomiques. Dans ces conditions, deux configurations possibles peuvent se présenter. D'une part, la réduction d'expression de la RP mutée ou délétée empêche la formation du ribosome, entraînant une réduction du contenu cellulaire en ribosomes ; d'autre part, la réduction d'expression de la RP mutée ou délétée n'interfère pas avec la formation des ribosomes, et peut résulter en une production de ribosomes hétérogènes.

En effet, plusieurs études suggèrent que la composition du ribosome pourrait être hétérogène selon les tissus, ce qui lui conférerait des fonctions spécifiques (Xue and Barna, 2012). L'hétérogénéité des ribosomes dépend de plusieurs facteurs. Il peut s'agir d'une composition en RPs différente, que ce soit par leur présence/absence ou par la modulation de leurs modifications post-traductionnelles ; il peut s'agir d'une variation des modifications post-traductionnelles des ARN ribosomiques ; et d'une variation des facteurs associés aux ribosomes. La notion de l'existence de ribosomes hétérogènes repose sur le fait que l'expression des RPs au niveau transcriptomique est variable en fonction des tissus (Genuth and Barna, 2018). L'hétérogénéité d'expression des RPs est particulièrement importante au sein du tissu hématopoïétique humain, où l'expression différentielle de certaines RPs permet de distinguer les cellules d'un lignage ou d'un stade de différenciation (Guimaraes and Zavolan, 2016). Cependant, des études à l'échelle protéomique devront être appliquées à l'avenir pour confirmer ces éléments. De plus, la notion que des ribosomes peuvent avoir des structures différentes suggère que cette hétérogénéité pourrait avoir une conséquence fonctionnelle sur le processus de traduction protéique. Par exemple, l'absence de modification post-traductionnelle de la protéine RPS6 entraîne une augmentation du niveau global de la traduction. Pour second exemple, les ribosomes dont les ARNr sont hyperméthylés suite une surexpression de la fibrillarine effectuent une traduction protéique sélectivement augmentée pour les ARNm possédant une séquence IRES, et avec une diminution globale de la fidélité (Marcel et al., 2013). Ainsi, il apparaît que la composition du ribosome n'est pas équivalente en fonction du type cellulaire et que celle-ci peut avoir rôle spécifique dans la cellule. Dans nos expériences de protéomique quantitative, nous avons observé une sous-représentation de

certaines protéines ribosomiques dont RPS29 et RPL29, ce qui pourrait laisser suggérer une hétérogénéité des ribosomes dans les érythroblastes. Par ailleurs, il est intéressant de considérer le dynamisme de la structure du ribosome. En effet, certaines protéines ribosomiques pourraient être présentes de manière transitoire au sein de ribosome. Nos expériences de protéomique Pulse Silac nous ont permis d'évaluer le renouvellement des protéines ribosomiques au sein du ribosome. De cette étude, il apparaît que certaines RPs se renouvellement plus rapidement sur le ribosome, telles que RACK1, RPL10, ou encore RPS30. Cet effet pourrait être du à une incorporation tardive de ces RPs au sein du ribosome, ou à une dynamique d'échange de ces RPs entre le ribosome et le cytoplasme, ce qui pourrait avoir une influence sur le processus de traduction. Par exemple, la protéine RPL10 semble alterner rapidement entre le ribosome et le cytoplasme. La mutation de cette protéine est identifiée dans des leucémies lymphoblastiques pédiatriques et conduit à une augmentation de la traduction IRES-dépendante (Kampen et al., 2019).

Finalement, la sous-représentation d'expression de certaines RPs, ainsi que la dynamique irrégulière de renouvellement des RPs au sein du ribosome nous amène à suggérer que la composition du ribosome pourrait être hétérogène dans les érythroblastes. L'hétérogénéité du ribosome érythroïde pourrait conduire à une spécificité fonctionnelle au cours de l'érythropoïèse, et éventuellement jouer un rôle dans la spécificité de l'atteinte érythroïde des ribosomopathies. Au cours des ribosomopathies anémie Blackfan-Diamond et syndrome 5q-, la mutation ou délétion d'une RP pourrait également aboutir à la formation de ribosomes hétérogènes mais aucune étude n'a mis en évidence ce phénomène. Pour étudier en profondeur l'hétérogénéité des ribosomes, des expériences de protéomique Super Silac, grâce à l'introduction d'une lignée cellulaire de référence, permettraient de quantifier plus précisément les RPs au cours de l'érythropoïèse normale et pathologique et de mettre en évidence une éventuelle variation de composition du ribosome au cours de ces processus.

II. Discussion partie II

A. La sélectivité de la traduction dans un contexte d'altération de la biogenèse des ribosomes

Dans les ribosomopathies telles que l'anémie de Blackfan-Diamond ou le syndrome 5q-, l'altération de la biogenèse des ribosomes conduit principalement à une hypoplasie érythroïde. Plusieurs modèles sont proposés pour expliquer l'atteinte spécifique du lignage érythroïde lorsque la fonction ribosomique est affectée (Mills and Green, 2017). Une hypothèse suggère que la déficience en une RP conduirait à une diminution du contenu cellulaire en ribosomes, entraînant des modulations de l'efficacité de traduction de certains groupes d'ARNm. Ainsi, la traduction des ARNm dépendrait de la concentration cellulaire en ribosomes et les transcrits avec la plus faible efficacité de traduction seraient les plus impactés par la diminution de la quantité des ribosomes (Lodish, 1974; Mills and Green, 2017). Une seconde hypothèse suggère que l'existence de ribosomes spécialisés avec une composition en RPs différente ou avec des modifications post-traductionnelles des RPs ou des ARNr différentes seraient critiques pour la traduction spécifique de certains groupes d'ARNm (Imami et al., 2018; Xue and Barna, 2012). Enfin, de récents travaux suggèrent qu'une modification de la quantité ou de la fonctionnalité des ribosomes pourrait entraîner des mécanismes secondaires compensatoires sur l'expression des gènes (Cheng et al., 2019).

Dans notre modèle, nous montrons que l'inhibition de l'expression du gène codant la protéine ribosomique *RPS14* entraîne une diminution globale de la quantité de ribosomes, ce qui a pour conséquence d'impacter la traduction qui devient sélective. Nous ne pouvons exclure que l'inhibition de l'expression de *RPS14* pourrait conduire à la production de ribosomes spécialisés qui seraient responsables de l'induction d'un programme traductionnel particulier. Cependant, l'incorporation précoce de la protéine RPS14 au sein de la sous-unité 40S et son rôle indispensable dans la maturation de cette dernière (O'Donohue et al., 2010) sont des arguments en défaveur de l'hypothèse de la formation de ribosomes dépourvus de la protéine RPS14. De plus, l'existence de ribosomes dépourvus de protéine RPS14 n'a à ce jour pas été démontrée.

B. La spécificité de l'atteinte érythroïde dans les ribosomopathies

Dans nos modèles de lignées UT7/EPO et K562, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de la protéine RPS14 conduit à un défaut de traduction du principal facteur de transcription érythroïde, GATA1. Ce résultat a été confirmé dans les érythroblastes primaires exprimant un *shRPS14*. Ces données sont en accord avec la littérature, puisque la diminution du transcrit *GATA1* au sein des polysomes a été mise en évidence dans des modèles d'haploinsuffisance pour les protéines *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* ou *RPS14* (Gilles et al., 2017; Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014). De plus, dans les érythroblastes primaires, la diminution de la protéine GATA1 est associée à une apoptose massive des précurseurs érythroïdes, et un blocage de la différenciation. L'érythropoïèse inefficace observée chez les patients atteints d'ABD et associée à l'haploinsuffisance d'une RP est partiellement restaurée par la surexpression de la protéine GATA1, suggérant que GATA1 est un facteur clé responsable de l'atteinte érythroïde (Ludwig et al., 2014).

La diminution de l'efficacité de traduction de *GATA1* dans un contexte d'haploinsuffisance d'une RP a été attribuée à la structure de son extrémité 5'UTR (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014). En effet, l'efficacité de traduction d'un transcrit est liée à ses caractéristiques thermodynamiques (Barrett et al., 2012; Tuller et al., 2010). L'analyse des déterminants de la sélectivité de la traduction dans les modèles UT-7/EPO et K562 *shRPS14* indique que les transcrits dont la traduction est la plus diminuée partagent certaines caractéristiques. Globalement, ces transcrits possèdent une séquence courte présentant un taux élevé de codons optimaux, ainsi qu'une extrémité 3'UTR courte très structurée, et de façon moins significative, d'une extrémité 5'UTR structurée. En accord avec ces données, l'analyse de l'ARNm de *GATA1* montre que ce dernier possède des propriétés similaires aux transcrits dont l'efficacité de la traduction est diminuée. En effet le transcrit de *GATA1* possède une séquence courte et composée d'un fort taux de codons optimaux, avec une extrémité 3'UTR très structurée et une extrémité 5'UTR faiblement structurée, en comparaison avec la globalité des transcrits humains.

C. Un défaut de recyclage/ ré-initiation ?

Parmi les déterminants de la sélectivité de la traduction en condition limitée de ribosome, cette étude révèle que les caractéristiques de l'extrémité 3'UTR semblent plus déterminantes que celles de l'extrémité 5'UTR pour distinguer les transcrits régulés positivement des transcrits régulés négativement au sein des polysomes.

La contribution de l'extrémité 3'UTR dans la régulation de la traduction a fait l'objet de plusieurs études (Miettinen and Björklund, 2015; Tanguay and Gallie, 1996). Néanmoins, excepté la régulation par les microRNA, la mécanistique expliquant la régulation de la traduction par le 3'UTR est relativement peu documentée. Ce rôle pourrait être expliqué via le modèle dit en boucle fermée « closed-loop model », qui décrit notamment les interactions entre les régions 5'UTR, 3'UTR, et les facteurs d'initiation de la traduction. Cette structure serait un avantage pour le processus de recyclage des ribosomes et de ré-initiation de la traduction, grâce au rapprochement physique des extrémités 5'UTR et 3'UTR (Fernandes et al., 2017). En effet, il est suggéré qu'une fois avoir atteint le codon stop, le ribosome serait recyclé et la sous-unité 40S pourrait dans certaines circonstances directement accéder jusqu'à la région 5'UTR afin de procéder au processus de ré-initiation et réaliser une nouvelle boucle de traduction sur le même transcrit (Brojna and Wen, 2009; Miettinen and Björklund, 2015). Nous émettons donc l'hypothèse que la longueur et la structure 3'UTR pourraient en partie réguler le mécanisme de recyclage/ré-initiation de la traduction en conditions normales, notamment grâce à une distance réduite entre les régions 3' et 5'. De manière intéressante, des travaux récents indiquent que l'invalidation du facteur de recyclage/ré-initiation ABCE1 conduit à un arrêt des ribosomes au niveau des transcrits possédant une région 3'UTR courte et structurée (Sudmant et al., 2018; Young et al., 2015). Dans les conditions d'haploinsuffisance en *RPS14*, *RPL5*, et *RPS19* et dans notre modèle, les transcrits possédant une région 3'UTR courte et hautement structurée sont les plus impactés en terme de traduction. Cette observation laisse suspecter un défaut de recyclage/ré-initiation de la traduction en conditions limitantes en ribosome.

D'autre part, nous avons montré qu'en condition d'haploinsuffisance en *RPS14*, les transcrits les plus courts en séquence totale et possédant un fort taux de codons optimaux sont les plus impactés en terme de traduction. Cette observation est en accord avec plusieurs

travaux réalisés chez la levure et dans des cellules humaines où les gènes *RPS19*, *RPL5*, *RACK1*, ou *RPS26* sont mutés ou délétés (Ferretti et al., 2017; Thompson and Gilbert, 2017; Thompson et al., 2016). De façon intéressante, dans de nombreux modèles il est décrit que les transcrits courts ont une densité de ribosome plus importante que les transcrits de longue taille (Ferretti et al., 2017; Thompson and Gilbert, 2017; Thompson et al., 2016). Des travaux récents suggèrent que cette différence d'efficacité de traduction des transcrits en fonction de leur taille peut être expliquée par le processus de recyclage/ré-initiation de la traduction (Fernandes et al., 2017; Rogers et al., 2017). En effet un transcrit court a un accès privilégié au phénomène de ré-initiation par rapport à un transcrit long. Selon le même raisonnement, les transcrits possédant un fort taux de codons optimaux, grâce à une vitesse d'élongation plus rapide, seraient également avantagés par ce processus (Fernandes et al., 2017). Ainsi, dans notre modèle, le défaut sévère de traduction des transcrits les plus courts et possédant un fort taux de codons optimaux ainsi qu'un 3'UTR court et structuré pourrait être expliqué par une dérégulation du processus de recyclage/ré-initiation.

De manière intéressante, le facteur de recyclage PELO a été décrit comme important au cours de la différenciation érythroïde normale (Mills et al., 2016) et nous montrons que les transcrits les plus traduits et les protéines qui s'accumulent le plus au cours de la différenciation érythroïde sont issues de transcrits courts et riches en codon optimaux. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que les transcrits les plus traduits au cours de la différenciation érythroïde normale possèdent ces mêmes caractéristiques. Cependant, en conditions de réduction de la quantité de ribosomes fonctionnels, ce mécanisme pourrait être dérégulé. En effet, la diminution du contenu cellulaire en ribosomes pourrait limiter ces phénomènes de recyclage/ré-initiation du fait d'une compétition entre ARN messagers pour l'accès au ribosome et à la traduction.

En conclusion, le processus de la traduction protéique est au centre d'un réseau complexe de régulation impliquant et la concentration cellulaire des ribosomes et leur composition, le niveau d'expression d'un transcrit et ses caractéristiques physiques, et les mécanismes d'initiation et de terminaison de la traduction (Lodish, 1974; Mills and Green, 2017). Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'explorer les mécanismes d'initiation et de terminaison de la traduction dans un contexte de diminution de la quantité de ribosomes fonctionnels. En particulier, il serait intéressant de caractériser le mécanisme de recyclage des ribosomes et de la ré-initiation de la traduction en condition d'haploinsuffisance

en *RPS14*, afin d'explorer si certains facteurs pourraient compenser la diminution du nombre de ribosome dans ces conditions.

Bibliographie

- A -

Ahmad, Y., Boisvert, F.-M., Gregor, P., Cogley, A., and Lamond, A.I. (2009). NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res.* 37, D181-184.

Álvarez, B., and Moreno, S. (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *Journal of Cell Science* 119, 4475–4485.

An, X., Schulz, V.P., Li, J., Wu, K., Liu, J., Xue, F., Hu, J., Mohandas, N., and Gallagher, P.G. (2014). Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood* 123, 3466–3477.

Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80–85.

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

Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O., and Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3889–3894.

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

- B -

Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA Degradation by Deadenylation-Independent Decapping. *Molecular Cell* 15, 5–15.

Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217–221.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.

Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H.D., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L.J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24, 165–169.

- Barlow, J.L., Drynan, L.F., Hewett, D.R., Holmes, L.R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A.L., Jolin, H.E., Pannell, R., Middleton, A.J., Wong, S.H., et al. (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat. Med.* *16*, 59–66.
- Baron, M.H., Isern, J., and Fraser, S.T. (2012). The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* *119*, 4828–4837.
- Barrett, L.W., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 3613–3634.
- Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C., and Lahav, G. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 488.
- Bell, S.P., Jantzen, H.M., and Tjian, R. (1990). Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. *Genes Dev.* *4*, 943–954.
- Bernstein, K.A., Bleichert, F., Bean, J.M., Cross, F.R., and Baserga, S.J. (2007). Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. *Mol. Biol. Cell* *18*, 953–964.
- Bérout, C., and Soussi, T. (1998). p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res* *26*, 200–204.
- Bibikova, E., Youn, M.-Y., Danilova, N., Ono-Uruga, Y., Konto-Ghiorghi, Y., Ochoa, R., Narla, A., Glader, B., Lin, S., and Sakamoto, K.M. (2014). TNF-mediated inflammation represses GATA1 and activates p38 MAP kinase in RPS19-deficient hematopoietic progenitors. *Blood* *124*, 3791–3798.
- Blázquez-Domingo, M., Grech, G., and von Lindern, M. (2005). Translation initiation factor 4E inhibits differentiation of erythroid progenitors. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 8496–8506.
- Bohnsack, K.E., and Bohnsack, M.T. (2019). Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *The EMBO Journal* e100278.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 574–585.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.-M., and Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol. Cell* *40*, 216–227.
- Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R.J., et al. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* *99*, 4638–4641.
- Bowman, L.H., Rabin, B., and Schlessinger, D. (1981). Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* *9*, 4951–4966.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J Cell Sci* *123*, 2527–2532.

Brannan, C.I., Lyman, S.D., Williams, D.E., Eisenman, J., Anderson, D.M., Cosman, D., Bedell, M.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1991). Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 4671–4674.

Brogna, S., and Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 107–113.

Brooks, C.L., and Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* *21*, 307–315.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Bühring, H.-J., Komatsu, N., and Kavanagh, T.J. (1998). Analysis of c-kit Receptor Dimerization by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Blood* *91*, 898–906.

Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* *277*, 831–834.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* *96*, 857–868.

Budde, A., and Grummt, I. (1999). p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene* *18*, 1119–1124.

Bursać, S., Brdovčak, M.C., Pfannkuchen, M., Orsolić, I., Golomb, L., Zhu, Y., Katz, C., Daftuar, L., Grabušić, K., Vukelić, I., et al. (2012). Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 20467–20472.

Bywater, M.J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., et al. (2012). Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* *22*, 51–65.

- C -

Caceres, G., McGraw, K., Yip, B.H., Pellagatti, A., Johnson, J., Zhang, L., Liu, K., Zhang, L.M., Fulp, W.J., Lee, J.-H., et al. (2013). TP53 suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 16127–16132.

Cairns, C.A., and White, R.J. (1998). p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J* *17*, 3112–3123.

Calo, E., Flynn, R.A., Martin, L., Spitale, R.C., Chang, H.Y., and Wysocka, J. (2015). RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature* *518*, 249–253.

Campagnoli, M.F., Ramenghi, U., Armiraglio, M., Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Avondo, F., Pavesi, E., Fribourg, S., Gleizes, P.-E., et al. (2008). RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* *29*, 911–920.

- Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* *21*, 3368–3376.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* *2*, E107-112.
- Cavaillé, J., Nicoloso, M., and Bachellerie, J.P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* *383*, 732–735.
- Chaillou, T., Jackson, J.R., England, J.H., Kirby, T.J., Richards-White, J., Esser, K.A., Dupont-Versteegden, E.E., and McCarthy, J.J. (2015). Identification of a conserved set of upregulated genes in mouse skeletal muscle hypertrophy and regrowth. *J. Appl. Physiol.* *118*, 86–97.
- Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., Dreazen, A., Cagnard, N., Carpentier, W., Kiss, T., Meyuhas, O., et al. (2014). Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* *33*, 474–483.
- Chen, J.-J. (2014). Translational Control by Heme-Regulated eIF2 α Kinase during Erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* *21*, 172–178.
- Cheng, Z., Mugler, C.F., Keskin, A., Hodapp, S., Chan, L.Y.-L., Weis, K., Mertins, P., Regev, A., Jovanovic, M., and Brar, G.A. (2019). Small and Large Ribosomal Subunit Deficiencies Lead to Distinct Gene Expression Signatures that Reflect Cellular Growth Rate. *Mol. Cell* *73*, 36-47.e10.
- Chesnokov, I., Chu, W.M., Botchan, M.R., and Schmid, C.W. (1996). p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 7084–7088.
- Choesmel, V., Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Crétien, A., Leblanc, T., Tchernia, G., Da Costa, L., and Gleizes, P.-E. (2007). Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *109*, 1275–1283.
- Choesmel, V., Fribourg, S., Aguisa-Touré, A.-H., Pinaud, N., Legrand, P., Gazda, H.T., and Gleizes, P.-E. (2008). Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1253–1263.
- Chou, S.T., Khandros, E., Bailey, L.C., Nichols, K.E., Vakoc, C.R., Yao, Y., Huang, Z., Crispino, J.D., Hardison, R.C., Blobel, G.A., et al. (2009). Graded repression of PU.1/Sfp1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood* *114*, 983–994.
- Chretien, S., Dubart, A., Beaupain, D., Raich, N., Grandchamp, B., Rosa, J., Goossens, M., and Romeo, P.H. (1988). Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 6–10.
- Clinton, C., and Gazda, H.T. (1993). Diamond-Blackfan Anemia. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Cmejla, R., Cmejlova, J., Handrkova, H., Petrak, J., and Pospisilova, D. (2007). Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* *28*, 1178–1182.

Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 3260–3265.

Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., and Sogo, J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* *57*, 753–761.

- D -

Da Costa, L., Tchernia, G., Gascard, P., Lo, A., Meerpohl, J., Niemeyer, C., Chasis, J.-A., Fixler, J., and Mohandas, N. (2003). Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood* *101*, 5039–5045.

Dai, M.-S., and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.* *279*, 44475–44482.

Dai, M.-S., Arnold, H., Sun, X.-X., Sears, R., and Lu, H. (2007). Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J.* *26*, 3332–3345.

Dai, M.-S., Sun, X.-X., and Lu, H. (2010). Ribosomal protein L11 associates with c-Myc at 5 S rRNA and tRNA genes and regulates their expression. *J. Biol. Chem.* *285*, 12587–12594.

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* *16*, 253–264.

Danilova, N., and Gazda, H.T. (2015). Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech* *8*, 1013–1026.

Danilova, N., Sakamoto, K.M., and Lin, S. (2008). Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood* *112*, 5228–5237.

De Keersmaecker, K., Sulima, S.O., and Dinman, J.D. (2015). Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood* *125*, 1377–1382.

De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P., and Peschle, C. (1999). Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* *93*, 796–803.

Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 344–351.

DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection

of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2420–2424.

Derenzini, E., Rossi, A., and Treré, D. (2018). Treating hematological malignancies with drugs inhibiting ribosome biogenesis: when and why. *J Hematol Oncol* 11, 75.

Derenzini, M., Montanaro, L., Chillà, A., Tosti, E., Vici, M., Barbieri, S., Govoni, M., Mazzini, G., and Treré, D. (2005). Key role of the achievement of an appropriate ribosomal RNA complement for G1-S phase transition in H4-II-E-C3 rat hepatoma cells. *J. Cell. Physiol.* 202, 483–491.

Derenzini, M., Montanaro, L., and Treré, D. (2009). What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology* 54, 753–762.

Dever, T.E., and Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a013706.

Dolznic, H., Grebien, F., Sauer, T., Beug, H., and Müllner, E.W. (2004). Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 899–905.

Donati, G., Brighenti, E., Vici, M., Mazzini, G., Treré, D., Montanaro, L., and Derenzini, M. (2011). Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation. *J. Cell. Sci.* 124, 3017–3028.

Donati, G., Montanaro, L., and Derenzini, M. (2012). Ribosome Biogenesis and Control of Cell Proliferation: p53 Is Not Alone. *Cancer Res* 72, 1602–1607.

Donati, G., Peddigari, S., Mercer, C.A., and Thomas, G. (2013). 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep* 4, 87–98.

Doty, R.T., Yan, X., Lausted, C., Munday, A.D., Yang, Z., Yi, D., Jabbari, N., Liu, L., Keel, S.B., Tian, Q., et al. (2019). Single-cell analyses demonstrate that a heme-GATA1 feedback loop regulates red cell differentiation. *Blood* 133, 457–469.

Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., et al. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 21, 169–175.

Drygin, D., Rice, W.G., and Grummt, I. (2010). The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 131–156.

Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., O'Brien, S.E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M.K., Siddiqui-Jain, A., et al. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* 71, 1418–1430.

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., et al. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal

protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* *117*, 2567–2576.

- E -

Ear, J., Hsueh, J., Nguyen, M., Zhang, Q., Sung, V., Chopra, R., Sakamoto, K.M., and Lin, S. (2016). A Zebrafish Model of 5q-Syndrome Using CRISPR/Cas9 Targeting RPS14 Reveals a p53-Independent and p53-Dependent Mechanism of Erythroid Failure. *J Genet Genomics* *43*, 307–318.

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

Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., and Schwartz, M. (1996). p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5178–5185.

Eleouet, J.F., and Roméo, P.H. (1993). CCACC-binding or simian-virus-40-protein-1-binding proteins cooperate with human GATA-1 to direct erythroid-specific transcription and to mediate 5' hypersensitive site 2 sensitivity of a TATA-less promoter. *Eur. J. Biochem.* *212*, 763–770.

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

Engström, M., Karlsson, R., and Jönsson, J.-I. (2003). Inactivation of the forkhead transcription factor FoxO3 is essential for PKB-mediated survival of hematopoietic progenitor cells by kit ligand. *Exp. Hematol.* *31*, 316–323.

Esguerra, J., Warringer, J., and Blomberg, A. (2008). Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping. *RNA* *14*, 649–656.

- F -

Fang, J., Menon, M., Kapelle, W., Bogacheva, O., Bogachev, O., Houde, E., Browne, S., Sathyanarayana, P., and Wojchowski, D.M. (2007). EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood* *110*, 2361–2370.

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., et al. (2008). Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *112*, 1582–1592.

Feinstein, E., Gale, R.P., Reed, J., and Canaani, E. (1992). Expression of the normal p53 gene induces differentiation of K562 cells. *Oncogene* *7*, 1853–1857.

Fernandes, L.D., Moura, A.P.S. de, and Ciandrini, L. (2017). Gene length as a regulator for ribosome recruitment and protein synthesis: theoretical insights. *Scientific Reports* *7*, 17409.

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a

paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1215–1227.

Ferretti, M.B., Ghalei, H., Ward, E.A., Potts, E.L., and Karbstein, K. (2017). Rps26 directs mRNA-specific translation by recognition of Kozak sequence elements. *Nat Struct Mol Biol* 24, 700–707.

Fewell, S.W., and Woolford, J.L. (1999). Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 826–834.

Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083–1093.

Flanagan, J.G., Chan, D.C., and Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant. *Cell* 64, 1025–1035.

Fonseca, B.D., Zakaria, C., Jia, J.-J., Graber, T.E., Svitkin, Y., Tahmasebi, S., Healy, D., Hoang, H.-D., Jensen, J.M., Diao, I.T., et al. (2015). La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* 290, 15996–16020.

Friedrich, J.K., Panov, K.I., Cabart, P., Russell, J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2005). TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J. Biol. Chem.* 280, 29551–29558.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12355–12358.

Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* 11, 501–508.

Fumagalli, S., Ivanenkov, V.V., Teng, T., and Thomas, G. (2012). Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev.* 26, 1028–1040.

- G -

Ganguli, G., Back, J., Sengupta, S., and Wasylyk, B. (2002). The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. *EMBO Rep.* 3, 569–574.

Gautier, E.-F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.-C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Reports* 16, 1470–1484.

Gazda, H.T., Kho, A.T., Sanoudou, D., Zaucha, J.M., Kohane, I.S., Sieff, C.A., and Beggs,

- A.H. (2006). Defective ribosomal protein gene expression alters transcription, translation, apoptosis, and oncogenic pathways in Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells* 24, 2034–2044.
- Gazda, H.T., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choemmel, V., O'Donohue, M.-F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C.A., Newburger, P.E., et al. (2008). Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 769–780.
- Gilles, L., Arslan, A.D., Marinaccio, C., Wen, Q.J., Arya, P., McNulty, M., Yang, Q., Zhao, J.C., Konstantinoff, K., Lasho, T., et al. (2017). Downregulation of GATA1 drives impaired hematopoiesis in primary myelofibrosis. *J Clin Invest* 127, 1316–1320.
- Golomb, L., Volarevic, S., and Oren, M. (2014). p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials. *FEBS Lett.* 588, 2571–2579.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421, 290–294.
- Goodfellow, S.J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2012). Basic Mechanisms in RNA Polymerase I Transcription of the Ribosomal RNA Genes. *Subcell Biochem* 61.
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.* 7, 311–318.
- Grass, J.A., Boyer, M.E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M.J., and Bresnick, E.H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8811–8816.
- Gratenstein, K., Heggestad, A.D., Fortun, J., Notterpek, L., Pestov, D.G., and Fletcher, B.S. (2005). The WD-repeat protein GRWD1: potential roles in myeloid differentiation and ribosome biogenesis. *Genomics* 85, 762–773.
- Gregory, C.J. (1976). Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J. Cell. Physiol.* 89, 289–301.
- Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1977). Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood* 49, 855–864.
- Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S.H., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 94, 87–96.
- Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* 17, 1691–1702.
- Grummt, I. (2010). Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *FEBS J.* 277, 4626–4639.

Gu, B., and Zhu, W.-G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 672–684.

Guimaraes, J.C., and Zavolan, M. (2016). Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells. *Genome Biology* 17, 236.

Gupta, V., and Warner, J.R. (2014). Ribosome-omics of the human ribosome. *RNA* 20, 1004–1013.

- H -

Haag, E.S., and Dinman, J.D. (2019). Still Searching for Specialized Ribosomes. *Dev. Cell* 48, 744–746.

Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., et al. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8862–8877.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.

Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46–51.

Hayashi, Y., Kuroda, T., Kishimoto, H., Wang, C., Iwama, A., and Kimura, K. (2014). Downregulation of rRNA Transcription Triggers Cell Differentiation. *PLOS ONE* 9, e98586.

Heath, D.S., Axelrad, A.A., McLeod, D.L., and Shreeve, M.M. (1976). Separation of the erythropoietin-responsive progenitors BFU-E and CFU-E in mouse bone marrow by unit gravity sedimentation. *Blood* 47, 777–792.

Hein, N., Cameron, D.P., Hannan, K.M., Nguyen, N.-Y.N., Fong, C.Y., Sornkom, J., Wall, M., Pavy, M., Cullinane, C., Diesch, J., et al. (2017). Inhibition of Pol I transcription treats murine and human AML by targeting the leukemia-initiating cell population. *Blood* 129, 2882–2895.

Hellen, C.U.T. (2018). Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10.

Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 225–242.

Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., and Mathews, M.B. (2012). Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Horos, R., IJspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I.P., et al. (2012). Ribosomal deficiencies in

Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* 119, 262–272.

Hsieh, F.F., Barnett, L.A., Green, W.F., Freedman, K., Matushansky, I., Skoultschi, A.I., and Kelley, L.L. (2000). Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood* 96, 2746–2754.

- I -

Iadevaia, V., Liu, R., and Proud, C.G. (2014). mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 36, 113–120.

Imami, K., Milek, M., Bogdanow, B., Yasuda, T., Kastelic, N., Zauber, H., Ishihama, Y., Landthaler, M., and Selbach, M. (2018). Phosphorylation of the Ribosomal Protein RPL12/uL11 Affects Translation during Mitosis. *Mol. Cell* 72, 84-98.e9.

Iscove, N.N., Sieber, F., and Winterhalter, K.H. (1974). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J. Cell. Physiol.* 83, 309–320.

Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., Anderson, R.A., Turner, M.L., and Medvinsky, A. (2011). Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Journal of Experimental Medicine* 208, 2417–2427.

- J -

Jaako, P., Debnath, S., Olsson, K., Zhang, Y., Flygare, J., Lindström, M.S., Bryder, D., and Karlsson, S. (2015). Disruption of the 5S RNP-Mdm2 interaction significantly improves the erythroid defect in a mouse model for Diamond-Blackfan anemia. *Leukemia* 29, 2221–2229.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 113–127.

James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R., and DiMario, P. (2014). Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* 5, 402–426.

Jayapal, S.R., Lee, K.L., Ji, P., Kaldis, P., Lim, B., and Lodish, H.F. (2010). Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *J. Biol. Chem.* 285, 40252–40265.

Johnson, P., Chung, S., and Benchimol, S. (1993). Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1456–1463.

- K -

Kampen, K.R., Sulima, S.O., Verbelen, B., Girardi, T., Vereecke, S., Rinaldi, G., Verbeeck, J., Op de Beeck, J., Uyttebroeck, A., Meijerink, J.P.P., et al. (2019). The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* 33, 319–332.

- Kantidakis, T., Ramsbottom, B.A., Birch, J.L., Dowding, S.N., and White, R.J. (2010). mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 11823–11828.
- Kapasi, P., Chaudhuri, S., Vyas, K., Baus, D., Komar, A.A., Fox, P.L., Merrick, W.C., and Mazumder, B. (2007). L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Mol. Cell* *25*, 113–126.
- Kapur, R., Majumdar, M., Xiao, X., McAndrews-Hill, M., Schindler, K., and Williams, D.A. (1998). Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood* *91*, 879–889.
- Kapur, R., Cooper, R., Xiao, X., Weiss, M.J., Donovan, P., and Williams, D.A. (1999). The Presence of Novel Amino Acids in the Cytoplasmic Domain of Stem Cell Factor Results in Hematopoietic Defects in Steel17H Mice. *Blood* *94*, 1915–1925.
- Kastenhuber, E.R., and Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* *170*, 1062–1078.
- Kasteri, J., Das, D., Zhong, X., Persaud, L., Francis, A., Muharam, H., and Sauane, M. (2018). Translation Control by p53. *Cancers (Basel)* *10*.
- Khajuria, R.K., Munschauer, M., Ulirsch, J.C., Fiorini, C., Ludwig, L.S., McFarland, S.K., Abdulhay, N.J., Specht, H., Keshishian, H., Mani, D.R., et al. (2018). Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell* *173*, 90-103.e19.
- Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* *520*, 640–645.
- Kim, T.-S., Jang, C.-Y., Kim, H.D., Lee, J.Y., Ahn, B.-Y., and Kim, J. (2005). Interaction of Hsp90 with Ribosomal Proteins Protects from Ubiquitination and Proteasome-dependent Degradation. *MBoC* *17*, 824–833.
- King, T.H., Liu, B., McCully, R.R., and Fournier, M.J. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol. Cell* *11*, 425–435.
- Kinross, K.M., Clark, A.J., Iazzolino, R.M., and Humbert, P.O. (2006). E2f4 regulates fetal erythropoiesis through the promotion of cellular proliferation. *Blood* *108*, 886–895.
- Kiss, T. (2002). Small Nucleolar RNAs: An Abundant Group of Noncoding RNAs with Diverse Cellular Functions. *Cell* *109*, 145–148.
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* *145*, 383–397.
- Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance

translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196, 947–950.

Kramer, M.F., Gunaratne, P., and Ferreira, G.C. (2000). Transcriptional regulation of the murine erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase gene. *Gene* 247, 153–166.

Krichevsky, A.M., Metzger, E., and Rosen, H. (1999). Translational Control of Specific Genes during Differentiation of HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 14295–14305.

Kroll, S.L., Barth-Baus, D., and Hensold, J.O. (2001). The Carboxyl-terminal Domain of the Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor Uncouples Ribosomal Biogenesis from Cell Cycle Progression in Differentiating 32D Myeloid Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 49410–49418.

Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell* 137, 609–622.

Kusnadi, E.P., Hannan, K.M., Hicks, R.J., Hannan, R.D., Pearson, R.B., and Kang, J. (2015). Regulation of rDNA transcription in response to growth factors, nutrients and energy. *Gene* 556, 27–34.

- L -

Lahr, R.M., Fonseca, B.D., Ciotti, G.E., Al-Ashtal, H.A., Jia, J.-J., Niklaus, M.R., Blagden, S.P., Alain, T., and Berman, A.J. (2017). La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. *Elife* 6.

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

Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.

Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263.

Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* 122, 3589–3594.

Le Bouteiller, M., Souilhol, C., Beck-Cormier, S., Stedman, A., Burlen-Defranoux, O., Vandormael-Pournin, S., Bernex, F., Cumano, A., and Cohen-Tannoudji, M. (2013). Notchless-dependent ribosome synthesis is required for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 210, 2351–2369.

Lempiäinen, H., and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 855–863.

Li, J., Hale, J., Bhagia, P., Xue, F., Chen, L., Jaffray, J., Yan, H., Lane, J., Gallagher, P.G., Mohandas, N., et al. (2014). Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood* 124, 3636–3645.

Liang, X.-H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA* 15,

1716–1728.

Liao, J.-M., Zhou, X., Gatignol, A., and Lu, H. (2014). Ribosomal proteins L5 and L11 cooperatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene* 33, 4916–4923.

Lindström, M.S. (2009). Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 167–170.

Linnekin, D., DeBerry, C.S., and Mou, S. (1997). Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 272, 27450–27455.

Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.

Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009). p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4, 37–48.

Liu, Y., Deisenroth, C., and Zhang, Y. (2016). RP–MDM2–p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends Cancer* 2, 191–204.

Lodish, H.F. (1974). Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis. *Nature* 251, 385–388.

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

Loken, M.R., Shah, V.O., Dattilio, K.L., and Civin, C.I. (1987). Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 69, 255–263.

Love, P.E., Warzecha, C., and Li, L. (2014). Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends in Genetics* 30, 1–9.

Ludwig, L.S., Gazda, H.T., Eng, J.C., Eichhorn, S.W., Thiru, P., Ghazvinian, R., George, T.I., Gotlib, J.R., Beggs, A.H., Sieff, C.A., et al. (2014). Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 20, 748–753.

- M -

Maden, B.E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 39, 241–303.

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

Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.-P., Solano-González, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., et al. (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell*

24, 318–330.

Martin, D.I., and Orkin, S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* *4*, 1886–1898.

Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* *15*, 1067–1077.

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

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

Mélèse, T., and Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 319–324.

Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology* *19*, 560–567.

Miettinen, T.P., and Björklund, M. (2015). Modified ribosome profiling reveals high abundance of ribosome protected mRNA fragments derived from 3' untranslated regions. *Nucleic Acids Res* *43*, 1019–1034.

Mills, E.W., and Green, R. (2017). Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science* *358*.

Mills, E.W., Wangen, J., Green, R., and Ingolia, N.T. (2016). Dynamic Regulation of a Ribosome Rescue Pathway in Erythroid Cells and Platelets. *Cell Rep* *17*, 1–10.

Mirabello, L., Macari, E.R., Jessop, L., Ellis, S.R., Myers, T., Giri, N., Taylor, A.M., McGrath, K.E., Humphries, J.M., Ballew, B.J., et al. (2014). Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood* *124*, 24–32.

Mitrovich, Q.M., and Anderson, P. (2000). Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Dev.* *14*, 2173–2184.

Miura, Y., Miura, O., Ihle, J.N., and Aoki, N. (1994). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 29962–29969.

Miyazawa, K., Williams, D.A., Gotoh, A., Nishimaki, J., Broxmeyer, H.E., and Toyama, K. (1995). Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* *85*, 641–649.

Moniz, H., Gastou, M., Leblanc, T., Hurtaud, C., Crétien, A., Lécluse, Y., Raslova, H., Larghero, J., Croisille, L., Faubladiet, M., et al. (2012). Primary hematopoietic cells from

DBA patients with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell Death Dis* 3, e356.

Mullineux, S.-T., and Lafontaine, D.L.J. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* 94, 1521–1532.

Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2005). Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 54, 63–75.

Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A., and Lu, X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 702–712.

- N -

Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205.

Negi, S.S., and Brown, P. (2015). Transient rRNA synthesis inhibition with CX-5461 is sufficient to elicit growth arrest and cell death in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncotarget* 6, 34846–34858.

Németh, A., and Grummt, I. (2018). Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 105–111.

Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397–409.

Neumann, F., Hemmerich, P., von Mikecz, A., Peter, H.H., and Krawinkel, U. (1995). Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 195–202.

Nguyen, A.T., Prado, M.A., Schmidt, P.J., Sendamarai, A.K., Wilson-Grady, J.T., Min, M., Campagna, D.R., Tian, G., Shi, Y., Dederer, V., et al. (2017). UBE2O remodels the proteome during terminal erythroid differentiation. *Science* 357.

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

Nicolas, E., Parisot, P., Pinto-Monteiro, C., de Walque, R., De Vleeschouwer, C., and Lafontaine, D.L.J. (2016). Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. *Nature Communications* 7, 11390.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920–930.

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2016). Distinct routes of lineage development

reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 351, aab2116.

Nurse, P., and Thuriaux, P. (1977). Controls over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast. *Experimental Cell Research* 107, 365–375.

- O -

O'Brien, K.A., Farrar, J.E., Vlachos, A., Anderson, S.M., Tsujiura, C.A., Lichtenberg, J., Blanc, L., Atsidaftos, E., Elkahloun, A., An, X., et al. (2017). Molecular convergence in ex vivo models of Diamond Blackfan anemia. *Blood* blood-2017-01-760462.

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

Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* 514, 17–25.

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

Oh, W.J., Wu, C., Chih, Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.-A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., and Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J* 29, 3939–3951.

Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 10, 431–442.

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

- P -

Palis, J., Chan, R.J., Koniski, A., Patel, R., Starr, M., and Yoder, M.C. (2001). Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4528–4533.

Papetti, M., Wontakal, S.N., Stopka, T., and Skoultchi, A.I. (2010). GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle* 9, 1972–1980.

Pellagatti, A., Hellström-Lindberg, E., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Fidler, C., Cazzola, M., et al. (2008). Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br J Haematol* 142, 57–64.

Peller, S., Frenkel, J., Lapidot, T., Kahn, J., Rahimi-Levene, N., Yona, R., Nissim, L., Goldfinger, N., Sherman, D.J., and Rotter, V. (2003). The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene* 22, 4648–4655.

Pereboom, T.C., Bondt, A., Pallaki, P., Klasson, T.D., Goos, Y.J., Essers, P.B., Groot

Koerkamp, M.J.A., Gazda, H.T., Holstege, F.C.P., Costa, L.D., et al. (2014). Translation of branched-chain aminotransferase-1 transcripts is impaired in cells haploinsufficient for ribosomal protein genes. *Exp. Hematol.* *42*, 394-403.e4.

Philippe, L., Vasseur, J.-J., Debart, F., and Thoreen, C.C. (2018). La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Res.* *46*, 1457–1469.

Piekna-Przybylska, D., Przybylski, P., Baudin-Baillieu, A., Rousset, J.-P., and Fournier, M.J. (2008). Ribosome performance is enhanced by a rich cluster of pseudouridines in the A-site finger region of the large subunit. *J. Biol. Chem.* *283*, 26026–26036.

Pillet, B., García-Gómez, J.J., Pausch, P., Falquet, L., Bange, G., Cruz, J. de la, and Kressler, D. (2015). The Dedicated Chaperone Acl4 Escorts Ribosomal Protein Rpl4 to Its Nuclear Pre-60S Assembly Site. *PLOS Genetics* *11*, e1005565.

Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* *37*, 196–210.

Poortinga, G., Hannan, K.M., Snelling, H., Walkley, C.R., Jenkins, A., Sharkey, K., Wall, M., Brandenburger, Y., Palatsides, M., Pearson, R.B., et al. (2004). MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *EMBO J.* *23*, 3325–3335.

Pop, R., Shearstone, J.R., Shen, Q., Liu, Y., Hallstrom, K., Koulis, M., Gribnau, J., and Socolovsky, M. (2010). A Key Commitment Step in Erythropoiesis Is Synchronized with the Cell Cycle Clock through Mutual Inhibition between PU.1 and S-Phase Progression. *PLOS Biology* *8*, e1000484.

Popolo, L., Vanoni, M., and Alberghina, L. (1982). Control of the yeast cell cycle by protein synthesis. *Exp. Cell Res.* *142*, 69–78.

Proust, A., Da Costa, L., Rince, P., Landois, A., Tamary, H., Zaizov, R., Tchernia, G., Delaunay, J., and SHIP Working Group on DBA (2003). Ten novel Diamond-Blackfan anemia mutations and three polymorphisms within the rps19 gene. *Hematol. J.* *4*, 132–136.

Pugh, C.W., Tan, C.C., Jones, R.W., and Ratcliffe, P.J. (1991). Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 10553–10557.

Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science* *336*, 1440–1444.

Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J.P., and Puvion, E. (1991). Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. *Chromosoma* *100*, 395–409.

- Q -

Quin, J., Chan, K.T., Devlin, J.R., Cameron, D.P., Diesch, J., Cullinane, C., Ahern, J., Khot, A., Hein, N., George, A.J., et al. (2016). Inhibition of RNA polymerase I transcription

initiation by CX-5461 activates non-canonical ATM/ATR signaling. *Oncotarget* 7, 49800–49818.

- R -

Raval, A., Sridhar, K.J., Patel, S., Turnbull, B.B., Greenberg, P.L., and Mitchell, B.S. (2012). Reduced rRNA expression and increased rDNA promoter methylation in CD34+ cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 4812–4818.

Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sørensen, T., et al. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445, 102–105.

van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* 10, 301–309.

Riley, M.F., and Lozano, G. (2012). The Many Faces of MDM2 Binding Partners. *Genes Cancer* 3, 226–239.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.

Robledo, S., Idol, R.A., Crimmins, D.L., Ladenson, J.H., Mason, P.J., and Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 14, 1918–1929.

Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* 20, 8458–8467.

Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J.R., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J* 24, 2354–2366.

Rogers, D.W., Böttcher, M.A., Traulsen, A., and Greig, D. (2017). Ribosome reinitiation can explain length-dependent translation of messenger RNA. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005592.

Ronen, D., Schwartz, D., Teitz, Y., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1996). Induction of HL-60 cells to undergo apoptosis is determined by high levels of wild-type p53 protein whereas differentiation of the cells is mediated by lower p53 levels. *Cell Growth Differ.* 7, 21–30.

Rosado, I.V., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2007). Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. *Nucleic Acids Res* 35, 4203–4213.

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

Ruijtenberg, S., and van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* 15, 196–212.

Russell, J., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem Soc Symp* 203–216.

Rylski, M., Welch, J.J., Chen, Y.-Y., Letting, D.L., Diehl, J.A., Chodosh, L.A., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (2003). GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5031–5042.

- S -

Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11, 1306–1313.

Saleque, S., Cameron, S., and Orkin, S.H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev.* 16, 301–306.

Sani, E., Poortinga, G., Sharkey, K., Hung, S., Holloway, T.P., Quin, J., Robb, E., Wong, L.H., Thomas, W.G., Stefanovsky, V., et al. (2008). UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J. Cell Biol.* 183, 1259–1274.

Sankaran, V.G., Stuart H. Orkin, and Walkley, C.R. (2008). Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis. *Genes Dev.* 22, 463–475.

Sankaran, V.G., Ghazvinian, R., Do, R., Thiru, P., Vergilio, J.-A., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Orkin, S.H., Nathan, D.G., Lander, E.S., et al. (2012a). Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J. Clin. Invest.* 122, 2439–2443.

Sankaran, V.G., Ludwig, L.S., Sicinska, E., Xu, J., Bauer, D.E., Eng, J.C., Patterson, H.C., Metcalf, R.A., Natkunam, Y., Orkin, S.H., et al. (2012b). Cyclin D3 coordinates the cell cycle during differentiation to regulate erythrocyte size and number. *Genes Dev.* 26, 2075–2087.

Saracino, F., Bassler, J., Muzzini, D., Hurt, E., and Agostoni Carbone, M.L. (2004). The yeast kinase Swel is required for proper entry into cell cycle after arrest due to ribosome biogenesis and protein synthesis defects. *Cell Cycle* 3, 648–654.

Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976.

Scheer, U., and Rose, K.M. (1984). Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1431–1435.

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

Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., et al. (2000). Structure of functionally activated small

ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102, 615–623.

Schmeing, T.M., and Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 461, 1234–1242.

Schneider, R.K., Schenone, M., Ferreira, M.V., Kramann, R., Joyce, C.E., Hartigan, C., Beier, F., Brümmendorf, T.H., Germing, U., Platzbecker, U., et al. (2016). Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat. Med.* 22, 288–297.

Schütz, S., Fischer, U., Altvater, M., Nerurkar, P., Peña, C., Gerber, M., Chang, Y., Caesar, S., Schubert, O.T., Schlenstedt, G., et al. (2014). A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *Elife* 3, e03473.

Schwanhäusser, 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.

Sears, R., Leone, G., DeGregori, J., and Nevins, J.R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Mol. Cell* 3, 169–179.

Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, e1002533.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.

Sherton, C.C., and Kabat, D. (1976). Changes in RNA and protein metabolism preceding onset of hemoglobin synthesis in cultured friend leukemia cells. *Developmental Biology* 48, 118–131.

Shou, W., Sakamoto, K.M., Keener, J., Morimoto, K.W., Traverso, E.E., Azzam, R., Hoppe, G.J., Feldman, R.M., DeModena, J., Moazed, D., et al. (2001). Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol. Cell* 8, 45–55.

Siatecka, M., Lohmann, F., Bao, S., and Bieker, J.J. (2010). EKLF Directly Activates the p21WAF1/CIP1 Gene by Proximal Promoter and Novel Intronic Regulatory Regions during Erythroid Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 30, 2811–2822.

Simsek, D., and Barna, M. (2017). An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *Curr. Opin. Cell Biol.* 45, 92–101.

Sirri, V., Hernandez-Verdun, D., and Roussel, P. (2002). Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol* 156, 969–981.

Sloan, K.E., Bohnsack, M.T., and Watkins, N.J. (2013). The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep* 5, 237–247.

Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (1999). Fetal anemia

and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181–191.

Somervaille, T.C., Linch, D.C., and Khwaja, A. (2001). Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood* 98, 1374–1381.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731–745.

Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I., and Moss, T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol. Cell* 8, 1063–1073.

Sudmant, P.H., Lee, H., Dominguez, D., Heiman, M., and Burge, C.B. (2018). Widespread Accumulation of Ribosome-Associated Isolated 3' UTRs in Neuronal Cell Populations of the Aging Brain. *Cell Reports* 25, 2447-2456.e4.

Sui, X., Krantz, S.B., You, M., and Zhao, Z. (1998). Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 92, 1142–1149.

Sulima, S.O., Kampen, K.R., and De Keersmaecker, K. (2019). Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells* 8.

Sung, M.-K., Reitsma, J.M., Sweredoski, M.J., Hess, S., and Deshaies, R.J. (2016a). Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell* 27, 2642–2652.

Sung, M.-K., Porras-Yakushi, T.R., Reitsma, J.M., Huber, F.M., Sweredoski, M.J., Hoelz, A., Hess, S., and Deshaies, R.J. (2016b). A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife* 5.

Suzuki, M., Kobayashi-Osaki, M., Tsutsumi, S., Pan, X., Ohmori, S., Takai, J., Moriguchi, T., Ohneda, O., Ohneda, K., Shimizu, R., et al. (2013). GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. *Genes Cells* 18, 921–933.

- T -

Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.-L., Mullineux, S.-T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., and Lafontaine, D.L.J. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol. Cell* 51, 539–551.

Tanguay, R.L., and Gallie, D.R. (1996). Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* 16, 146–156.

Tavian, M., and Péault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 243–250.

Teng, T., Mercer, C.A., Hexley, P., Thomas, G., and Fumagalli, S. (2013). Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Mol. Cell Biol.* *33*, 4660–4671.

Thompson, M.K., and Gilbert, W.V. (2017). mRNA length-sensing in eukaryotic translation: reconsidering the “closed loop” and its implications for translational control. *Curr. Genet.* *63*, 613–620.

Thompson, M.K., Rojas-Duran, M.F., Gangaramani, P., and Gilbert, W.V. (2016). The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *Elife* *5*.

Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., and Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J Cell Sci* *126*, 4815–4821.

Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* *485*, 109–113.

Tollervey, D., and Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 337–342.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillar in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* *72*, 443–457.

Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulières, F., and Gas, N. (2000). Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2175–2189.

Tuller, T., Waldman, Y.Y., Kupiec, M., and Ruppin, E. (2010). Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *PNAS* *107*, 3645–3650.

Tusi, B.K., Wolock, S.L., Weinreb, C., Hwang, Y., Hidalgo, D., Zilionis, R., Waisman, A., Huh, J.R., Klein, A.M., and Socolovsky, M. (2018). Population snapshots predict early haematopoietic and erythroid hierarchies. *Nature* *555*, 54–60.

- U -

Unger, M.W., and Hartwell, L. (1976). Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* by methionyl tRNA. *PROC. NAT. ACAD. OF SCI. (U.S.A.)* *73*, 1664–1668.

- V -

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

Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inzé, D., and De Veylder, L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *44*, 143–168.

Villa, N., and Fraser, C.S. (2014). Mechanism of translation in eukaryotes. *Translation and Its Regulation in Cancer Biology and Medicine* 7–37.

Voit, R., Schnapp, A., Kuhn, A., Rosenbauer, H., Hirschmann, P., Stunnenberg, H.G., and Grummt, I. (1992). The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J.* 11, 2211–2218.

Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E., and Grummt, I. (1995). Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res* 23, 2593–2599.

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

- W -

Wadman, I.A., Osada, H., Grütz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145–3157.

Wall, L., deBoer, E., and Grosveld, F. (1988). The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev.* 2, 1089–1100.

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

Wang, W., Nag, S., Zhang, X., Wang, M.-H., Wang, H., Zhou, J., and Zhang, R. (2015). *Ribosomal Proteins and Human Diseases: Pathogenesis, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Implications.* *Med Res Rev* 35, 225–285.

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

Watkins, N.J., and Bohnsack, M.T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 397–414.

Wei, S., Chen, X., Rocha, K., Epling-Burnette, P.K., Djeu, J.Y., Liu, Q., Byrd, J., Sokol, L., Lawrence, N., Pireddu, R., et al. (2009). A critical role for phosphatase haploinsufficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12974–12979.

Wei, S., Chen, X., McGraw, K., Zhang, L., Komrokji, R., Clark, J., Caceres, G., Billingsley, D., Sokol, L., Lancet, J., et al. (2013). Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene* 32, 1110–1120.

Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184–1197.

West, M.J., Stoneley, M., and Willis, A.E. (1998). Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene* 17, 769–780.

Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327–339.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995a). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59–67.

Wu, H., Klingmüller, U., Besmer, P., and Lodish, H.F. (1995b). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377, 242–246.

Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126–1132.

- X -

Xu, X., Xiong, X., and Sun, Y. (2016). The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci China Life Sci* 59, 656–672.

Xue, S., and Barna, M. (2012a). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 355–369.

Xue, S., and Barna, M. (2012b). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 355–369.

- Y -

Yadavilli, S., Mayo, L.D., Higgins, M., Lain, S., Hegde, V., and Deutsch, W.A. (2009). Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair (Amst.)* 8, 1215–1224.

Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 154, 1112–1126.

Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2005). Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437, 754–758.

Yoshihama, M., Uechi, T., Asakawa, S., Kawasaki, K., Kato, S., Higa, S., Maeda, N., Minoshima, S., Tanaka, T., Shimizu, N., et al. (2002). The Human Ribosomal Protein Genes: Sequencing and Comparative Analysis of 73 Genes. *Genome Res* 12, 379–390.

Young, D.J., Guydosh, N.R., Zhang, F., Hinnebusch, A.G., and Green, R. (2015). Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo. *Cell* *162*, 872–884.

Yu, J.S.L., and Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* *143*, 3050–3060.

Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T.B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M.J., Orkin, S.H., et al. (2009). Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol. Cell* *36*, 682–695.

- Z -

Zahradka, P., Larson, D.E., and Sells, B.H. (1991). Regulation of ribosome biogenesis in differentiated rat myotubes. *Mol. Cell. Biochem.* *104*, 189–194.

Zaugg, K., Su, Y.-W., Reilly, P.T., Moolani, Y., Cheung, C.C., Hakem, R., Hirao, A., Liu, Q., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2007). Cross-talk between Chk1 and Chk2 in double-mutant thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 3805–3810.

Zeller, K.I., Haggerty, T.J., Barrett, J.F., Guo, Q., Wonsey, D.R., and Dang, C.V. (2001). Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* *276*, 48285–48291.

Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* *193*, 247–254.

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

Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A., and Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8902–8912.

Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E.R., Agrawal, S., and Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* *24*, 7238–7247.

Zhao, J., Yuan, X., Frödin, M., and Grummt, I. (2003). ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol. Cell* *11*, 405–413.

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.

Zhou, X., Hao, Q., Liao, J.-M., Liao, P., and Lu, H. (2013). Ribosomal protein S14 negatively

regulates c-Myc activity. *J. Biol. Chem.* 288, 21793–21801.

Zhou, X., Liao, W.-J., Liao, J.-M., Liao, P., and Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol* 7, 92–104.

Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001883.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757–768.

Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35.

Contrôle de la différenciation érythroïde terminale : Implication de la biogenèse des ribosomes

Résumé de la thèse :

La biogenèse du ribosome est un processus complexe qui assure la synthèse protéique indispensable à la croissance et la prolifération cellulaire. Les ribosomopathies telles que l'anémie de Blackfan-Diamond et le syndrome myélodysplasique 5q- sont associées à une mutation ou une délétion d'un gène codant une protéine ribosomique. Le symptôme dominant de ces deux pathologies est une anémie hypoplasique. Pour comprendre le tropisme érythroïde des ribosomopathies, nous avons étudié la biogenèse des ribosomes et les conséquences de son inhibition au cours de l'érythropoïèse humaine normale.

D'une part, nous avons déterminé la cinétique de la biogenèse des ribosomes au cours de l'érythropoïèse. Pour cela, nous avons développé une technique de protéomique (Pulse Silac) permettant l'identification et la quantification du renouvellement des protéines ribosomiques au sein d'échantillons d'érythroblastes primaires humains. Ainsi, nous avons mis en évidence un effondrement de la biogenèse des ribosomes à partir du stade érythroblaste basophile. L'inhibition prématurée de la biogenèse du ribosome dans les précurseurs immatures grâce à un inhibiteur spécifique de l'ARN pol I, le CX-5461, conduit à une accélération de la différenciation érythroïde. Ces résultats soulignent un rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'érythropoïèse. Puis, nous avons exploré les déterminants de la différenciation érythroïde lorsque la biogenèse des ribosomes s'arrête. Nous observons que cet arrêt est concomitant à une activation de la protéine p53 et de ses gènes cibles spécifiquement impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans l'arrêt du cycle cellulaire, identifiés par ChIP-seq. Enfin, nous avons exploré le mécanisme d'activation de p53 lors de l'arrêt de la biogenèse des ribosomes. La phosphorylation de CHK1 sur la sérine 345, concomitante à l'activation de p53, et l'inhibition de l'activation de p53 par un inhibiteur spécifique d'ATR suggèrent l'implication de la voie de réparation ATR/CHK1/p53. De plus, au cours de la différenciation érythroïde, la structure du nucléole, lieu de biogenèse du ribosome, évolue de nucléoles actifs vers un micronucléole inactif. Ces résultats suggèrent que la différenciation érythroïde pourrait provoquer un stress nucléolaire induisant l'activation de la voie de réparation ATR/CHK1/p53 et un arrêt du cycle cellulaire.

En parallèle, deux modèles mimant le syndrome 5q- ont été développés dans les lignées cellulaires UT-7/EPO et K562, dont l'expression du gène codant la protéine ribosomique *RPS14* est ciblée par stratégie shARN. La diminution d'expression de *RPS14* conduit à une réduction de moitié du contenu cellulaire en ribosomes et une traduction sélective au détriment du facteur de transcription érythroïde majeur GATA1. Afin d'explorer les paramètres qui gouvernent la traduction globale dans ces modèles, nous avons analysé les transcrits exprimés sur les polysomes. Ainsi, il apparaît que les transcrits caractérisés par une courte séquence, avec une extrémité 3'UTR hautement structurée, et un fort taux de codons optimaux sont les plus impactés en terme d'efficacité de traduction. De plus, une analyse intégrée du transcriptome et du protéome global des cellules UT-7/EPO sh*RPS14* confirme que la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes est directement liée à ces critères de sélectivité de traduction. Par ailleurs, nous avons étudié la régulation de la traduction au cours de l'érythropoïèse normale. Nous montrons que les protéines les plus abondantes dans les stades érythroïdes matures correspondent à des transcrits de courte séquence, et avec un fort taux de codons optimaux. Ces résultats indiquent que les transcrits codant pour les protéines qui s'accumulent au cours de l'érythropoïèse normale possèdent des caractéristiques optimales pour la traduction en condition normale, mais qui s'avèrent délétères en condition de disponibilité limitée en ribosomes.

En conclusion, ces travaux montrent que la biogenèse des ribosomes diminue au cours de l'érythropoïèse et semble contrôler la différenciation érythroïde terminale. La voie de réparation impliquant la kinase CHK1 et p53 participe à la régulation de la différenciation érythroïde terminale. Nous avons également montré que l'haploinsuffisance de la protéine RPS14 conduit à une sélectivité de la traduction au détriment des transcrits courts, très structurés et présentant une proportion élevée de codons optimaux.